

**Bioverfügbarkeit und Metabolismus von  
Flavonoiden  
- analytische und biochemische Untersuchungen**

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

vorgelegt von Jörg Wittig

geboren in Schleiz / Thüringen

Würzburg 2001

Eingereicht am: ..... 10. Januar 2002

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: ..... Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: ..... PD Dr. M. Veit

Gutachter: ..... Prof. Dr. S. Ebel

Tag des Promotionskolloquiums: ..... 12. Juni 2002

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Danksagungen

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

meinem Doktorvater, Mentor und Freund Dr. Markus Veit, dessen in mich gesetztes Vertrauen mir den Freiraum für selbstständiges und eigenverantwortliches Arbeiten gab. Unsere leidenschaftlich und kritisch geführten Diskussionen haben diese Arbeit immer wieder vorangetrieben. Auf Exkursionen und im Arbeitskreis verbrachten wir viele Abende, bei denen er meine Sicht auch auf Dinge außerhalb der Wissenschaft weitete. Er ermöglichte mir damit ein Studium des Lebens im Allgemeinen sowie der kulinarischen Künste im Besonderen.

Prof. Dr. Franz-Christian Czygan für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Lehrstuhl, für die anregenden Diskussionen und für das vermittelte Wissen auch außerhalb der Pharmazie und pharmazeutischen Biologie.

Prof. Dr. Siegfried Ebel sowohl für das fachliche aber auch für das humorvoll-philosophische Wissen, welches er mir und meinen Kommilitonen während meines Studiums vermittelt hat, besonders aber für die Begutachtung dieser Arbeit.

meinen Kolleginnen und Freundinnen Frau Dr. Claudia Kohlert und Frau Dr. Ulrike Gräfe die immer bereit waren Freude, aber auch Leid mit mir zu teilen. Ihre kritischen Diskussionen auf fachlichem Gebiet halfen oft bei der Lösung eines Problems. Mein Dank gilt ihnen für die schönen gemeinsamen Momente während der Betreuung der Studenten, nach der Arbeit, auf Kongressen und Exkursionen, die mir immer wieder Freude und Kraft gegeben haben. Diese Zeit mit Euch ist ein wichtiger Teil in meinen Leben.

unseren Diplomanten Ingrid Leipolz, Kerstin Teltscher, Brigitte Andrew und Andrea Ruf sowohl für ihre wertvolle Mitarbeit in den einzelnen Projekten als auch für ihr

Verständnis und Nachsicht bei unseren ersten Gehversuchen in der Betreuung wissenschaftlicher Arbeiten.

Dr. Markus Herderich, der mich in die Praxis der Massenspektrometrie einführte und mir mit großem persönlichen Einsatz bei der Planung, Durchführung und Auswertung von massenspektrometrischen Experimenten beistand. Auch er stand jederzeit für eine kritische Diskussionen zur Verfügung.

Dr. Albert Smolenski und Frau Petra Thalheimer, die mit großem wissenschaftlichen und persönlichen Engagement bei der Planung und Durchführung des HUVEC-Projektes mitwirkten. Ich danke Herrn Smolenski für die fruchtbaren und für mich sehr lehrreichen Gespräche, sowie Frau Thalheimer für die Anzucht der HUVEC-Kulturen.

den Firmen Bionorica Arzneimittel GmbH und H. Finzelberg's Nachf. GmbH & Co. KG für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Besonders möchte ich Frau Dr. Gudrun Abel und Herrn Schwankl der Firma Bionorica Arzneimittel GmbH für die hilfreichen Gespräche gerade auch in den ersten Etappen dieser Arbeit danken.

meiner Frau und Kollegin Dipl. Biol. Ingrid Leipolz-Wittig für die kritischen und fruchtbaren Gespräche auf fachlichem Gebiet, und für die Korrektur dieser Arbeit. Sie hat mir mit großem persönlichen Einsatz (besonders bei der Betreuung unseres Sohnes Maximilian Carsten Wittig) den nötigen Freiraum für die Erstellung dieser Arbeit gegeben und durch Ihre liebevolle emotionale Betreuung des Doktoranden entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

meinen Eltern, für die vielen Situationen in denen sie mir liebevolle Hilfestellung gaben, sei es bei der Lösung fachlicher oder persönlicher Probleme. Ich danke Ihnen dafür, dass sie mir Studium und Promotion ermöglicht haben.

meinen Freunden Christine Kirchhoff, Carsten Arnolt, Michael Weigand, Bernd Kelm und Patrik Kwik, die mich nicht vergessen ließen, wie man trotz Studien- und Promotionsstress das Leben genießt, und auf die ich mich fachlich und persönlich immer verlassen konnte.

## Inhaltverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Untersuchte Stoffe und deren pharmazeutische Verwendung .....	1
1.2	Analytik zur Qualitätskontrolle von Arzneidrogen, Extrakten und Phytopharmaka .....	5
1.2.1	Regularien .....	5
1.2.2	Validierung in der Qualitätskontrolle .....	6
1.2.3	Verfahren und Methoden .....	8
1.2.4	Etablierte Prüfverfahren für die untersuchten Stoffgruppen in Arzneidrogen und daraus hergestellten Halbfertigwaren und Phytopharmaka .....	11
1.3	Bioanalytik .....	16
1.3.1	Validierung in der Bioanalytik .....	17
1.3.2	Verfahren und Methoden .....	17
1.3.3	Etablierte Analysenverfahren zur Bestimmung von einfachen und Polyphenolen sowie deren Metabolite in Plasma-, Urin- und In-vitro- Assay- Proben .....	24
1.4	Freisetzung phenolischer Wirkstoffe aus ihren Konjugaten am Wirkort .....	26
1.4.1	Freisetzung von Hydrochinon aus renalen Arbutin-Metaboliten im Harntrakt .....	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1	Chemikalien .....	29
2.2	Referenzsubstanzen und Referenzstandards .....	29
2.3	Weitere Materialien und Geräte .....	30
2.4	HPLC-Systeme .....	31
2.5	Analyse von Quercetin und Quercetinkonjugaten in pflanzlichen und humanbiologischen Matrices .....	32
2.6	Analyse von Procyanidinen in pflanzlichen und biologischen Matrices .....	35
2.7	Analyse von Hydrochinon und Hydrochinonkonjugaten in pflanzlichen und humanbiologischen Matrices .....	37
2.8	Biochemische Methoden .....	38

<b>3 Flavonoide in einer fixen Kombination aus Extrakten von Birkenblätter, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern .....</b>	<b>40</b>
3.1 Bestimmung der Flavonole bzw. Flavonolderivate des Extraktgemisches ...	40
3.1.1 Methodenentwicklung zur Extrakt-Analytik .....	40
3.1.2 Beurteilung der chromatographischen Trennung.....	42
3.1.3 Identifikation der Polyphenole in einer fixen Kombination aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern.....	43
3.1.4 Validierung.....	47
3.2 Bioanalytik .....	49
3.2.1 Detektion von Quercetin in Humanplasma nach Hydrolyse der Konjugate .....	50
3.2.2 Detektion von Quercetin in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate ...	51
3.2.3 Validierung der bioanalytischen HPLC-CAD Methode zur Bestimmung von Quercetin in Humanplasma nach Hydrolyse der Konjugate.....	53
3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit.....	57
<b>4 Procyanidine in „Weißdornblätter mit Blüten“ enthaltenden Extrakten und Fertigarzneimitteln.....</b>	<b>61</b>
4.1 Charakterisierung der Crataegus-Präparate .....	61
4.1.1 Photometrische Gehaltsbestimmung von Procyanidinen nach Umsetzung mit DMAZA .....	61
4.1.2 Bestimmung mono-, di- und trimerer Procyanidine mittels HPLC-Nachsäulenderivatisierung .....	63
4.1.3 Gehaltsberechnung .....	63
4.2 Validierung der Methoden zur Bestimmung von Procyanidinen in Crataegus-Extrakten und –Fertigprodukten .....	66
4.2.1 Validierung einer Methode zur Photometrischen Gehaltsbestimmung von Procyanidinen nach Umsetzung mit DMAZA .....	66
4.2.2 Validierung einer Methode zur HPLC-NSD Bestimmung von mono-, di- und trimeren PC.....	68
4.3 Bioanalytik .....	73
4.3.1 LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Procyanidinen in Humanplasma .....	73

---

4.3.2	Bestimmung von Procyanidinen in Humanplasma mittels LC-MS/MS .....	74
4.4	Übertragung der LC-MS/MS Methode von der Bioanalytik auf die (Phyto)analytik in Crataegus-Fertigpräparaten .....	76
<b>5</b>	<b>Analyse phenolischer Inhaltsstoffe aus Bärentraubenblätter-Extrakt enthaltenden Fertigarzneimitteln in Urin.....</b>	<b>78</b>
5.1	Methodenentwicklung .....	78
5.1.1	Biochemische Synthese des Standards Hydrochinonglucuronid .....	78
5.1.2	Coulometrische Array Detektion von Hydrochinon und Hydrochinon- Konjugaten .....	79
5.1.3	Einfluss des Lösungsmittels und der Analyt-Konzentration auf die Eigenschaften des Voltammogrammes .....	80
5.1.4	Software-gestützte Methodenentwicklung .....	84
5.1.5	Validierung der Methode zur Quantifizierung von Hydrochinon in Human-Urin .....	87
5.2	Bioverfügbarkeitsuntersuchungen.....	92
<b>6</b>	<b>Detektion von Quercetinglucuroniden nach oraler Gabe von Zwiebelmus .95</b>	<b>95</b>
6.1	Methodenentwicklung .....	95
6.1.1	Einfluss des Verfahrens zur Ionenerzeugung .....	95
6.1.2	Biochemische Synthese authentischer Referenzsubstanzen .....	97
6.1.3	SRM (selected reaction monitoring)-Experimente .....	99
6.2	Bioanalytik .....	102
6.2.1	Detektion der Quercetinglucuronide in Humanplasma.....	102
<b>7</b>	<b>Glucuronidaseaktivität humaner Nabelschnur-Endothel-Zellen (HUVEC In-vitro-Modell) .....</b>	<b>105</b>
7.1	Methodenentwicklung .....	105
7.2	HUVEC-Assay .....	108
7.2.1	Experimentelles Design .....	109
7.2.2	Vitalität der HUVEC-Zellen während des Assays .....	110
7.3	Glucuronidase-Aktivität humaner Endothelzellen.....	110
7.3.1	Einfluss der Zell-Passagen .....	110
7.3.2	Einfluss der Wachstumsfaktoren RDGF und fKS.....	111
7.3.3	Dekonjugation von Quercetin-3-O-glucuronid im HUVEC-In-vitro-Model	113

7.4	Aufnahme der Aglykone in das Endothelgewebe .....	114
7.4.1	Methylumbelliferon (MUB) .....	114
7.4.2	Quercetin .....	115
7.4.3	Lokalisierung der Glucuronidase-Aktivität.....	115
7.4.4	Aufnahme oder Adsorption der Aglykone .....	117
7.4.5	Präzision des HUVEC-Assay.....	118
7.5	Validierung der Analytik .....	119
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>146</b>
<b>10</b>	<b>Summary.....</b>	<b>150</b>
<b>11</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>154</b>
<b>12</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>170</b>
<b>13</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>176</b>

# 1 Einführung

Analytische Methoden und Verfahren sind grundlegende Werkzeuge zur Gewährleistung der Arzneimittelqualität und –sicherheit - sowohl im Bereich der chemisch definierten, als auch in dem der pflanzlichen Arzneimittel. Dabei verweisen die einschlägigen Verordnungen sowie Richt- und Leitlinien darauf, dass die angewandten Methoden dem „aktuellen Stand der Wissenschaft“ entsprechen und validiert sein müssen. Aus dieser eher allgemeinen Formulierung ergibt sich jedoch die Notwendigkeit neue analytische Methoden und Verfahren zu entwickeln, und bestehende ständig kritisch zu hinterfragen und weiterzuentwickeln. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Analysemethoden für spezielle Problemstellungen in der Phytotherapie und Bioanalytik zu erarbeiten, sowie bestehende Verfahren kritisch zu betrachten und ggf. zu modifizieren. Die Methoden sollten darüber hinaus zur Bearbeitung von exemplarischen Fragestellungen verwendet werden.

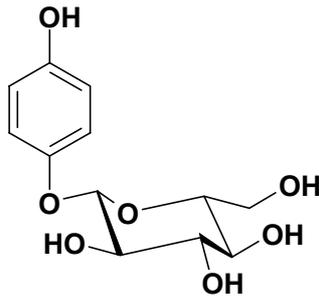
## 1.1 Untersuchte Stoffe und deren pharmazeutische Verwendung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden u.a. Methoden zur Analyse von Substanzen entwickelt, die wertbestimmend in pharmazeutisch verwendeten Halbfertigwaren und Fertigprodukten sind. Im einzelnen wurden folgende ausgewählte Stoffe und Stoffgruppen untersucht:

### **Arbutin aus Bärentraubenblättern**

Einfache Phenole kommen in einigen Arten der Familien Rosaceae, Saxifragaceae und Ericaceae überwiegend als Glykoside vor (Schneider 1990). Das Phenolglykosid Arbutin (Abbildung 1) ist Leitsubstanz und wertbestimmender Bestandteil der Arzneidroge „Bärentraubenblätter“ (*Uvae ursi folium*).

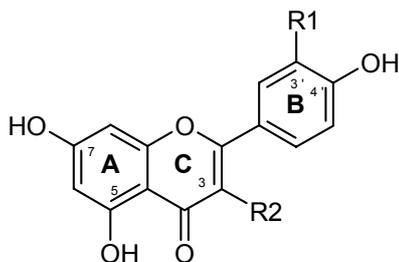
Die Droge ist von der ESCOP (The European Scientific Cooperative on Phytotherapy) und im Europäischen Arzneibuch (Ph.Eur. 2000) monographiert. Die ESCOP-Monographie nennt dabei als therapeutische Indikation die Behandlung der unteren ableitenden Harnwege bei unkomplizierten Infektionen, die keine Antibiotikatherapie erfordern.



**Abbildung 1:** Struktur von O-(β-D-Glucosyl)-hydrochinon (Arbutin).

### Quercetin und Quercetinglykoside

Flavonoide (Abbildung 2) sind ubiquitär im Pflanzenreich vorkommende Polyphenole. Aus einer geringeren Zahl von Aglykonen leiten sich mehr als 4000 Glycoside ab. Diese Polyphenole stellen eine der bedeutendsten und größten Gruppen der bekannten Pflanzeninhaltsstoffe dar (Harborne 1988). Flavonoide und ihre Glycoside sind Bestandteil unserer täglichen Diät und werden in großen Mengen aufgenommen. Flavonoidführende Arzneidrogen wie z.B. Birkenblätter, Goldrutenkraut oder Orthosiphonblätter, sind im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) monographiert. Als Indikationen für die flavonoidführenden Teedrogen des Ph. Eur. werden die Steigerung der Harnmenge bei der Durchspülungstherapie und die Verwendung als schwaches Diuretika genannt.

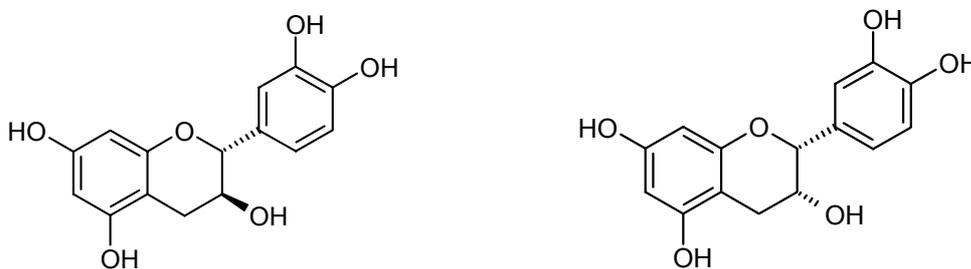


**Abbildung 2:** Struktur ausgewählter Flavon- (R2 = H) und Flavonol-Aglykone (R2 = OH): Quercetin (R1 = OH, R2 = OH), Kämpferol (R1 = H, R2 = OH), Isorhamnetin (R1 = OCH<sub>3</sub>, R2 = OH), Luteolin (R1 = OH, R2 = H).

Speziell das Flavonol Quercetin ist in den letzten Jahren aufgrund seines weitverbreiteten Auftretens, seiner Vielfalt an Zucker-Konjugaten und seiner pharmakologischen Eigenschaften an die Stelle einer „Modellsubstanz“ für die Stoffgruppe der Flavonoide gerückt.

### Procyanidine aus Weißdorn

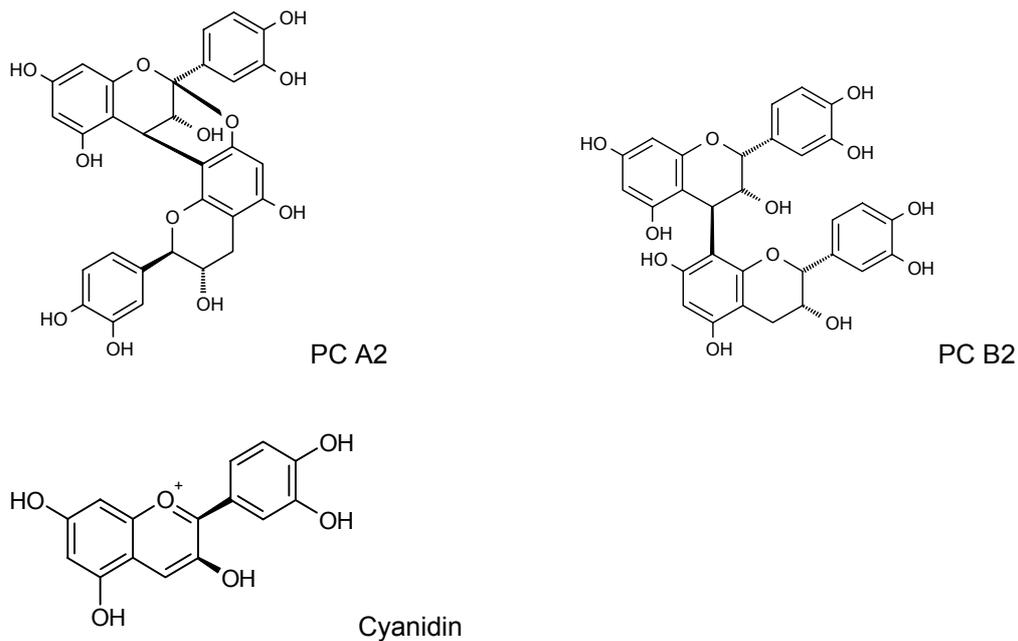
Eine weitere pharmazeutisch interessante Untergruppe der Flavonoide ist die der Flavan-3-ole. Die Monomere Catechin und Epicatechin (Abbildung 3) bilden oligomere ( $n = 2-8$ ) bzw. polymere ( $n > 8$ ) Strukturen, die als Procyanidine bezeichnet werden. Zur Gruppe der "Proanthocyanidine" gehörend, werden Procyanidine als Substanzen definiert, die nach Säurebehandlung unter Spaltung einer labilen C-C-Bindung farbige Anthocyanidine (Abbildung 4) bilden (Freudenberg and Weinges 1960) (Porter 1989a) (Porter 1989b).



**Abbildung 3:** Struktur der Diastereomeren Catechin und Epicatechin.

Procyanidine kommen in den meisten Pflanzen unglykosidiert und als Gemisch vor. Sie unterscheiden sich in ihrer Stereochemie, im Polymerisations-Grad und in der Art der Interflavan-Verknüpfung.

Letztere bildet die Grundlage zur Differenzierung zwischen z.B. der A-Reihe (doppelt verknüpft) und B-Reihe (einfach verknüpft). Procyanidine der A- und B- Reihe (Abbildung 4) sind neben den Flavonoiden die wertbestimmenden Bestandteile des Weißdorns (*Crataegus spec.*). In das Ph. Eur. sind die Monographien „Weißdornblätter mit Blüten“ und „Weißdornfrüchte“ aufgenommen worden. *Crataegus*-Präparationen finden ihre therapeutische Anwendung im wesentlichen bei Herzinsuffizienz (Stadium II NYHA), koronarer Herzerkrankung und Herzrhythmusstörungen leichteren Grades.



**Abbildung 4:** Struktur des PC A2 (A-Reihe), PC B2 (B-Reihe) und des Anthocyanidins Cyanidin.

### Wirkung und Wirksamkeit

Arbutin, Procyanidine, Flavonoide und Flavonoidglycoside zeigten in unterschiedlichen *In-vitro*-Testsystemen verschiedene Wirkungen. Tabelle 1 gibt nur eine Auswahl der relevanten Publikationen zu diesem Thema wieder. Für Flavonoid-Aglyka stellt sich dabei die Datenlage am besten dar. Die *in-vitro* gezeigten Wirkungen können aber nicht isoliert gesehen werden, sondern müssen mit *In-vivo*-Daten zur Wirksamkeit korreliert werden.

Dabei kann Wirksamkeit zum einen durch klinische Studien, zum anderen durch kontrollierte Anwendungsbeobachtungen gezeigt werden. Diesbezügliche Daten sind für die Procyanidine nur in Weißdorn-Zubereitungen und für Flavonoidderivate in Buchweizenkraut verfügbar (Tabelle 1). Für Flavonoidderivate existieren auch epidemiologische Beobachtungen (Hertog, Feskens *et al.* 1993) (Hertog, Sweetnam *et al.* 1997) (Keli, Hertog *et al.* 1996) (Knekt, Jarvinen *et al.* 1996) (Rimm, Katan *et al.* 1996).

**Tabelle 1:** Wirkung und Wirksamkeit ausgewählter Stoffe und Stoffgruppen

pharmakologische Aktivität	Arbutin (Hydrochinon)	Procyanidine	Flavonoide	Flavonoidkonjugate
antimikrobielle Wirkung	(Paper, Koehler <i>et al.</i> 1993), (Siegers, Siegers <i>et al.</i> 1997)			
antiinflammatorisch			(Shimoi, Saka <i>et al.</i> 2000), (Middleton and Chitan 1992), (Middleton and Kandaswami 1994)	
anticancerogen			(De, Chakraborty <i>et al.</i> 2000), (Ishikawa and Kitamura 2000), (Middleton and Kandaswami 1994)	
antioxidativ		(Teissedre, Frankel <i>et al.</i> 1996), (Terao 1999), (Prior and Cao 1999), (Bahorun, Gressier <i>et al.</i> 1996)	(Middleton and Kandaswami 1994), (Williamson, Plumb <i>et al.</i> 1996) (Rice-Evans, Miller <i>et al.</i> 1997)	(Boyle, Dobson <i>et al.</i> 2000), (Morand, Crespy <i>et al.</i> 1998), (Miyake, Shimoi <i>et al.</i> 2000), (Williamson, Plumb <i>et al.</i> 1996)
<b>klinische Wirksamkeit</b>				
ödemprotectiv (Buchweizenkraut – Rutin)			(Koscielny, Radtke <i>et al.</i> 1996), (Ihme, Kieseewetter <i>et al.</i> 1996)	
positiv inotrop (Weisdorn-Spezial-Extrakt)		(Weigl, Assmus <i>et al.</i> 1996), (Holubarsch, Colucci <i>et al.</i> 2000), (Leuchtgens 1993), (Brixius, Frank <i>et al.</i> 1998)		

## 1.2 Analytik zur Qualitätskontrolle von Arzneidrogen, Extrakten und Phytopharmaka

### 1.2.1 Regularien

Die Anforderungen an die pharmazeutische Qualität von Arzneidrogen, pflanzlichen Halbfertigwaren und Fertigprodukten sind weltweit in verschiedenen Leitlinien festgelegt. Abhängig vom angestrebten Zulassungsgebiet sind für den pharmazeutischen Unternehmer unterschiedliche Regularien relevant. Aktuelle Leitlinien sind z.B. für die USA der „Draft-Guidance for Industry – Botanical Drug Products“ der FDA (FDA: Food and Drug Administration) (FDA and CDER 2000a) und für Europa die „Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products“ (EMA, CPMP *et al.* 2000). Obwohl teilweise noch im Entwurfs-Stadium, markieren diese Dokumente die aktuellen Anforderungen an die Qualität pflanzlicher Rohstoffe und Zubereitungen und sind damit richtungsweisend für Behörden und Pharmazeutische Unternehmer. Im Zuge der Globalisierung des Marktes gibt es

internationale Bemühungen der ICH (ICH: International Conference on Harmonization) an einheitlichen Definitionen sowie Leit- und Richtlinien.

Für Phytopharmaka und ihre pflanzlichen Ausgangsstoffe gelten in Deutschland die Bestimmungen des Arzneimittelgesetzes (AMG). Die Anforderungen an Phytopharmaka bezüglich Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und pharmazeutischer Qualität entsprechen dabei denen der Arzneimittel mit chemisch definierten Inhaltsstoffen. Die pharmazeutische Qualität von Phytopharmaka bzw. deren Ausgangsmaterialien schließt u.a. die Chargenkonformität bezüglich des Gehaltes und des Inhaltsstoff-Musters ein.

Zu Arzneidrogen, Halbfertigwaren und Fertigprodukten geben § 26 AMG bzw. die Arzneimittelprüfrichtlinien den zulassungsrechtlichen Rahmen für Art und Umfang durchzuführender Prüfungen an. Für Ausgangsstoffe (Drogen) und Halbfertigwaren (Extrakte) können ggf. auch Arzneibuchmonographien relevant sein. Die weitgehend allgemein gehaltenen Richtlinien fordern u.a. eine Gehaltskonformität für das Fertigerzeugnis sowie valide, analytische Verfahren, die dem „aktuellen Stand der Wissenschaft“ entsprechen.

### *1.2.2 Validierung in der Qualitätskontrolle*

Um die in den jeweiligen Regularien geforderte Pharmazeutische Qualität für Drogen, Halbfertigwaren und Fertigprodukte kontrollieren zu können, sind geeignete Analysenverfahren notwendig. Ob ein Analysen- bzw. Prüfverfahren für seine Aufgabe geeignet ist, kann und muss über eine Validierung nachgewiesen werden.

Bei der Validierung eines Verfahrens werden im wesentlichen die systematischen und zufälligen Fehler eines Verfahren oder einer Methode bestimmt. Ähnlich den Regularien zur Pharmazeutischen Qualität existieren Leitlinien, die sich mit der Validierung von analytischen Methoden befassen. Die ICH hat dazu zwei Leitlinien veröffentlicht. In einer ersten werden einzelne Validierungs-Parameter (Tabelle 2) aufgelistet und Begriffe definiert (Q2A, (ICH 1995)). Die zweite macht Vorschläge zu deren Umsetzung (Q2B, (ICH 1996)).

**Tabelle 2:** Validierungsanforderungen nach ICH (Q2A) und \*FDA (Guidance for Industry (Draft) – Analytical Procedures and Methods Validation).

analytisches Verfahren Validierungs-Parameter	qualitative Bestimmung	Test auf Verunreinigung		quantitative Bestimmung
		quantitativ	Grenzwertest	
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision				
Wiederholpräzision	-	+	-	+
Vergleichspräzision	-	+	-	+
Spezifität	+	+	+	+
Detektionsgrenze (LOD)	-	-	+	
Bestimmungsgrenze (LOQ)	-	+	-	
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+
Robustheit *				

Die von der ICH geforderten Validierungs-Parameter sind als Mindestanforderungen zu betrachten. So ist in der zeitlich später veröffentlichten Guideline der FDA (Food and Drug Administration; Draft-Guidance for Industry – Analytical Procedures and Methods Validation, (FDA and CDER 2000b)) zusätzlich zu den ICH-Leitlinien der Validierungs-Parameter Robustheit aufgenommen und die Notwendigkeit der Durchführung von Systemeignungs-Tests aufgezeigt worden. Den Umfang des zu betreibenden Validierungs-Aufwandes bestimmen im Einzelfall immer das angewendete analytische Verfahren und der Verwendungszweck der Methode.

Die Beurteilung der „Güte“ eines analytischen Verfahrens liegt im wesentlichen im Ermessen des Analytikers. Die existierenden Leitlinien geben in der Regel keine Grenz- bzw. Richtwerte für die einzelnen Validierungs-Parameter an. Eine Orientierung für Zulassungs-Behörden und Analytiker in Nordamerika gibt ein Leitfadens für Gutachter der FDA (Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods, (FDA and CDER 1994)). Hier werden Richtwerte für einzelne Validierungs-Parameter (z.B. Präzision) zu chromatographischen Methoden aufgeführt.

Diese Richtwerte sind aus den Erfahrungen der Analyse chemisch definierter Wirkstoffe hervorgegangen und werden derzeit auch auf die Validierung von Verfahren zur Naturstoffanalyse angewendet. Aufgrund der oft sehr komplexen Stoffgemische kann die Einhaltung dieser Validierungs-Richtwerte für die Analyse von Arzneidrogen, Extrakten und Phytopharmaka jedoch problematisch sein.

### 1.2.3 Verfahren und Methoden

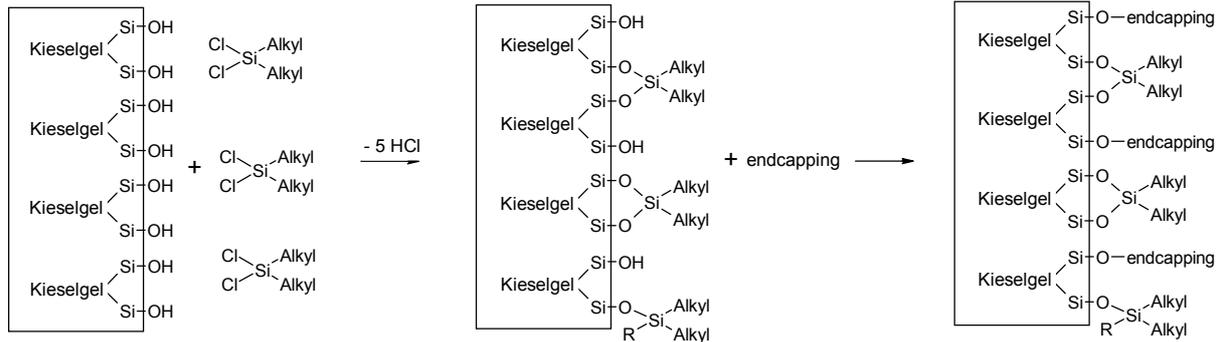
Zur Analyse von Flavonoid- oder Procyanidin- führenden Arzneidrogen werden in der Qualitätskontrolle Trenntechniken wie Dünnschicht-Chromatographie (DC), Kapillarelektrophorese (CE) (Kenndler and Schwer 1990) (Canalon and Bryan 1993), Gaschromatographie (GC) (Deisinger, Hill *et al.* 1996) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) genutzt. Die Arzneibücher verwenden DC-Methoden zur qualitativen Beurteilung der Qualität von Arzneidrogen, da diese ohne großen apparativen Aufwand durchführbar und in der Probenaufarbeitung und -analyse einfach und schnell sind.

Auf DC-, CE- und GC- Methoden soll hier nicht näher eingegangen werden.

#### **HPLC-Analyse polyphenolhaltiger Extrakte und Phytopharmaka**

Das Verfahren der HPLC hat sich zum Standardverfahren bei der Analyse von einfachen Phenolen und Polyphenolen entwickelt. Dabei werden die Analyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen mobiler Phase (Fließmittel) und stationärer Phase (Säulen-Packmaterial) getrennt.

Einfache- und Polyphenole werden vor allem nach einem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie – der Umkehrphasen-Chromatographie (RP, reversed phase) - getrennt. Dabei werden chemisch modifizierte stationäre Kieselgel-Phasen verwendet. Bei der Modifikation wird die ursprünglich polare Oberfläche des Trägers (z.B. Silanolgruppen) durch Umsetzung mit Alkylreagenzien wie Octylgruppen (C8-Material) oder Octadecylgruppen (C18-Material) hydrophobisiert (Abbildung 5). Die Umsetzung ist technisch bedingt nicht vollständig, so dass immer freie polare Silanolgruppen verbleiben. Diese freien Gruppen können durch verschiedene Materialien substituiert werden (endcapping, Abbildung 5). Je nach Umfang und Art der Substitution haben die resultierenden „endcapped“-Trägermaterialien unterschiedliche Trenneigenschaften. Relativ neu ist ein Endcapping-Substituent, der das bei C18-Phasen übliche Kollabieren der Alkanketten bei 100 % wässriger Phase verhindert (Material Aqua<sup>®</sup>). Damit ergeben sich neue Möglichkeiten zur Analyse von stark polaren Substanzen in wässrigen Lösungen.



**Abbildung 5:** Herstellung von RP-Trägermaterialien und deren „endcapping“ (schematisch).

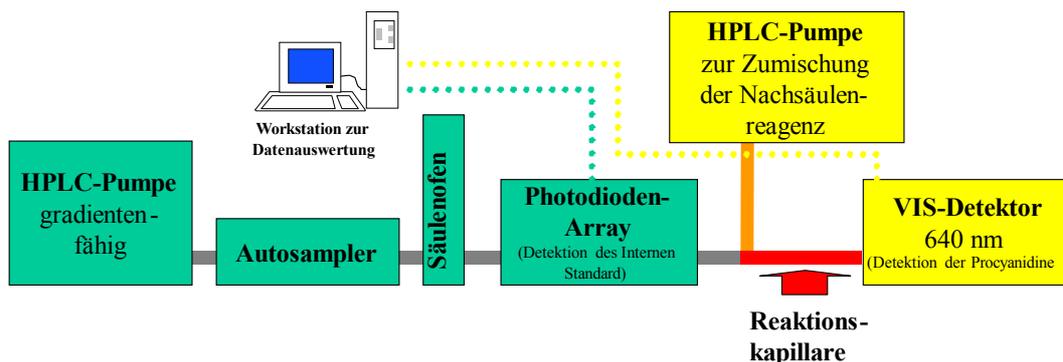
Die Beschaffenheit der stationären Phase kann in einigen Fällen jedoch auch den Zugang zu Analyten limitieren. So können mit Hilfe der RP-HPLC z.B. lediglich Procyanidine bis zu einem Polymerisationsgrad von drei oder vier als saubere Peaks abgetrennt werden. Höher oligomere und polymere Verbindungen unterliegen sehr starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase, was zu einem extremen Leading bzw. Tailing der betreffenden Peaks führt. Diese Substanzen „schmier“ über die Säule, und können nicht oder nicht fehlerfrei quantifiziert werden (Rohr 1999), (Stafford and Lester 1980), (Putman and Butler 1989).

Die Qualität einer Trennung wird ebenfalls durch die Wahl der mobilen Phase beeinflusst. Bei der RP-Adsorptions-Chromatographie verhält sich die Elutionskraft der Fließmittel umgekehrt der elutropen Reihe. Für die Trennung von Phenolen werden meist Wasser-Gemische mit Methanol oder Acetonitril verwendet. Dabei setzt man der Wasserphase oft Puffer oder Säuren zu, um pH-Werte zwischen 2 und 6 zu erreichen. Damit wird das Dissoziationsgleichgewicht der Phenole mehr oder weniger in die protonierte Form gedrängt, woraus unterschiedliche Polarität bzw. Trennverhalten resultieren.

### **Detektion von Procyanidinen mit UV-VIS-Detektoren mit und ohne Derivatisierung**

Polyphenole, wie z.B. Procyanidine (PC), besitzen aufgrund mindestens eines Benzol-Ringsystems ein durch UV-Licht anregbares  $\pi$ -Elektronensystem. Die Detektion dieser Phenole mit UV/VIS-Detektoren ist damit Methode der Wahl. Phenole haben, abhängig vom Substitutionsmuster Absorptionsmaxima zwischen 200 und 270 nm. Zusammengesetzte Polyphenole, wie z.B. Flavonoide oder PC,

haben ein zweites Chromophor und damit ein weiteres Absorptionsmaximum. Durch die vinyloge Verknüpfung des A- und C-Ringes involviert das zweite Chromophor mehr  $\pi$ -Elektronenorbitale und adsorbiert zwischen 300 und 400 nm. Dieses wird in der Praxis häufig zur Detektion genutzt. Je länger die Messwellenlänge ist, desto selektiver ist die Detektion für die hier betrachteten Phenole in pflanzlichen Matrices. Bei konventioneller Bestimmung von in Extraktgemischen enthaltenen PC mittels HPLC-PDA werden deren Signale bei Wellenlängen bis ca. 400 nm von Phenolsäuren und Flavonoid-Derivaten überlagert, was eine aufwendige und für die PC sehr verlustreiche Probenaufarbeitung notwendig macht. Durch Derivatisierung von Phenolen aber kann eine bathochrome Verschiebung der Absorptionswellenlänge erreicht werden. Bei PC führt das durch eine Umsetzung mit 4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 640 nm.



**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau der Messanordnung zur Detektion von Procyanidinen bei 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA.

Damit ist im VIS-Bereich eine selektivere Bestimmung von PC bzw. deren Oligomeren möglich. Darauf aufbauend etablierten Treuter *et al.* (Treutter, Santos-Buelga *et al.* 1994) eine Messanordnung zur Bestimmung von PC in Organen verschiedener Obstgewächse. Abbildung 6 stellt diese schematisch dar. Mit Hilfe der Messanordnung von Treuter *et al.* war es möglich, die PC ohne aufwendige Vorfraktionierung direkt aus dem Extrakt selektiv zu detektieren.

#### 1.2.4 Etablierte Prüfverfahren für die untersuchten Stoffgruppen in Arzneidroge und daraus hergestellten Halbfertigwaren und Phytopharmaka

Zur quantitativen Analyse von Flavonoid- bzw. Procyanidin-führenden Arzneidroge schreiben die Arzneibücher Gruppenbestimmungen vor. Vorteile und Probleme dieses Verfahrens sollen am Beispiel der Procyanidin-Gehaltsbestimmung aufgezeigt werden.

#### Gruppenbestimmungen für Procyanidine

Die in der Literatur beschriebenen photometrischen Methoden zur Quantifizierung der Procyanidine basieren hauptsächlich auf den folgenden drei Prinzipien:

- Bildung von Anthocyanidinen in butanolischen Salzsäurelösungen (**Cyanidin-Reaktion**),
- Reaktion der Procyanidine mit Vanillin (**Vanillin-Reaktion**),
- Reaktion der Procyanidine mit 4-Dimethylaminozimtaldehyd (**DMAZA-Reaktion**).

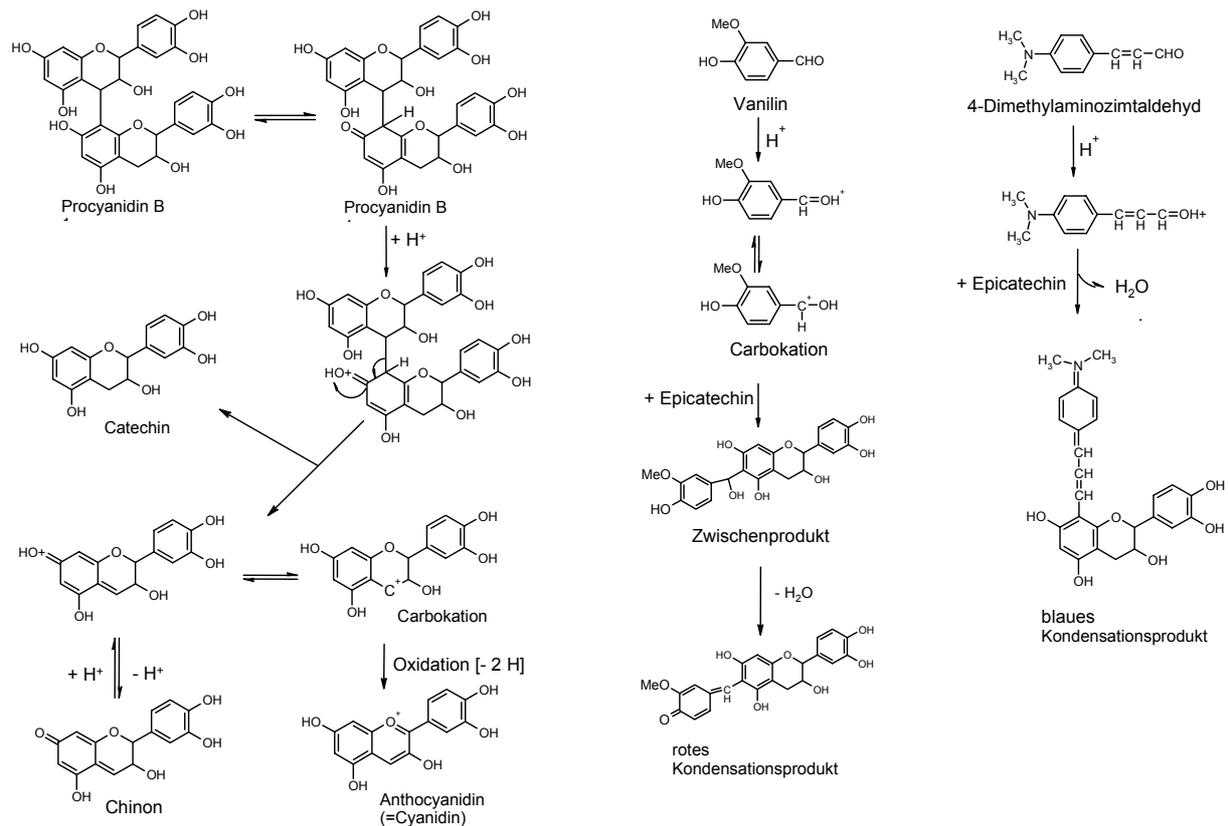
Das Europäische Arzneibuch quantifiziert oligomere Procyanidine in der Monographie „Weißdornfrüchte“ über eine spektrophotometrische Konventionemethode auf der Basis der **Cyanidin-Reaktion**. Procyanidine werden im Sauren gespalten und bilden Carbokationen und Flavan-3-ole. Die Carbokationen werden durch Autoxidation sofort zum rotgefärbten Cyanidin (Abbildung 7) umgewandelt, welches bei 545 nm photometrisch bestimmt wird.

Über die Stöchiometrie der Reaktion ist wenig bekannt. Theoretisch ergibt sich für die Dimere eine Ausbeute von 50% da nur ein Carbokation gebildet wird (Abbildung 7). Vermutlich werden aber nur 25% der in den Procyanidinen enthaltenen Dimere (Rohr and Meier 1997) und nur 10% der Catechine (Meier and Linnenbrink 1996) zu Cyanidin umgewandelt. Die polymeren Procyanidine aber bilden mehr Anthocyanidine als die Dimere, da ein Polymer eine größere Anzahl an Carbokationen liefert als ein Dimer. Die Ausbeute in der Probenlösung und die Kinetik der Reaktion sind also u.a. von PC-Struktur (Bate-Smith 1975) und dem verwendeten Lösungsmittel (Tabelle 3) abhängig (Bate-Smith 1975) (Hiermann, Kartnig *et al.* 1986) (Porter, Hrstich *et al.* 1986).

Bei der **Vanillin-Reaktion** werden in stark sauren Lösungen Aldehyde am Carbonylsauerstoff protoniert und elektrophile Carbokationen gebildet. Substituierte vinyloge Benzaldehyde wie Vanillin zeigen aufgrund der Delokalisation der positiven Ladung eine verminderte Elektrophilie und reagieren mit den Phenolen, die ein dem Phloroglucinol oder Resorcinol entsprechendes Oxidationsmuster aufweisen. Nach Wasserabspaltung entsteht ein rotes Kondensations-Produkt, das bei 500 nm photometrisch vermessen werden kann. Vanillin reagiert aber auch mit anderen elektronenreichen Heteroatomen, Dihydrochalconen und Catechingerbstoffen. Die Reaktion ist stark abhängig von der Matrix, der Reaktionstemperatur und -dauer (Rohr 1999), (Leipolz 1999), (Butler, Price *et al.* 1982), (Lang 1996), (Sarkar and Howarth 1976).

Eine andere Methode zur Gruppenbestimmung verwendet Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) (Mc Murrough 1978), mit dem die Procyanidine blaue Reaktionsprodukte bilden, die selektiv bei 640 nm vermessen werden können. Das Reaktionsschema für die **DMAZA-Reaktion** ist identisch dem der Vanillin-Reaktion (Abbildung 7). Im Gegensatz zu Vanillin reagiert DMAZA allerdings nur mit den terminalen Einheiten der Procyanidine. Die Absorption der Reaktionsprodukte hängt von der Stereochemie an C2 und C3 ab. Komponenten mit einer 2,3-*cis*-Konfiguration zeigen eine stärkere Reaktivität als die mit einer 2,3-*trans*-Konfiguration. Deswegen ergibt sich für Epicatechin eine stärkere Farbentwicklung als für Catechin.

Wie Vanillin reagiert auch DMAZA mit anderen phenolischen Komponenten. Der große Vorteil des DMAZA gegenüber Vanillin ist jedoch die höhere Empfindlichkeit gegenüber Procyanidinen. Wegen der weitaus höheren Affinität von DMAZA zu Flavan-3-olen kann man davon ausgehen, dass die DMAZA-Reaktion für Procyanidine die selektivere und sensitivere Nachweismethode darstellt. Zudem ist der Versuchsablauf der DMAZA-Reaktion unkomplizierter und in der Handhabung einfacher. Die Experimente können z.B. bei Raumtemperatur ohne strikte Temperatur-Kontrolle ablaufen (Rohr 1999).



**Abbildung 7:** Umwandlung eines Procyanidins zum roten Anthocyanidin im sauren Medium (links) sowie Kondensationsreaktion von Epicatechin mit Vanillin (mitte) und 4-Dimethylaminozimtaldehyd (rechts).

Ein generelles Problem bei Gruppenbestimmungen der Procyanidine ist die Wahl des geeigneten Kalibrierstandards. Das Ph.Eur. gibt z.B. für seine Konventionmethode zur Bestimmung des Procyanidingehaltes in Weißdornfrüchten eine spezifische Absorption des Cyanidin von  $A_{1cm}^{1\%} = 75$  an. Nachdem man aber für die verschiedenen Procyanidine im Extrakt völlig unterschiedliche Anthocyanidin-Ausbeuten erhält, muss die Verwendung von Cyanidinchlorid als Standard viel zu niedrige Gehalte geben.

Unabhängig davon wird die im Ph. Eur. für Cyanidin angegebene spezifische Absorption von  $A_{1cm}^{1\%} = 75$  kontrovers diskutiert (Rohr 1999), (Rohr and Meier 1997), (Leipolz 1999). Sie scheint eine fiktive Größe zu sein, liefert aber mit dem angegebenen Wert plausible Resultate. Eine Bestimmung der realen spezifischen

Absorption des Cyanidins unter Methoden-Bedingungen liefert Werte um  $A_{1cm}^{1\%} = 1000$  (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Spezifische Absorptionskoeffizienten von Procyanidinen und Cyanidinen nach Umwandlung zu Anthocyanidin im sauren Medium.

Komponente	$A_{1cm}^{1\%}$	Lösungsmittel	Literatur
Cyanidinchlorid	75	nicht angegeben	(Ph.Eur. 1999)
Cyanidinchlorid	1027	analog Ph. Eur.-Vorschrift*	(Rohr and Meier 1997)
Procyanidin B2	90 – 106	BuOH / 5 % HCl	(Bate-Smith 1975)
Procyanidin B1	270	BuOH / 5 % HCl	(Porter, Hrstich <i>et al.</i> 1986)
Procyanidin B3	280	BuOH / 5 % HCl	(Porter, Hrstich <i>et al.</i> 1986)
Procyanidin B7	225	BuOH / 5 % HCl	(Porter, Hrstich <i>et al.</i> 1986)
Procyanidin B1, B3, B4 (Mischung)	136	BuOH / 5 % HCl	(Bate-Smith 1975)
Procyanidin vom A-Typ	ca. 600	BuOH / 5 % HCl	(Bate-Smith 1975)
Trimere	170	BuOH / 5 % HCl	(Bate-Smith 1975)
Tetramere	140-180	BuOH / 5 % HCl	(Bate-Smith 1975)
oligomere Procyanidine	43	BuOH / 5 % HCl	(Foo 1982)
polymere Procyanidine	172	BuOH / 5 % HCl	(Foo 1982)
polymere Procyanidine	450 – 490	BuOH / 5 % HCl	(Porter, Hrstich <i>et al.</i> 1986)

\*nach Ph.Eur- Vorschrift findet die Umwandlung zu Anthocyanidinen zunächst mit 70 % Ethanol und 10 % HCl statt, anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen und die Absorption in BuOH gemessen.

Der Einsatz von isolierten Procyanidinen oder Procyanidin-Fractionen als Referenzsubstanzen könnte Ergebnisse liefern, die dem tatsächlichen Gehalt an Procyanidinen in der Probe näherkommen.

### Selektive Analyse von Flavonoiden und Procyanidinen in Arzneidrogen, Extrakten und Phytopharmaka durch HPLC mit UV/VIS Detektion

Die publizierten Arbeiten zur HPLC-Analytik von PC (Krawczyk, Petri *et al.* 1991; Leipolz 1999; Rohr, Meier *et al.* 1999 a) beziehen sich im wesentlichen auf die Bestimmung in Arzneidrogen wie Weißdorn oder Johanniskraut. Zur Bestimmung von PC in Drogenzubereitungen enthaltenden Fertigpräparaten ist keine der Methoden angewendet und validiert worden.

Ähnlich ist die Datenlage zur Flavonoid-Analytik. Diverse Methoden zur Analyse von Arzneidrogen und deren Halbfertigwaren wurden publiziert (Tabelle 4), aber keine der Publikationen zeigt eine Anwendung auf Phytopharmaka bzw. eine modernen Anforderungen folgende Validierungsstrategie.

**Tabelle 4:** Übersicht über etablierte HPLC-Methoden zur Bestimmung von einfachen und Polyphenolen in Arzneipflanzen-Extrakten (n.a. = nicht angegeben).

System / Phase	Fließmittel A / B / C	Fließmittel- Zusätze zu A bzw. B	Gradientenprofil	Bestimmung von	Detektion / Parameter	Sensitivität [ng·mL <sup>-1</sup> ]	Literatur
HPLC, C 18	Wasser / Methanol	A: 5 % Essigsäure	isokratisch	Procyanidine	254, 280, 365, 546 nm	n.a.	(McMurrugh 1981)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol / Acetonitril	A, B: 1,0 % Essigsäure <sub>4</sub>	konvexer Gradient	Flavonoide	340 nm	n.a.	(Wagner, Tittel <i>et al.</i> 1983)
HPLC, C18	Wasser / Methanol	A, B: 0,3 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	isokratisch (50:59,7)	Rosmariensäure	320 nm	n.a.	(Gracza and Ruff 1984)
HPLC, C18	Wasser / Methanol / Acetonitril	A, B, C: 8,8 % THF, 5 % Essigsäure	isokratisch (89,66: 0,85:0,69)	Flavonoide /-glykoside	254 nm	LOD = 20 LOQ = 50	(Dallenbach-Toelke, Nyiredy <i>et al.</i> 1987)
HPLC, C18	Wasser / 2-Propanol	A, B: pH = 6,2	isokratisch (83:17)	Flavonoide /-glykoside	254 nm	n.a.	(Pietta, Mauri <i>et al.</i> 1989)
HPLC, C8	Wasser / 2-Propanol		isokratisch (86:14)	Flavonoidglykoside		n.a.	(Pietta and Gardana 1991)
HPLC, C18	Wasser / Acetonitril	A, B: 1 % Essigsäure oder H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	linearer Gradient	Flavonoide /-glykoside	340 nm	n.a.	(Sumaryono, Proksch <i>et al.</i> 1991)
HPLC, C18	Wasser / THF	A: 2,5 % Ameisensäure	linearer Gradient	Flavonoide / PC	280 nm	n.a.	(Krawczyk, Petri <i>et al.</i> 1991)
HPLC, C8	Wasser / 1-Propanol	A: 7,5 % THF, 0,6 % Zitronensäure	isokratisch (87,5:12,5)	Flavonoid-Aglyka		n.a.	(Pietta and Gardana 1991)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol / Wasser / Acetonitril	A: 0,025 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	n.a.	Flavonoide /- glykoside	202 – 450 nm	n.a.	(Hertog, Hollman <i>et al.</i> 1992)
HPLC, C18	Wasser / Acetonitril		isokratisch (60:40)	Flavonoide /-glykoside	280 nm	n.a.	(Lyckander and Malterud 1992)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol	A, B: 50nM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Stufengradient	Flavonoide /- glykoside	225 mV	n.a.	(Achilli, Cellerione <i>et al.</i> 1993), (Gamache, Ryan <i>et al.</i> 1993)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol	A: 5 % Ameisensäure	Stufengradient	Procyanidine, Flavonoide	280 nm, nach Derivatisierung 640 nm	n.a.	(Treutter, Santos-Buelga <i>et al.</i> 1994), (Mayr, Treutter <i>et al.</i> 1995)]
HPLC, C 18	Wasser / Methanol / Acetonitril	A: 0,2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	linearer Gradient und isokratisch	Flavonoide /- glykoside	254	LOD ≈ 0,2-30 on column	(Bongartz and Hesse 1995)
HPLC, C18	Wasser / Methanol / Acetonitril	A: 0,2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	isokratisch und linearer Gradient	Flavonoide /- glykoside	254 nm	LOD = 10	(Bongartz and Hesse 1995)
HPLC, C18	Wasser / Methanol	A: 0,15 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Stufengradient	Flavonoide /-glykoside	330 und 350 nm	n.a.	(Veit, Beckert <i>et al.</i> 1995)
HPLC, C18	Wasser / Acetonitril	A: 5 % Ameisensäure	Stufengradient	Flavonoide /-glykoside	360 nm	n.a.	(Ossipov, Nurmi <i>et al.</i> 1996)
HPLC, C18	Wasser / Methanol	A: 2,4 % THF, 0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Stufengradient	Flavonoide /-glykoside	220, 280, 320, 360 nm	n.a.	(Keinänen and Julkunen-Tiitto 1996) (Keinänen and Julkunen-Tiitto 1998)
HPLC, C18, Fluoreszenz	Wasser / Methanol	A: 1 % Essigsäure, 0,035% THF	isokratisch (7:1)	einfache Phenole	λ <sub>ex</sub> : 290 nm, λ <sub>em</sub> : 330 nm	6 ng on column.	(Siegers, Siegers <i>et al.</i> 1997)
HPLC, C 18	Wasser / Acetonitril	A: 2,5 % Essigsäure	Stufengradient	Procyanidine, Flavonoide	350 nm nach Thiolyse	n.a.	(Guyot, Marnet <i>et al.</i> 1998)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol	A: 0,15 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Stufengradient	Procyanidine	640 nm, Derivatisierung mit DMAZA	LOD ≈ 1000-2000	(Leipolz 1999)
HPLC, C 18	Wasser / Methanol	A: 0,5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Stufengradient	Procyanidinen	280 nm und 220 nm	LOD ≈ 5-40 LOD ≈ 3-20	(Rohr, Meier <i>et al.</i> 1999 a)

### 1.3 Bioanalytik

Durch die wachsende Zahl an Bioverfügbarkeitsuntersuchungen (Tabelle 5) besteht ein großer Bedarf an bioanalytischen Methoden. Dabei werden Methoden und Verfahren gefordert, die dem Stand der Wissenschaft entsprechen. Diese müssen sensitiv genug sein, um selbst geringste Substanzspiegel in den terminalen Eliminationsphasen in Konzentrations-Zeit-Verläufen detektieren zu können. Oft müssen bei pharmakokinetischen Untersuchungen auch große Arbeitsbereiche abgedeckt werden. Spezielle Probleme in der Bioanalytik entstehen unter Anderem durch die komplexen Matrizes (Plasma, Urin, etc.).

**Tabelle 5:** Überblick zu Quercetin-Bioverfügbarkeitsstudien der letzten Jahre mit angewandeter Analytik (ECD – elektrochemische Detektion (NSD = Nachsäulenderivatisierung, FD = Fluoreszenz-Detektion, ECD = elektrochemische Detektion, PDA = Photodioden-Array, CAD = coulometrische Array-Detektion).

Studienmedikation	detektierte Metabolite	Plasma-aufbereitung	Analytisches Verfahren	Referenz
Quercetin	Quercetin		PCD mit FD	(Gugler, Leschik <i>et al.</i> 1975)
Rutin	Quercetin	Hydrolyse	photometrisch	(Murgu, Dobrescu <i>et al.</i> 1978)
Ginkgo biloba-Extrakt	Quercetin Kämpferol	Hydrolyse	ECD	(Drieu, Moreau <i>et al.</i> 1985)
Ginkgo biloba-Extrakt	Gesamtflavonole	Hydrolyse	PCD mit FD	(Nieder 1991)
Zwiebel, Rutin, Quercetin	Quercetin	Hydrolyse	PCD mit FD	(Hollman, de Vries <i>et al.</i> 1995)
Quercetin i.v.	Quercetin, Quercetin-metabolite, Kämpferol		PDA	(Liu, Anderson <i>et al.</i> 1995)
Zwiebel	Quercetin	Hydrolyse	PCD mit FD	(Hollman, v.d. Gaag <i>et al.</i> 1996)
Zwiebel, Rutin, Apfel	Quercetin	Hydrolyse	PCD mit FD	(Hollman, van Trijp <i>et al.</i> 1997a)
Normaldiät	Quercetinglykoside		PDA	(Paganga and Rice-Evans 1997)
flavonoidreiche Diät	Quercetin	Hydrolyse	CAD	(Manach, Morand <i>et al.</i> 1998)
Zwiebel	Quercetinkonjugate, Qu-4'-gluc.		PCD mit FD	(Aziz, Edwards <i>et al.</i> 1998)
Zwiebel	Quercetin	Hydrolyse	PCD mit FD	(Janssen, Mensink <i>et al.</i> 1998)
Qu-3-O-gluc., Qu-4'-O-gluc.	Quercetin	Hydrolyse	PCD mit FD	(Olthof, Hollman <i>et al.</i> 1998)
Zwiebel	Quercetin	Hydrolyse	PDA	(McAnlis, McEneny <i>et al.</i> 1999)
Zwiebel und Tomate	Quercetin, Qu-3-gluc., Isorhamnetin-3-gluc.		PDA, PCD mit FD	(Bell, Donovan <i>et al.</i> 2000)
Zwiebel	Quercetin (vor Hydrolyse kein Quercetin)	teilweise Hydrolyse	ECD	(Moon, Nakata <i>et al.</i> 2000)
Zwiebel, Buchweizenkraut, Qu-4'-O-gluc, Rutin	Quercetin, Quercetin-metabolite (vor Hydrolyse kein Quercetin)	teilweise Hydrolyse	CAD	(Graefe, Wittig <i>et al.</i> 2001)

### 1.3.1 Validierung in der Bioanalytik

Aufgrund der eher allgemein gehaltenen Regularien zur Bioanalytik, lag die Entscheidung, eine bioanalytische Methode als geeignet zu erklären weitgehend im Ermessen des Analytikers. Die in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle etablierten Richtwerte für Selektivität, Präzision und Richtigkeit lassen sich in der Bioanalytik oft nicht erfüllen. Gründe dafür sind u.a. die komplexeren Matrizes (Urin, Plasma, etc.) bzw. inhomogene Matrizes (Plasma unterschiedlicher Probanden einer Studie). Dieser Problematik Rechnung tragend, hat das CDER (Center for Drug Evaluation and Research der FDA) im Dezember 1998 einen Leitlinien-Entwurf zur „Bioanalytical Methods Validation for Human Studies“ (FDA and CDER 1998) veröffentlicht. Der rege diskutierte Entwurf (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets>, Docket No.98D-1195) schließt damit eine regulatorische Lücke.

Diese Guideline behandelt u.a. die einzelnen Validierungsparameter unter bioanalytischen Gesichtspunkten. Es werden hier z.B. Richtwerte zu tolerierbaren Fehlertoleranzen bei Bestimmung der Präzision bzw. Richtigkeit gegeben. Ebenso wird der Begriff der Bestimmungsgrenze (LOQ) näher definiert.

### 1.3.2 Verfahren und Methoden

#### **Biochemische Synthese von authentischen Referenzsubstanzen für die Bioanalytik**

Bei der Identifizierung von Substanzen in mehr oder weniger komplexen Stoffgemischen spielen Referenzsubstanzen bzw. -standards eine Schlüsselrolle. Eine eindeutige Zuordnung von Substanzsignalen ist ohne Vergleich mit einer Referenz mit analytisch abgesicherter Identität nur unter großem instrumentellen Aufwand möglich. Besonders in der Bioanalytik besteht, aufgrund der komplexen Zusammensetzung der hier untersuchten Körperflüssigkeiten (Plasma, Urin, Gewebehomogenisate), ein Bedarf an geeigneten Referenzen. Diese sind in den meisten Fällen nicht zugänglich.

In der Phyto-Analytik werden nicht kommerziell verfügbare Referenzsubstanzen üblicherweise aus Pflanzen isoliert, die diese in ausreichenden Mengen enthalten. In der Bioanalytik ist diese Methodik der Extraktion nur sehr begrenzt möglich. Gründe dafür sind die niedrige Konzentration der gesuchten Stoffe in den Körperflüssigkeiten und die geringe Menge an Ausgangsmaterial (Plasma) für eine Isolierung.

Eine Lösung des Problems bietet die biochemische *In-vitro*-Synthese. Da die gesuchten Referenzsubstanzen fast ausschließlich Metabolite aus enzymatischen Prozessen sind, können diese Umsetzungen u.U. auch *in-vitro* durchgeführt werden. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit der beteiligten Enzyme und Substrate.

Auf diesem Wege können z.B. durch Umsetzung mit aktivierter Glucuronsäure, unter Beteiligung einer  $\beta$ -Glucuronyltransferasen (z.B. isoliert aus Schnecken oder Hasenleber), Glucuronide einer Substanz *in-vitro* synthetisiert werden. Konjugate der Glucuronsäure sind neben denen der Schwefelsäure die wichtigsten Phase II-Metabolite von Xenobiotika *in-vivo*, und damit häufig in der Bioanalytik benötigte Referenzsubstanzen.

Die aus einer *In-vitro*-Synthese erhaltenen Produkte sind zunächst fast immer Substanzgemische. Ursache hierfür kann z.B. die Bildung verschiedener Produkte durch die eingesetzten Enzyme sein. Ebenso müssen bei Einsatz von Enzymisolaten Verunreinigungen mit anderen biochemisch aktiven Proteinen in Kauf genommen werden. Deshalb ist bei biochemisch synthetisierten Referenzsubstanzen der weitgehenden Reinigung und umfassenden Aufklärung ihrer Identität besonderes Augenmerk zu widmen. Bestandteil der Identitätssicherung können auch hier wieder biochemische Methoden sein. Zur Absicherung der Identität biochemisch synthetisierter Referenzsubstanzen sollten immer mehrere voneinander unabhängige analytische Verfahren herangezogen werden.

Bei der Analyse von Proben biologischen Ursprungs können die in der Qualitätskontrolle etablierten Verfahren wie z.B. HPLC-UV/VIS unter Umständen nicht ausreichend selektiv oder sensitiv sein. Deshalb werden in zunehmendem Maße andere Detektionsverfahren angewendet.

### **Coulometrische Array Detektion von Flavonoiden und Flavonoid-Konjugaten in Urin und Plasma**

Die Funktions- und Wirkweise vieler Substanzen *in-vivo* beruht auf Elektronentransfer-Prozessen, so dass die analytische Nutzung dieses Phänomens in der Bioanalytik nur eine logische Konsequenz ist. Auch Flavonoide sind, wie ihre Konjugate, Redoxreaktionen zugänglich, die für ihre elektrochemische Detektion genutzt werden können. Ein solches elektrochemisches Verfahren zur Detektion

redox-sensitiver Substanzen ist die Coulometrie. Hier werden Stoffmengen aus der elektrischen Ladung bestimmt, die zur Umsetzung (Oxidation bzw. Reduktion) der Stoffe erforderlich ist.

Bei der potentiostatischen Coulometrie können die Stoffmengen des Analyten direkt aus der zur vollständigen Umsetzung benötigten elektrischen Ladung bestimmt werden. Physikalische Grundlage dafür ist das Faradaysche Gesetz (Formel 1).

$$m = \frac{M}{z \cdot F} \cdot Q \quad Q = I \cdot t$$

**Formel 1:** Faradaysches Gesetz (m = Masse der umgesetzten Substanz, z = Elektronenzahl pro Teilchenumsatz, M = molare Masse, Q = transportierte elektrische Ladung, F = Faraday-Konstante (96 487 C·mol<sup>-1</sup>), I = Stromstärke, t = Zeit).

Die meisten kommerziell verfügbaren Elektrochemischen Detektoren sind aus drei Elektrodentypen aufgebaut:

- die Arbeitselektrode

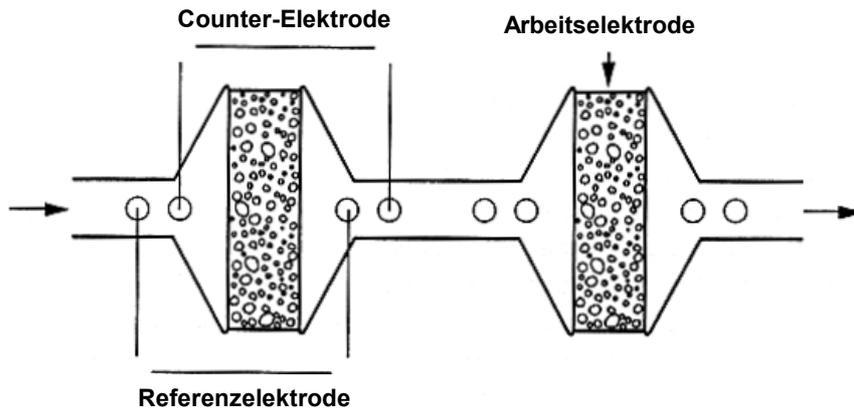
Sie besteht meistens aus Karbon-Mischmaterialien, Graphit oder Edelmetallen. An Ihrer Elektrodenoberfläche finden die elektrochemischen Reaktionen statt. Der daraus resultierende fließende Redox-Strom wird dort abgegriffen und aufgezeichnet.

- die Referenzelektrode

Das an die Arbeitselektrode angelegte Arbeits-Potential wird im Kontext zur Referenzelektrode gemessen bzw. eingestellt. Die (gesetzte) Spannungsdifferenz zwischen Arbeits- und Referenzelektrode bestimmt damit die Oxidations- bzw. Reduktionskraft der Arbeitselektrode. Mögliche Referenzelektroden können Standard-Wasserstoff-, Silber-/Silberchlorid-, Quecksilber-/Quecksilberchlorid- oder die  $\alpha$ -Hydrogen-/Paladium- Elektroden sein.

- die „Counter“-Elektrode

Sie besteht meist aus Edelmetallen wie Platin oder Palladium. Ihre Aufgabe ist die Bereitstellung bzw. Entfernung einer bei der Umsetzung an der Arbeitselektrode ge- oder verbrauchten äquivalenten Menge Elektronen. Die Counter-Elektrode wird so nah wie irgend möglich an die Arbeitselektrode platziert, und sichert so den in die Redoxvorgänge an der Arbeitselektrode verwickelten Elektronenfluss.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung coulometrischen Messzellen (modifiziert nach (Acworth and Bowers 1997)).

Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau einer coulometrischen Messzelle. Diese Zellen können sowohl einzeln aber auch in Reihenschaltung (Array) betrieben werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten elektrochemischen Detektor sind 12 Coulometrische Messzellen in Reihe geschaltet. Die Nutzung dieser Array-Technik eröffnet, ähnlich der des Photodioden-Arrays, die „dritte chromatographische Dimension“. Coeluiierende Substanzen können nun elektrochemisch unterschieden werden, sofern sie sich in ihren Redoxeigenschaften genügend stark unterscheiden. Die hier verwendete HPLC-Messanordnung nutzt den derzeit einzigen elektrochemische Detektor, der unter Gradientenbetrieb arbeiten kann. Üblicherweise registrieren elektrochemische Detektoren neben den Analyten auch die sich während des Gradientenverlaufs ändernde Zusammensetzung des Fließmittels. Dies resultiert in extremem Rauschen und einer instabilen Basislinie. Der CoulArray<sup>®</sup> nutzt in Verbindung mit seiner Software einen Rechenalgorithmus, der die sich verändernde Basislinie korrigiert sowie das gradientenbedingte Rauschen minimiert.

Voraussetzung für eine sensitive Messung in coulometrischen Messanordnungen ist die Wahl des für den Analyten geeigneten Messpotentials. Dieses kann entweder aus der Literatur oder in Experimenten ermittelt werden. Bei letzterem wird die angelegte Spannung schrittweise verändert und die fließenden Ströme gemessen. Dabei setzt jede der Elektroden deren Spannung niedriger als das stoffspezifische Halbstufenpotential ist, den Analyten nur partiell um. Erst die Elektrode, deren angelegte Elektrolysespannung annähernd dem Halbstufenpotential entspricht, liefert das höchste Stromsignal. An nachfolgenden Elektroden höherer Spannung verringert

sich das Signal wiederum, da der Analyt schon weitgehend an den vorgehenden Elektroden umgesetzt wurde. Trägt man die gemessenen Zersetzungsströme gegen die gesetzte Spannung auf, erhält man ein hydrodynamisches Voltammogramm (HDV). Bei Array-Systemen wird diese Funktion durch die simultan generierten Chromatogramme an den einzelnen Elektrodenpotenzialen online erzeugt. Das damit erstellte hydrodynamische Voltammogramm (HDV) ist eine Funktion des spezifischen elektrochemischen Verhaltens eines Analyten. Es liefert mit dem Halbstufenpotential qualitative und mit dem AUC (Fläche unter der Kurve) quantitative Informationen zum entsprechenden Analyt.

Generelle Vorteile dieser Methode sind eine mit anderen Messtechniken schwer erreichbare Sensitivität für redoxsensitive Analyten und eine Selektivität, die durch die Array-Technik mit der eines PDA vergleichbar ist.

### **Massenselektive Analyse von Flavonoiden und Flavonoid-Konjugaten in Plasma**

Aufgrund ihrer Vielseitigkeit, Selektivität und Nachweisempfindlichkeit sind Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (MS) zu einem leistungsfähigen Werkzeug bei der Analyse und Identifizierung von Substanzen geworden. Gerade bei der Analyse von Proben biologischen Ursprungs kann hierbei teilweise auf eine aufwendige Probenaufarbeitung verzichtet werden. Diese ist bei anderen Detektionsverfahren (UV/VIS-, Fluoreszenz-, Elektrochemische- Detektion) notwendig, um Störungen durch unerwünschte Matrixbestandteile zu vermeiden. Bei der HPLC-MS-Analyse werden die Analyten nach HPLC-Trennung:

- ionisiert und in die Gasphase überführt,
- in einem Magnetfeld selektiert
- und dann detektiert.

Die Ionisierung der Analyte in der Bioanalytik erfolgt bei HPLC-MS-Systemen heute meist über zwei Verfahren – Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) und Elektrospray-Ionisierung (ESI). Beide zählen zu den „weichen“ Ionisierungsverfahren, da sie die Analyte weitgehend ohne Zerstörung in Ionen überführen können.

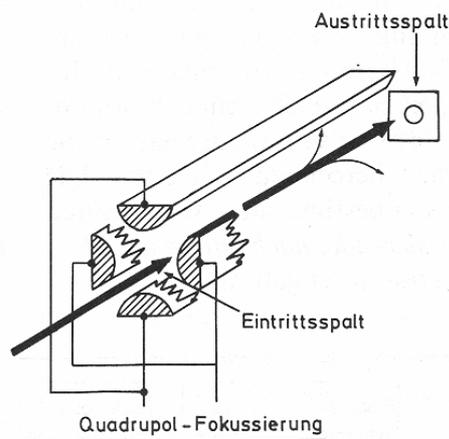
Bei der APCI wird die Probe bei Atmosphärendruck in einer Sprühkammer pneumatisch versprüht. Der Probennebel passiert einen 200°C bis 400°C heißen

Glaszylinder, in dem das Lösungsmittel vollständig verdampft wird. Die Ionisierung der Analyte erfolgt auch in der Sprühkammer. Dort werden durch Entladungen der Corona ein Stickstoffplasma erzeugt, welches Hydronium-Ionen aus dem wässrigen Fließmittel generiert. Diese Hydronium-Ionen übertragen Protonen auf die Analyte und bilden somit Analyt-Kationen. Im negativen Modus werden dagegen Protonenverlust und die Bildungen von Addukt-Ionen beobachtet.

Auch bei der ESI wird die Probe bei Atmosphärendruck in ein Aerosol überführt. Nach Austritt aus der Sprühkapillare gelangt es aber in ein Hochspannungsfeld, was innerhalb der Tröpfchen zu einer Ladungstrennung führt. Durch die Ansammlung gleichgeladener Teilchen und das Verdampfen des Lösungsmittels steigt die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche. Überschreiten die Coulombkräfte die Oberflächenspannung der Aerosolpartikel, so zerfallen diese in immer kleinere Tröpfchen. Unter Wiederholung dieser Prozesse entstehen so Mikrotröpfchen. Der „letzte“ Schritt vom Mikrotröpfchen zum eigentlichen ionisierten Analyt-Molekül wird noch diskutiert.

Die so erzeugten Ionen werden in Magnetfeldern ihrer Ladung und Masse nach aufgetrennt. Mögliche Analysatoren sind magnetische Sektorfeld-, elektrostatische-, Ion-Trap- und Quadrupole-Analysatoren. Auf das Prinzip des Quadrupols soll kurz eingegangen werden.

Das Quadrupol (Abbildung 9) besteht aus vier parallel angeordneten Metallstäben. An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe eines Paares wird Gleichspannung angelegt, welche durch ein Hochfrequenzfeld überlagert wird. Die Phase zwischen den beiden Stäbepaaren ist um  $180^\circ$  verschoben. Der in der Ionisierungskammer generierte Ionenstrahl wird nun in Längsrichtung durch den Quadrupol geleitet. Für die angelegte Spannung hängt die Flugbahn, die ein Ion durch den Quadrupol nimmt von seiner Masse ab, d.h. es gelangen nur Teilchen eines bestimmten Masse-Ladungsverhältnisses an den Austrittsspalt. Durch Veränderung der angelegten Spannung können andere Massen selektiert werden. Die so selektierten Ionen definierter Molekülmasse werden dann detektiert.



**Abbildung 9:** schematische Darstellung eines Quadrupol-Analysators.

Um neben der Molekülmasse nähere Informationen über die Struktur des Analyten zu erhalten, ist der Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) notwendig. Dabei werden spezielle Massenanalytoren wie z.B. Sektorfeld-, Iontrap-, TOF-, oder Triple-Quadrupol-Systeme eingesetzt. Hier soll kurz auf letzteren eingegangen werden.

Bei Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometern fungieren der erste (Q1) und dritte (Q3) der drei linear angeordneten Quadrupole als Massenanalytoren. Der mittlere (Q2) dient als Stoßkammer. Aus einem Gemisch ionisierter Analyte kann in Q1 ein Ion mit einem bestimmten Masse-Ladungsverhältnis (Prekursor-Ion) selektiert werden. In Q2 kollidieren die Prekursor-Ionen mit einem Stossgas (z.B. Argon) was zu einem Zerfall in Produkt-Ionen (Tochter-Ionen) führt. Diese können nun in Q3 analysiert werden. Resultierend aus der Kombination von zwei Massenanalytoren (Q1, Q3) und zwei Ionisierungskammern (APCI/ESI-Interface, Q2) sind eine Reihe von speziellen Experimenten möglich. Es soll hier aber nur auf SRM (selected reaction monitoring)-Experimente eingegangen werden.

Beim SRM-Experiment wird an Q1 der Prekursor des Analyten selektiert und in Q2 fragmentiert. Q3 selektiert ein charakteristisches Fragment des Analyten welches dann detektiert wird. SRM ist die Methode der Wahl für qualitativen Nachweis und qualitative Bestimmung von Spurenverbindungen in komplexen biologischen Matrices. Das Verfahren ist hoch selektiv, da zur Detektion des Analyten bei seiner Retentionszeit die korrekten Massen des Molekülions und des charakteristischen Fragments notwendig sind. „Falsch positive“ Ergebnisse können so nahezu

ausgeschlossen werden. Des Weiteren führt die zweimalige Massenselektion in Q1 und Q3 bei der SRM-Analyse zu stark reduziertem Rauschen. Damit können nicht nur Nachweisgrenzen im Picogramm-Bereich erreicht werden, sondern auch der Aufwand der Probenvorbereitung biologischer Proben minimiert werden.

### *1.3.3 Etablierte Analyseverfahren zur Bestimmung von einfachen und Polyphenolen sowie deren Metabolite in Plasma-, Urin- und In-vitro-Assay-Proben*

Aufgrund der unter 1.3.2 erwähnten Vorteile der elektrochemischen bzw. massenselektiven Detektion, sind beide Verfahren vorherrschend in der Bioanalytik. So wurde aufgrund ihrer den anderen Verfahren unterlegenen Sensitivität die UV/VIS-Detektion weitgehend abgelöst. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die zur Analyse von einfachen bzw. Polyphenolen in biologischen Matrices verwendeten Methoden.

Vorherrschendes Trennverfahren ist, wie auch in der Qualitätskontrolle die HPLC.

**Tabelle 6:** Trenn- und Detektions- Systeme zur Bestimmung phenolischer Komponenten in Proben biologischen Ursprungs (n.a. = nicht angegeben)

Trenn-system	Detektion	Parameter	Detektion von	Sensitivität	Referenz
HPLC	CoulArray		Epicatechin und -derivate	0,5 - 1.5 ng·mL <sup>-1</sup>	(Lee, Wang <i>et al.</i> 1995)
HPLC	UV	375 nm	Quercetin	100 ng·mL <sup>-1</sup> in Plasma (Injektionsvolumen nicht gegeben)	(Liu, Anderson <i>et al.</i> 1995)
HPLC	UV, Fluoreszenz	288 nm, ex 280 nm => fl 310 nm	Quercetin und -metabolite	n.a.	(Gross, Pfeiffer <i>et al.</i> 1996)
HPLC	UV	320 nm	7-Hydroxycoumarin, -glucuronid	0,5 µg·mL <sup>-1</sup> 7-HC 0,5 µg·mL <sup>-1</sup> 7-HC-glucuronid	(Killard, O'Kennedy <i>et al.</i> 1996)
CE	UV	320 nm	7-Hydroxycoumarin, -glucuronid	1 µg·mL <sup>-1</sup> 7-HC 1 µg·mL <sup>-1</sup> 7-HC-glucuronid	(Bogan, Duffy <i>et al.</i> 1997)
CE	MS (Massenspektrometrie)	electro spray ionization (ESI), positive ions mode	Catechine	20 ng on column in Plasma	(Dalluge, Nelson <i>et al.</i> 1997)
HPLC	Fluoreszenz der Aluminiumchelate	λ <sub>ex</sub> = 420 nm, λ <sub>em</sub> = 485 nm, Nachsäulenderivatisierung	Quercetin	100 pg on column in Plasma	(Hollman, v.d. Gaag <i>et al.</i> 1996) (Aziz, Edwards <i>et al.</i> 1998)
GC	MS	negative ion chemical ionisation (NICI)	Kaempferol, Quercetin	20 pg on column in Urin	(Watson and Pitt 1998)
HPLC	ECD	+ 800 mV	Quercetin	n.a.	(da Silva, Piskula <i>et al.</i> 1998)
HPLC	CoulArray		Epicatechin und -derivate		(Yang, Chen <i>et al.</i> 1998)
HPLC	UV	370 nm	Quercetin	n.a.	(Morand, Crespy <i>et al.</i> 1998)
HPLC	UV, ECD	375 nm,		80 ng·mL <sup>-1</sup> (UV), 2 ng·mL <sup>-1</sup> (ECD)	(Jones, Lim <i>et al.</i> 1998)
HPLC	CAD	Meßpotential 150 mV	Quercetin, Isorhamnetin	30 pg on column in Plasma 63 pg on column in Plasma	(Manach, Morand <i>et al.</i> 1998)
HPLC	UV, Szintillationszähler	+ 200-500 nm	Quercetin	24,16 ng·mL <sup>-1</sup>	(Boulton, Walle <i>et al.</i> 1999)
HPLC	UV	280 und 320 nm	Flavonide und -glucuronide	n.a.	(Spencer, Chowrimootoo <i>et al.</i> 1999)
HPLC	UV	370 nm	Quercetin und -metabolite	n.a.	(Crespy, Morand <i>et al.</i> 1999)
HPLC	UV	280 und 320 nm	Flavonide und -glucuronide	n.a.	(Choudhury, Srari <i>et al.</i> 1999)
HPLC	elektrochemische Detektion (ECD)	+ 100 mV	Quercetin	18,9 ng on column in Plasma	(Erlund, Alfthan <i>et al.</i> 1999)
HPLC	MS	electro spray (ES)	Genistein	2,7 ng on column (full scan) 0,67 ng on column (SRM) in Plasma	(Chang, Churchwell <i>et al.</i> 2000)
HPLC	coulometric array detection (CAD)	-250 – 840 mV	Quercetin	2,5 ng on column in Maus Splenocyten	(Bugianesi, Serafini <i>et al.</i> 2000)
HPLC	ECD	800 mV	Quercetin	302 pg·mL <sup>-1</sup> in Plasma	(Moon, Nakata <i>et al.</i> 2000)
HPLC	MS	atmospheric pressure chemical ionization (APCI)	Flavonoide	62,5-625 pg on column (SIM) in Urin	(Nielsen, Freese <i>et al.</i> 2000)
HPLC	CoulArray		Epicatechin und -derivate	0,3 ng·mL <sup>-1</sup>	(Rein, Lotito <i>et al.</i> 2000)
GC	MS				(Bell, Donovan <i>et al.</i> 2000)
HPLC	UV	288 nm	Naringenin	78 ng·on column in Urin	(Hou, Hsiu <i>et al.</i> 2000)
HPLC	UV, ECD, MS	333 nm, 750 mV, ESI neg.	Flavonoidmetaboliten	n.a.	(Miyake, Shimoi <i>et al.</i> 2000)
HPLC	ECD	+ 600 mV	Quercetin und Quercetinglukoside	181 – 427 pg on column in Darmhomogenisat	(Stumpf, Andlauer <i>et al.</i> 2001)

#### 1.4 Freisetzung phenolischer Wirkstoffe aus ihren Konjugaten am Wirkort

Die Freisetzung von pharmazeutisch aktiven Stoffen aus ihren Phase-II-Konjugaten *in-situ* ist ein bekanntes Phänomen. Ein Beispiel aus dem Bereich der chemisch definierten Substanzen ist z.B. das Morphin. Für die aus Phytopharmaka bioverfügbaren und potentiell wirksamen Stoffe sind solche Phänomene bislang weniger bekannt. Auch Quercetin liegt systemisch in konjugierter Form vor, so dass das zugrundeliegende Prinzip der *In-situ*-Freisetzung der Wirkform aus der Transportform ein interessanter Ansatz für weitere Arbeiten ist.

Freisetzung von Quercetin aus seinen systemisch verfügbaren Phase-II-Konjugaten

Die für Flavonoide und ihre Derivate postulierten Wirkungen *in-vivo* beruhen derzeit hauptsächlich auf *In-vitro*-Experimenten. Genannt werden dabei physiologische Wirkungen die mit den antioxidativen und radikalfangenden Eigenschaften der Flavonoide korrelieren (siehe Tabelle 1).

Dabei ist die Datenlage zu *In-vitro*-Wirkungen für freie Flavonoide wie Quercetin weitaus besser als die für seine Derivate wie z.B. Glucoside und Glucuronide. In einigen dieser Experimente erwiesen sich Aglykone im Vergleich zu ihren Konjugaten als potentere Antioxidantien (Morand, Crespy *et al.* 1998) (da Silva, Piskula *et al.* 1998) (Williamson, Plumb *et al.* 1996). Daraus kann man ableiten, dass auch *in-situ* Aglykone die potenteren Antioxidantien wären. Es gibt Hinweise darauf, dass Aglyka frei in den Zielgeweben vorliegen können. So konnten *In-vitro* nach Inkubation mit Quercetin erhebliche intrazelluläre Quercetin-Konzentrationen in Hep G2-Zellen (Boulton, Walle *et al.* 1999) und in Maus-Splenocyten (Bugianesi, Serafini *et al.* 2000) gemessen werden.

Nach oraler Applikation und Resorption von Quercetin bzw. Quercetinglycosiden sind systemisch allerdings hauptsächlich der hepatische Metabolit Isorhamnetin und Glucuronsäure-Konjugate des Quercetins verfügbar (Manach, Morand *et al.* 1998) (Crespy, Morand *et al.* 1999) (Graefe, Wittig *et al.* 2001). Die Anwesenheit von freiem Quercetin bzw. intakten Quercetinglykosiden im Kreislauf werden dagegen kontrovers diskutiert (Aziz, Edwards *et al.* 1998) (Paganga and Rice-Evans 1997).

Eine Freisetzung durch endogene Enzyme wie z.B. Glucuronidasen an den Zielorganen könnte der „missing link“ zwischen systemisch verfügbaren Phase-II-Konjugaten und intrazellulärem freiem Quercetin sein. Eine solche enzymatische

Aktivität an Zielgeweben wurde in verschiedenen *In-vitro*-Experimenten postuliert. So fand man  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität im verschiedenen Geweben von Hasen (Bogan, Duffy *et al.* 1997) bzw. im perfusionierten Ratenleber-Model (Ratna, Chiba *et al.* 1993). Shimoi *et al.* (Shimoi, Saka *et al.* 2000) beobachteten *in-vitro* die Dekonjugation von Luteolinglucuronid durch neutrophilen Granulozyten expremierte  $\beta$ -Glucuronidasen.

Untersuchungen die eine Konjugatspaltung *in-situ* und eine mögliche Aufnahme der antioxidativ wirksamen Aglykone in Zusammenhang stellen, waren zu Beginn dieser Arbeit nicht verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher ein geeignetes *In-vitro*-Modell zu entwickeln, dass eine eventuelle Freisetzung des Quercetins aus seinen Konjugaten an physiologisch möglichst ähnlichen Gewebestrukturen zeigen konnte.

#### 1.4.1 Freisetzung von Hydrochinon aus renalen Arbutin-Metaboliten im Harntrakt

Die Daten zur Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Arbutin am Menschen sind weitgehend dürftig. Sowohl Studiendesign der Probandenstudien als auch die Validierung der Bioanalytik entsprechen nicht den modernen Anforderungen. Die Kenntnisse zur Pharmakokinetik beschränken sich darauf, dass nach Resorption im Gastrointestinaltrakt Arbutin zunächst zum systemisch verfügbaren Phase-II-Metaboliten Hydrochinonglucuronid metabolisiert wird (Siegers, Siegers *et al.* 1997), (Deisinger, Hill *et al.* 1996). Weithin wird eine mögliche Metabolisierung zum Hydrochinonsulfat diskutiert (Stammwitz 1998), (Kedzia, Wrocinski *et al.* 1975) (Frohne 1970).

Nach der Elimination dieser Metabolite wird eine, durch chemische oder bakterielle Degradation ausgelöste, Freisetzung des antibakteriell aktiven Wirkprinzips Hydrochinon im Harntrakt postuliert. In zwei Probandenstudien (Frohne 1970) (Kedzia, Wrocinski *et al.* 1975) konnte gezeigt werden, dass Harn nach der Einnahme von Bärentraubenblätter-Extrakten bzw. Arbutin *in-vitro* antimikrobiell wirksam ist. Vorraussetzung dafür war allerdings, dass der gesammelte Urin alkalisch reagierte, da erst dann das antibakteriell wirksame Hydrochinon aus seinen im Urin enthaltenen konjugierten Vorstufen freigesetzt werden konnte. In einer der Studien wurde diese Alkalisierung durch Zugabe von Kaliumhydroxyd (Frohne 1970) nach Miktion, in der anderen durch Comedikation mit Duiramid (Kedzia, Wrocinski *et*

al. 1975) erreicht. In zwei weiteren Studien zur Bioverfügbarkeit konnte allerdings auch nach Harnalkalisierung durch Comedikation mit hohen Dosen an Natriumhydrogencarbonat bzw. vegetarischer Ernährung freies Hydrochinon nicht (Paper, Koehler *et al.* 1993) oder nur in sehr geringen Konzentrationen (Siegers, Siegers *et al.* 1997) detektiert werden. Da in der Praxis Patientenurin weder durch Comedikation noch durch Verordnung einer vegetarischen Diät alkalisiert wird, spiegelt keine dieser Studien die therapeutische Realität wider.

Neben der chemischen, wird eine mögliche mikrobiologische Freisetzung im Harntrakt von erkrankten Patienten diskutiert. Das antibakteriell aktive Hydrochinon soll dabei durch an der Entzündung beteiligter Mikroorganismen aus seinen konjugierten Vorstufen freigesetzt werden (autozide Wirkung). So wird bei Infektionen mit *Proteus* eine Alkalisierung des Harns um pH 8 beobachtet (Schilcher 1984) (Frohne 1997). Ebenso konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass Bakterienstämme mit Glucuronidase- / Sulfatase- Aktivität (*E. coli*, (Siegers, Siegers *et al.* 1997)) antibakteriell wirksames Hydrochinon freisetzen. *In-vivo* Untersuchungen an Patienten mit den indizierten Erkrankungen, die eine Korrelation mit den gezeigten *In-vitro*-Ergebnissen zulassen würden, existieren hierzu nicht.

So konnte keine der bis dato unternommenen *In-vivo*-Studien, aufgrund der angewandten analytischen Methoden, des Studien-Designs bzw. der Auswahl des Probandenkollektives, die unter Therapiebedingungen postulierte chemische oder biologische *in-situ* Freisetzung des antibakteriell aktiven Hydrochinon zeigen. Ziel der Arbeit war es daher in diesem Problemkreis die Anwendbarkeit der coulometrischen Array-Detektion bei der Analyse der Urinproben von Probanden einer unter Therapiebedingungen durchgeführten Humanstudie zu prüfen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck Deutschland.
Aceton	Riedel de Haen, Deutschland
Ascorbinsäure	Merck, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma, Deutschland
Essigsäure	Roth, Deutschland
Ethanol 96%	Merck, Germany
Magnesiumchlorid	Grüssig Deutschland
Methanol, gradient grade	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Germany
ortho-Phosphorsäure	Roth, Deutschland
p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA)	Fluka, Deutschland
Reinstwasser System Clear	SG GmbH, Deutschland
Salzsäure 36%	Merck, Germany
Schwefelsäure	Merck, Deutschland
Trifluoressigsäure	Merck Deutschland
Trishydrochloride Puffer (pH 8.0)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Uridine-5'-diphospho-Glucuronsäure (UDPGA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Uridine-5'-glucuronyl-Transferase [EC 2.4.1.17]	Sigma-Aldrich, Deutschland
$\beta$ -Glucuronidase Typ HP-2 [EC 3.2.1.31]	Sigma-Aldrich, Deutschland

### 2.2 Referenzsubstanzen und Referenzstandards

(+) Catechin	Geiger <sup>1)</sup>
6-Methoxyflavon	Roth, Deutschland
Astragalin (Kämpferol-3-O-rutinosid)	Geiger <sup>1)</sup>
Avicularin (Quercetin-3-O-arabinofuranosid)	Geiger <sup>1)</sup>
Catechin (Gehalt: 93,7 % $\pm$ 4,53 *)	Fluka Deutschland
Chlorogensäure	Geiger <sup>1)</sup>

Epicatechin (Gehalt: 98,7 % $\pm$ 0,55 *)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gallussäure	Geiger <sup>1)</sup>
Hyperosid (Quercetin-3-O-galaktosid)	Roth, Deutschland
Isoquercitrin (Quercetin-3-O-glucosid)	Geiger <sup>1)</sup>
Isorhamnetin	Extrasynthese, Frankreich
Kämpferol	Fluka, Deutschland
6,7,3',4'-Methoxy-6-hydroxy-Luteolin	Wollenweber <sup>2)</sup>
6,7,4'-Methoxy-6-hydroxy-Luteolin	Wollenweber <sup>2)</sup>
6,7,4'-Methoxy-Scutellarein	Geiger <sup>1)</sup>
Myricetin-3-O-galaktosid	Geiger <sup>1)</sup>
Narcissin (Isorhamnetin-3-O-rutinosid)	Geiger <sup>1)</sup>
Naringenin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Procyanidin B2 (Gehalt 92,94 % $\pm$ 4,54 *)	Leipolz <sup>3)</sup>
Quercetin dihydrat (Gehalt: 99 )	Sigma-Aldrich, Deutschland)
Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnosid)	Geiger <sup>1)</sup>
Rosmarinsäure	Geiger <sup>1)</sup>
Sinensitin (5,6,7,3',4'-penta-Methoxyflavon)	Geiger <sup>1)</sup>

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

<sup>2)</sup> Diese Substanzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Eckhard Wollenweber, Technische Universität Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

<sup>3)</sup> Diese Substanzen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau Dipl. Biologin Ingrid Leipolz aus *Aesculus hippocastanum* isoliert (Leipolz 1999).

\* Gehaltsbestimmung mittels quantitativen NMR (Pauli 2001).

### 2.3 Weitere Materialien und Geräte

Laborschüttler Typ LS 10	Gerhardt, Deutschland
Laborinkubator Typ 2099-DA	Liebisch, Deutschland
Laborzentrifuge Typ Servall® RC5B	Du Pont Schweiz
Laborzentrifuge	Sigma, Deutschland
Wasserbad Typ HWP	DAGLEF Patz, Deutschland
Digital-pH-Meter Typ 646,	KNICK, Deutschland

Rotationsverdampfer Typ 461,	Büchi, Schweiz
UV/VIS Spektralphotometer, Lambda2, 3513	Perkin Elmer, Deutschland
Membran-Filter RC; Typ Spartan 30B, 0,45 µm	Schleier + Schuell, Deutschland
Membranfilter Nylon 0,22 µm	Sartorius, Deutschland

## 2.4 HPLC-Systeme

### HPLC-System (A) mit UV-VIS Detektion

Programmable Solvent Module System Gold® 126	Beckmann, Deutschland
Autosampler System Gold® 502	Beckmann, Deutschland
Diode-Array-Detector-Module System Gold® 168	Beckmann Deutschland
Analog-Interface-Module System Gold® 406	Beckmann Deutschland
Programmierbarer Säulenofen STH 585	Gynkotek, Deutschland

### Zusatzausstattung zu HPLC-System A für Nachsäulenderivatisierung

HPLC-Pumpe Typ 64	Knauer, Deutschland
UV/VIS-Detektor Typ 7947	Knauer, Deutschland

### HPLC-System (B) mit elektrochemischer Array-Detektion (CoulArray®)

ESA Model 582 Solvent Delivery System	ESA, USA
ESA Autosampler Model 542	ESA, USA
ESA CoulArray Elektrochemischer Detektor	ESA, USA
ESA Columnthermostat "Mistral" type 880	ESA, USA

### HPLC-System (C) mit Massenspektrometrischer und UV-Detektion

HPLC-Pumpe, Applied Biosystems Model 140B	bai, Deutschland
TSQ 7000 triple-stage-quadrupole-Massenspektrometer mit APCI / ESI Interface	Finnigan MAT Deutschland
UV/VIS-Detektor Typ 7947	Knauer, Deutschland

## **2.5 Analyse von Quercetin und Quercetinkonjugaten in pflanzlichen und humanbiologischen Matrices**

### **Extraktion von Quercetin und Quercetinderivaten aus einer die fixe Kombination der Trockenextrakte von Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern enthaltenden oralen festen Arzneiform**

5 - 6 Tabletten wurden im Mörser zerstoßen und ca. 630 mg, genau gewogen, in einen geeigneten Rundkolben eingewogen. Dem Probenpulver wurden 20,0 mL einer wässrigen Ethanol-Lösung (30% V/V) zugeben und 30 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Analyse der Extraktlösung erfolgte nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Filtration (Membranfilter PTFE, 0,45 µm).

### **Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma ohne Hydrolyse der Konjugate**

1) Nach Blutentnahme am Probanden wurden die Blutzell-Bestandteile durch zentrifugieren bei 4696 g für 10 min vom Plasma getrennt. Das Plasma wurde in 500 µL Aliquots in Eppendorf- Reaktionsgefäße überführt, zur Phenolstabilisierung 20 µL einer 0,58 M wässrigen Essigsäure zugesetzt, und bei -80 °C gelagert.

2) Zu 500 µL der aufgetauten Plasma-Proben wurden 10 µL einer 1,0% igen (m/V) wässrigen Vitamin C-Lösung zugegeben, und mit 0,58 M wässriger Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt. Der angesäuerten Probe werden anschließend 600,0 µL Aceton und 50 µL interne Standardlösung (0,015 % m/V Naringenin in Aceton) zugesetzt. Es wurde kurz gevortext und auf einem Laborschüttler auf Stufe 12 für 10 min geschüttelt. Die Probe wurde in einer Laborzentrifuge (Sigma) bei 8000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand analysiert.

### **Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma mit Hydrolyse der Konjugate**

1) siehe „Extraktion nicht konjugierter Polyphenole aus Humanplasma“ Absatz 1)

2) Zu 500 µL der aufgetauten Plasma-Proben wurden 10 µL einer 1,0% igen (m/V) wässrigen Vitamin C-Lösung zugesetzt und mit 0,58 M wässriger Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt. Der hier verwendete pH 5 war der optimale Arbeits-pH für das verwendete Enzym. Der Probe wurden 30 µL β-Glucuronidase zugefügt, mittels Vortex-Schüttler homogenisiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µL Aceton gestoppt und 50 µL interne Standardlösung (0,015 % m/V Naringenin in Aceton) zugegeben. Es wurde kurz gevortext und auf

einem Laborschüttler 10 min geschüttelt. Die Probe wurde in einer Laborzentrifuge (Sigma) bei 7826 g für 10 min zentrifugiert.

Dem Überstand wurde nach Überführung in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß 10 µL einer 1,0% igen (m/V) wässrigen Vitamin C-Lösung zugegeben und in einer Vakuumzentrifuge bis fast zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde in 150 µL einer Mischung von Dimethylformamid / Wasser (2:1) mittels vortexen vollständig redispergiert. Nach Zentrifugation bei 7826 g für 10 min wurde der Überstand der Analyse zugeführt.

### **Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanurin ohne Hydrolyse der Konjugate**

1) Zur Stabilisierung der phenolischen Komponenten wurde dem Urin Vitamin C in der Konzentration von 2 % (m/V) zugesetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2) siehe „Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma ohne Hydrolyse der Konjugate“ Absatz 2).

### **Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma mit Hydrolyse der Konjugate**

1) siehe „Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanurin ohne Hydrolyse der Konjugate“ Absatz 1).

2) siehe „Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma mit Hydrolyse der Konjugate“ Absatz 2).

### **Bestimmung von Quercetin und Quercetinderivaten einer fixen Kombination von Trockenextrakten aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern**

Zeit [min]	% B in A	Gradient	Funktion
0 - 3,6	23,0	Isokratisch	TRENNEN
3,6 - 24,0	23,0 => 38,0	Linear	
24,0 - 30,0	38,0	Isokratisch	
30,0 - 36,0	38,0 => 43,0	Linear	
36,0 - 45,0	43,0	Isokratisch	
45,0 - 60,0	43,0 => 60,0	Linear	
60,0 - 66,0	60,0	Isokratisch	
66,0 - 86,0	60,0 => 100,0	Linear	
86,0 - 93,0	100,0	Isokratisch	SPÜLEN
93,0 - 94,2	100,0 => 23,0	Linear	EQUILLIBRIEREN
94,2 - 119,0	23,0	Isokratisch	

Komponente A: wässrige *ortho*-Phosphorsäure 85% pH=2  
 Komponente B: Methanol (gradient grade)  
 Detektion:  $\lambda_1 = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 350 \text{ nm}$ , UV/VIS-Spektren von 200 – 400 nm  
 Flussrate:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$   
 Säule: Eurospher<sup>®</sup> 100, C18 (250mm x 3mm), Knauer, Deutschland  
 Injektion: 20  $\mu\text{L}$   
 Temperatur: Proben bei Raumtemperatur, Säule bei 10°C

**Bestimmung von Quercetin und Quercetinmetaboliten in Humanplasma bzw. –  
 urin mittels coulometrischer Array-Detektion**

Zeit [min]	% B in A	Gradient	Funktion
0 - 2,5	30	Linear	TRENNEN
2,5 - 22	30 => 55	Isokratisch	
22 - 23	55	Linear	
23 - 33	55 => 80	Isokratisch	
33 - 45	80 => 100	Linear	
45 - 55	100	Isokratisch	SPÜLEN
55 - 57	100 => 30	Linear	
57 - 67	30	Isokratisch	EQUILLIBRIEREN

Komponente A: 0.02 M wässrige NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 3,4)  
 Komponente B: 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 1,4) / Methanol (20:80)  
 Detektion: elektrochemisch bei 75 – 900 mV in 75 mV Schritten  
 Flussrate:  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$   
 Säule: Luna<sup>®</sup>, C18 (250mm x 4,6mm), Phenomenex, Deutschland  
 Injektion: 50  $\mu\text{L}$   
 Temperatur: Proben bei 15°C, Säule bei 20°C

**Bestimmung von Quercetin und Quercetinmetaboliten in Humanplasma bzw. –  
 urin mittels LC-MS/MS**

Zeit [min]	% B in A	Gradient	Funktion
0 - 0,6	5 => 23	Linear	TRENNEN
0,6 - 1,8	23	Isokratisch	
1,8 - 2,8	23 => 35	Linear	
2,8 - 5,0	35	Isokratisch	
5,0 - 6,0	35 => 50	Linear	
6,0 - 10,0	50	Isokratisch	
10,0 - 10,6	50		
10,6 - 15,0	60		
15,0 - 17,5	60		
17,5 - 19,0	87		
19,0 - 25,0	87 => 100	Linear	SPÜLEN
25,0 - 30,0	100	Isokratisch	
30,0 - 31,0	100,0 => 5	Linear	
31,0 - 36,0	5	Isokratisch	EQUILLIBRIEREN

Komponente A: 0.05% wässrige Trifluoressigsäure  
Komponente B: Methanol (gradient grade)  
Detektion: UV bei 254 nm; ESI-MS/MS Parameter: ESI source 4.5 kV, capillary temperature 260 °C, collision gas Argon (267 mPa),  
Flussrate: 0,2 mL·min<sup>-1</sup>  
Säule: NUCLEOSIL® 120-5 C18, (125mm x 2mm), Macherey-Nagel, Deutschland  
Injektion: 10-20 µL  
Temperatur: Probe und Säule bei Raumtemperatur  
SRM-Experimente (siehe Ergebnisse 6.1.3)

## 2.6 Analyse von Procyanidinen in pflanzlichen und biologischen Matrices

### **Extraktion von Procyanidinen aus Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltenden festen oralen Arzneiformen**

- 1) Die Crataegus-Präparate wurden von ihrem Überzug befreit, zermörsert und 0,50 g in einem 100-mL-Rundkolben genau eingewogen.
- 2) Anschließend wurden 15,0 mL Interner-Standard (IST)-Lösung zugegeben, und die Mischung wurde für 20 Minuten eisgekühlt im Ultraschallbad (5 - 10°C) extrahiert. Die IST-Lösung stellt eine 0,01%ige (m/V) Lösung von 6-Methoxyflavon in wässrigem Methanol 70% dar. Aufgrund der problematischen Stabilität der Procyanidine (Leipolz 1999) (Rohr 1999) nach Extraktion, wurden Proben, die nicht vermessen werden konnten, bei – 80°C gelagert. Chlorophylle und Lipide wurden nicht entfernt, da sie die Analysen nicht störten.
- 3) Sofort nach Zentrifugation (12 min, 7862 g) wurde ein Aliquot des Überstandes für die kolorimetrische Analyse, eine anderes für die Analyse mittels HPLC-Nachsäulen-derivatisierung verwendet.

### **Extraktion von Procyanidinen aus Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltenden flüssigen oralen Arzneiformen**

- 1) Die einem Trocknungsrückstand von 0,50 g entsprechende Menge Flüssig-Extrakt wurde in einem 100-mL-Rundkolben eingewogen.
- 2) und 3) siehe „Extraktion von Procyanidinen aus Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltenden festen oralen Arzneiformen“ Absatz 2) bzw. 3).

### **Extraktion von Procyanidinen aus Humanplasma mit Hydrolyse der Konjugate**

- 1) und 2) siehe „Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma mit Hydrolyse der Konjugate“ Absätze 1) und 2).

### Kolorimetrische Bestimmung des Procyanidingehaltes in Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltenden Arzneiformen nach Derivatisierung mit DMAZA

Einem 10 µL Aliquot der aufgearbeiteten Probenlösung wurden 6,0 mL Methanol und 1,2 mL DMAZA-Lösung (1% (m/V) DMAZA in 6N wässriger Salzsäure / Ethanol (1:1)) in einer Plastikkuvette zugemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Proben in einem Spektralphotometer gegen die DMAZA-Lösung bei 640 nm vermessen (n=2).

### Bestimmung von monomeren bis trimeren Procyanidinen in Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltenden Arzneiformen mittels HPLC-Nachsäulenderivatisierung

Ein Aliquot der aufgearbeiteten Probenlösung wurde sofort mittels HPLC-Nachsäulenderivatisierung analysiert. Bei eingefrorenen Proben wurde eine Auftauzeit von 30 min bei Raumtemperatur exakt eingehalten. Bei der Bereitstellung der Proben zur HPLC-CRD- Analyse ist schnelles Arbeiten und genaue Einhaltung der angegebenen Ablaufzeiten notwendig.

Zeit [min]	% B in A	Gradient	Funktion
0 - 5	20	Isokratisch	TRENNEN
5 - 10	20 => 25	Linear	
10 - 15	25	Isokratisch	
15 - 30	25 => 30	Linear	
30 - 55	30	Isokratisch	
55 - 70	30 => 35	Linear	
70 - 80	35	Isokratisch	
80 - 81	35 => 40	Linear	
81 - 108	40	Isokratisch	
108 - 118	40 => 45	Linear	
118 - 140	45	Isokratisch	
140 - 170	45 => 82	Linear	
170 - 171	82 => 90	Linear	
171 - 185	90 => 100	Linear	
185 - 187	100 => 90	Linear	SPÜLEN
187 - 215	90	Isokratisch	
215 - 217	90 => 20	Linear	EQUILLIBRIEREN
217 - 225	20	Isokratisch	

Komponente A: 0,15% wässrige *ortho*-Phosphorsäure  
 Komponente B: Methanol (gradient grade)  
 Detektion: UV bei  $\lambda = 330$  nm, VIS nach Derivatisierung bei  $\lambda = 640$  nm  
 Flussrate: HPLC und Reagenz-Zumischung bei  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$   
 Säule: Eurospher®100, C18, (250 x 3 mm), Knauer, Deutschland  
 Injektion: 20 µL

Temperatur: Proben bei Raumtemperatur, Säule bei 14°C  
 Derivatisierungsreagenz: 1% (m/V) DMAZA in 3N wässriger Schwefelsäure / Methanol (1:11)

### Bestimmung von Procyanidinen in Humanplasma mittels LC-MS/MS

Gradient, Fließmittel, Flussrate und Gasversorgung des Massenspektrometers siehe bei „Bestimmung von Quercetin und Quercetinmetaboliten in Humanplasma bzw. – urin mittels LC-MS/MS“.

Injektion: 20 µL, Pick up 90 % wässriges Methanol; bei “on Loop” Injektion mit Air Segment

SRM-Experimente: (siehe Ergebnisse Tabelle 17)

## 2.7 Analyse von Hydrochinon und Hydrochinonkonjugaten in pflanzlichen und humanbiologischen Matrices

### Extraktion von Hydrochinon und Hydrochinonkonjugaten aus Humanurin ohne Hydrolyse der Konjugate

Zur Stabilisierung der phenolischen Komponenten wurde dem Urin Vitamin C in der Konzentration von 2 % (m/V) zugesetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei –80°C gelagert. Zur Analyse wurden 500 µL Aliquots ggf. bei Raumtemperatur aufgetaut, membranfiltriert (0,22 µm, Nylon) und anschließend vermessen.

### Bestimmung von Hydrochinon und Hydrochinonkonjugaten in Humanurin mittels elektrochemischer Array Detektion (CoulArray®)

Zeit [min]		% B in A		Gradient	Funktion
0 -	15	15		Isokratisch	TRENNEN
15 -	16	15 =>	100	Linear	
16 -	24	100		Isokratisch	SPÜLEN
24 -	25	100,0 =>	15	Linear	
25 -	35	15		Isokratisch	EQUILLIBRIEREN

Komponente A: 0.02 M wässrige NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 3,4)  
 Komponente B: 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 1,4) / Methanol (20:80)  
 Detektion: elektrochemisch bei 75 – 900 mV in 75 mV Schritten  
 Flussrate: 0,8 mL min<sup>-1</sup>  
 Säule: Aqua<sup>®</sup>, C18, 5µ (250mm x 4,6mm), Phenomenex, Deutschland  
 Injektion: 50 µL  
 Temperatur: Proben bei 15°C, Säule bei 25°C

## 2.8 Biochemische Methoden

### Biochemische Synthese von Quercetinglucuroniden

63,0 mL eines wässrigen Gemisches aus 20,0 mmol Trishydrochlorid-Puffer, 29,16  $\mu\text{mol}$  Quercetin, 3,0 mmol Magnesiumchloride, 2,3 g bovinem Serumalbumin und 0,2 mmol 2-Mercaptoethanol wurde hergestellt, mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,0 eingestellt und auf 37°C erwärmt. Zu 6,3 mL dieses Ansatzes wurden 88,0  $\mu\text{L}$  einer wässrigen 10 %igen Uridine-5'-glucuronyl-Transferase-Lösung und 211,0  $\mu\text{L}$  einer 30 mM Uridin 5'-diphosphoglucuronsäure-Lösung zugesetzt und durch vortexen gemischt. Danach wurde der Reaktionsansatz bei 37°C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion nach 60 min durch Denaturierung der Proteine zu beenden, wurde dem Gemisch 1,0 mL Ethanol 96 % zugegeben. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation bei 7826 g für 10 min abgetrennt.

### Versuchsdurchführung des In-vitro-HUVEC-Assays

HUVEC-Monolayer enthaltende Zellkulturflaschen wurden mit 5,0 mL der jeweiligen Untersuchungslösung (powered Medium 199 + Analyten) überschichtet. Dabei durfte der sensible Zellmonolayer nicht beschädigt werden. Der Ansatz wurde danach bei 37°C unter einer Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid-Anteil (Carbogen-Gas) inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Kulturflaschen dem Zellbrutschrank zur weiteren Analyse entnommen.

Die Untersuchungslösung wurde abdekantiert und direkt analysiert.

Die Zellmonolayer wurden danach zweimal mit 5,0 mL mit PBS-Puffer gewaschen um Reste der Untersuchungslösung zu entfernen. Bei einzelnen Experimenten wurde zusätzlich zweimal mit 5,0 mL mit PBS-Puffer gewaschen der 0,5 % Albumin enthielt. Damit konnten Reste der Analyten, die an den Zellmembran-Proteinen der Monolayer adsorbiert waren, entfernt werden.

Danach wurde der Monolayer mit 1,0 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und damit in eine Zellsuspension überführt. Diese Zellsuspension wurde quantitativ in ein geeignetes Eppendorf-Cap überführt und die Trypsin/EDTA-Lösung von den HUVEC-Zellen durch Zentrifugation bei 7826 g für 10 min abgetrennt.

Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde abgenommen und direkt analysiert.

Das verbleibende Zellpellet wurde mit 500  $\mu$ L Aceton vollständig lysiert, 10 min mit Ultraschall behandelt und die Zellproteine durch Zentrifugation bei 7826 g für 10 min abgetrennt. Das Aceton-Zellysat wurde abgenommen und direkt analysiert.

---

### 3 Flavonoide in einer fixen Kombination aus Extrakten von Birkenblätter, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern

#### 3.1 Bestimmung der Flavonole bzw. Flavonolderivate des Extraktgemisches

##### 3.1.1 Methodenentwicklung zur Extrakt-Analytik

Für die Analyse des Fertigpräparates (Canephron<sup>®</sup>novo, Bionorica Arzneimittel GmbH) und eines Extrakt-Gemisches aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern wurde ein HPLC-UV/VIS-System verwendet. Die entwickelte Methode (Wittig *et al.* 2001) diente der Trennung der phenolischen Komponenten des Extrakt-Gemisches im Allgemeinen, und der der Flavonole bzw. Flavonolderivate im Besonderen. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden dabei verschiedene Parameter variiert.

#### Einfluss des Fließmittels

Ausgehend von den zur Flavonoidanalyse publizierten Methoden (siehe Tabelle 4) wurden Wasser / Acetonitril Gradienten und Wasser / Methanol Gradienten zur chromatographischen Trennung pflanzlicher Phenole getestet. In ersten Experimenten zeigte ein Vergleich keinen entscheidenden Vorteil für eines der beiden Fließmittel-Kombinationen bezüglich Trennkraft oder Peakform. Wegen der höheren Toxizität wurde deshalb auf Acetonitril zugunsten von Methanol verzichtet.

Dem Wasser-Anteil wurde im Verlauf der Methodenentwicklung verschiedene Säuren zugesetzt, um das Protonierungsgleichgewicht der phenolischen Inhaltsstoffe möglichst vollständige in die nicht dissoziierte Form zu drängen. Die Wasserphase wurde so unter Verwendung von ortho-Phosphorsäure, Trifluoressigsäure oder Essigsäure auf pH = 2.0 eingestellt. Die Versuche zeigten für keine der verwendeten Säuren gegenüber den anderen eine Verbesserung oder Verschlechterung der Trennung bzw. der Peakform oder -symmetrie. Es wurde ortho-Phosphorsäure zur Ansäuerung der wässrigen Phase gewählt, da diese bei pH 2 einen Pufferpunkt besitzt ( $pK_s = 1,96$  bei  $H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+$ ).

Die leichte Austauschbarkeit von Phosphorsäure und flüchtiger Trifluoressigsäure brachte große Vorteile, da sie die Übertragung des chromatographischen

---

Trennsystems von UV/VIS-spektroskopischer zu massenspektrometrischer Detektion ermöglichte. Letztere wurde u.a. zur näheren Identifizierung einiger Extrakt-Inhaltsstoffe verwendet.

Ein von Keinänen et al. (Keinänen and Julkunen-Tiitto 1998) vorgeschlagener Zusatz von Tetrahydrofuran zur wässrigen Phase brachte keine Verbesserung in der Peak-Trennung.

### **Stationäre Phase und Gradienten-Entwicklung**

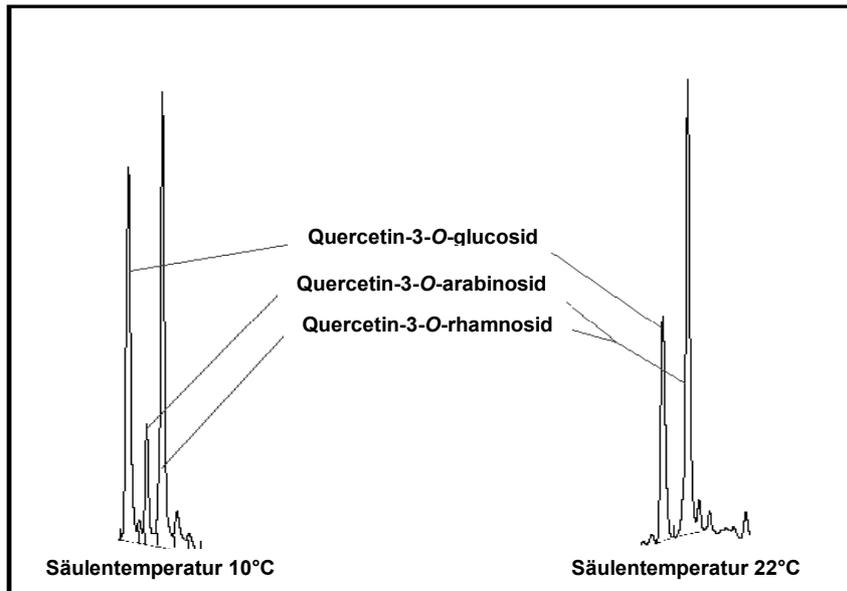
Die Verwendung von diversen Octadecylsilan Phasen hat sich für die Trennung von Polyphenolen als besonders geeignet erwiesen (siehe Tabelle 4). Durch die Verwendung des endcapped Materials Eurospher® 100 (RP 18, 250 x 3 mm) konnte eine fast vollständige Auftrennung des Stoffgemisches erreicht werden. Eine Flußrate von  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$  erwies sich nach verschiedenen Versuchen als geeignet. Aufbauend auf einer bereits für die Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe in *Equisetum arvense L.* bestehenden HPLC-Methode (Veit, Beckert et al. 1995), wurde zunächst der dort verwendete Gradient optimiert. So konnte ein neuer Gradient entwickelt werden (siehe Methodenteil), der auch kritische Peakpaare des Extraktgemisches durch fünf isokratische Schritte trennt (siehe 2.5).

### **Parameter der UV/VIS-Detektion**

Die chromatographisch getrennten phenolischen Inhaltsstoffe des Extraktgemisches wurden bei zwei festen Wellenlängen (330 und 350 nm) mittels Photodiodenarray-Detektor (PDA) simultan detektiert, während das Gerät kontinuierlich auf Signale (Peaks) im Bereich von 200 - 400 nm scannte. Im Maximum eines solchen Peaks, wurde sein Spektrum (200 - 400 nm) aufgezeichnet.

### **Einfluss der Säulentemperatur**

Bei Raumtemperatur trat auch im optimierten Gradienten Koelution einiger Flavonol-Glykoside auf. Die Auflösung dieser „Problem-Peaks“, die meist aus verschiedenen Glykosiden eines Aglykons bestanden, wurde durch Kühlung der Säule erhöht. Abbildung 10 zeigt den Einfluss der Temperatur auf das Trennverhalten einiger Quercetinglykoside. Eine Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  an der Säule erwies sich schließlich als am Besten geeignet.



**Abbildung 10:** Einfluss der Säulentemperatur auf das chromatographische Verhalten verschiedener Quercetinglykoside.

### 3.1.2 Beurteilung der chromatographischen Trennung

Nach Auftrennung des Extraktes von Canephron<sup>®</sup> novo (Charge: 9712733841) mit der optimierten Methode konnten bei 350 nm 58 Peaks detektiert werden (Abbildung 11). Die Kontrolle der Methoden-Trennschärfe wurde durch Berechnung der Peak-Auflösung ermittelt (Formel 2). In Tabelle 7 sind die Auflösungen aller im Extrakt detektierten Peaks aufgelistet. Zur vollständigen Auftrennung zweier Substanzen sollte die Auflösung  $R_s > 1,4$  betragen. Bei Integration und Quantifizierung mittels moderner Integrations-Software reichen jedoch Werte um  $R_s \sim 1$  (Peaks überlappen um ca. 2% ihrer Peakflächen) meist aus. Nur 3 Peakpaare (13/14, 23/24, 50/51, in Tabelle 7 fettgedruckt) weichen stark von diesem Richtwert ab. Zwei weitere Peaks (47, 48) zeigten unsaubere bzw. unterschiedliche UV/VIS-Spektren an den Peak-Wendepunkten. Hier tritt Koelution zweier oder mehrerer Substanzen auf.

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(t_{w1} + t_{w2})} \quad (R_s = \text{Auflösung, } t_r = \text{Bruttoretentionszeit, } t_w = \text{Halbwertesbreite})$$

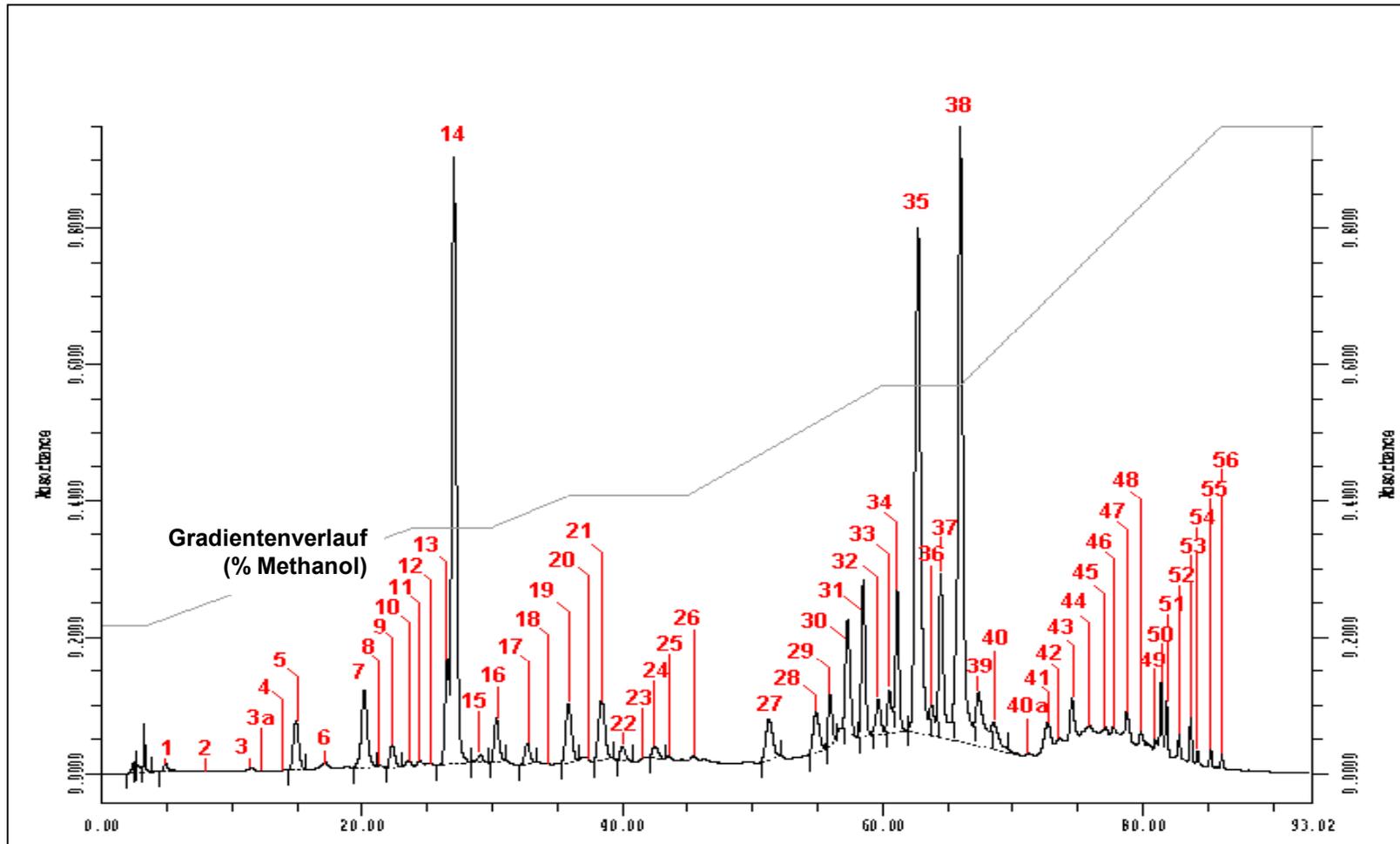
**Formel 2:** Berechnung der Auflösung.

**Tabelle 7** berechnete Auflösung des untersuchten Canephron® novo-Extraktes bei 350 nm (RT= Retentionszeit,  $w_{(0,5)}$  = Peakhalbwertsbreite,  $R_s$  = Auflösung).

Peak Nr	RT	$w_{(0,5)}$	$R_s$	Peak Nr	RT	$w_{(0,5)}$	$R_s$	Peak Nr	RT	$w_{(0,5)}$	$R_s$
1	4,88	0,25	5,66	20	37,27	0,60	1,42	39	67,58	0,34	2,04
2	7,47	0,29	5,83	21	38,52	0,60	1,23	40	68,71	0,33	1,99
3	9,99	0,22	2,28	22	40,13	0,44	1,83	40a	71,50	0,44	4,28
3a	10,9	0,25	7,23	23	41,92	0,78	1,73	41	72,90	0,49	1,78
4	14,33	0,31	0,96	24	42,58	0,60	<b>0,56</b>	42	73,85	0,39	1,27
5	14,95	0,45	3,51	25	43,68	0,40	1,30	43	74,78	0,41	1,37
6	17,18	0,30	4,77	26	45,64	0,45	2,72	44	76,16	0,50	1,79
7	20,21	0,45	2,12	27	51,43	0,48	7,35	45	77,38	0,39	1,62
8	21,45	0,24	1,69	28	55,03	0,62	3,86	46	78,01	0,27	1,13
9	22,35	0,39	1,80	29	56,11	0,34	1,33	47	78,96	0,37	1,75
10	23,57	0,41	1,60	30	57,48	0,46	2,02	48	80,11	0,30	2,03
11	24,48	0,26	1,67	31	58,68	0,35	1,75	49	81,22	0,29	2,22
12	25,23	0,27	2,61	32	59,85	0,43	1,77	50	81,67	0,23	1,02
13	26,60	0,35	<b>0,84</b>	33	60,68	0,40	1,18	51	82,07	0,59	<b>0,58</b>
14	27,12	0,38	3,58	34	61,31	0,35	0,99	52	83,05	0,22	1,43
15	29,15	0,29	1,99	35	62,92	0,45	2,37	53	83,94	0,24	2,28
16	30,4	0,45	2,96	36	63,96	0,27	1,70	54	84,45	0,24	1,25
17	32,78	0,50	2,37	37	64,67	0,40	1,25	55	85,48	0,23	2,59
18	34,41	0,31	2,24	38	66,18	0,47	2,05	56	86,33	0,20	2,33
19	35,95	0,50									

### 3.1.3 Identifikation der Polyphenole in einer fixen Kombination aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern

Im analysierten Extraktgemisch konnten ein Flavanol, 16 Flavanoid-Derivate und drei Phenolsäuren identifiziert werden. Die Hauptpeaks bei 350 nm sind Chlorogensäure (14), Quercetin-3-O-glucosid (35) und Quercetin-3-O-rhamnosid (38) (Abbildung 11). Die Peak-Identifikation erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und der UV/VIS Spektren der Peaks mit denen von Referenz-Substanzen. 15 Peaks im Extrakt konnten einer Referenzsubstanz zugeordnet werden. Bei zwei weiteren Flavonoidglykosiden (33, 43) konnten anhand der UV/VIS-Spektren Aussagen zum Aglykon getroffen werden.

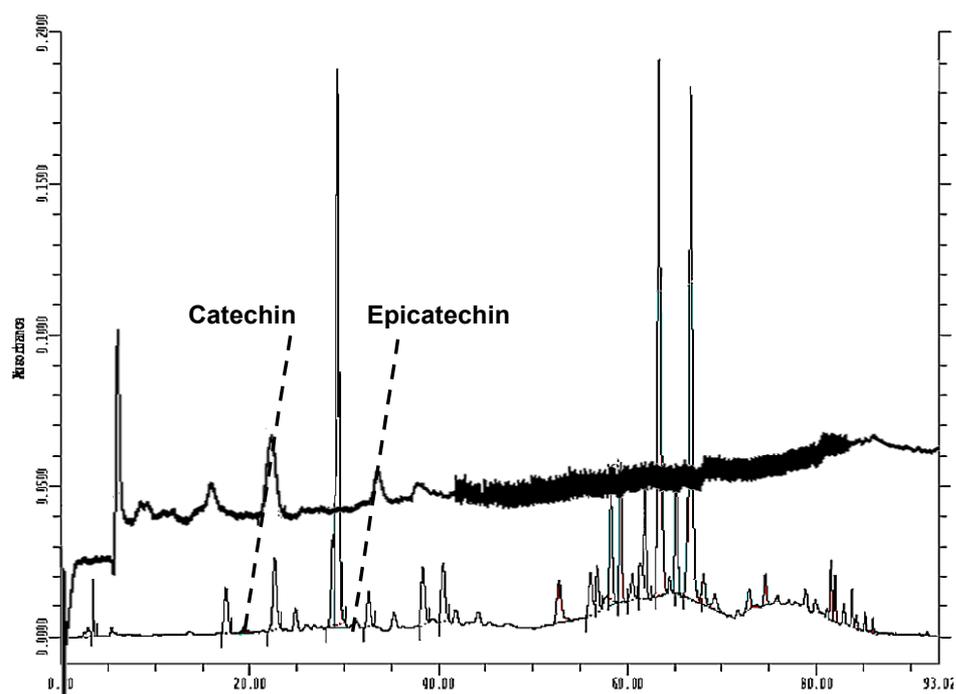


**Abbildung 11** Chromatogramm einer fixen Kombination aus Birkenblätter, Goldrutenkraut und Orthosiphonblätter enthaltenden oralen festen Arzneiform (350 nm).

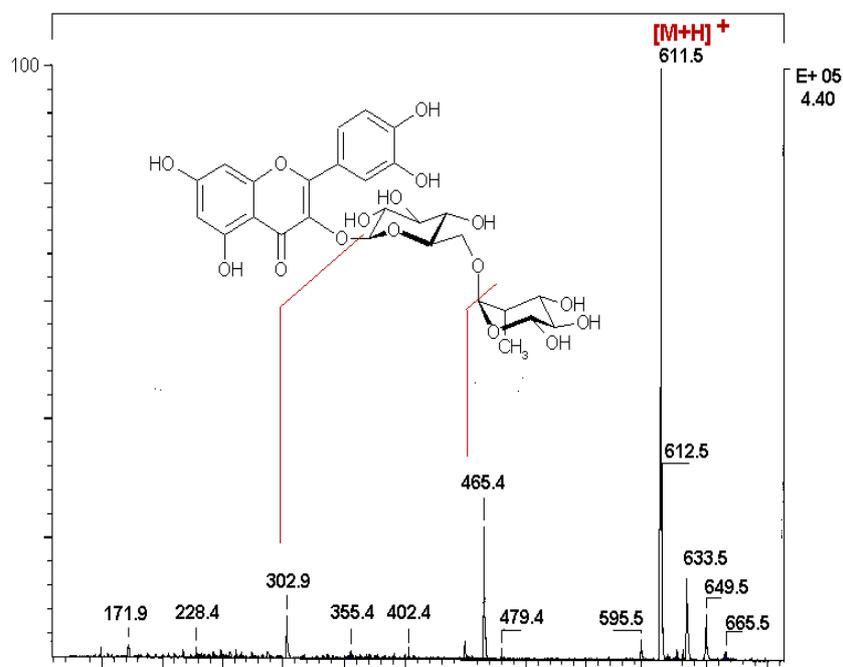
Tabelle 8 zeigt eine Zuordnung der Substanzen zu den entsprechenden Peaks im Chromatogramm. Sie enthält sowohl Informationen zur Qualität der erhaltenen Spektren als auch zu den Absorptionsmaxima der Substanzen.

Mit Hilfe einer für Procyanidine und Catechin selektiven Nachsäulen-Derivatisierungs-Methode (Treutter, Santos-Buelga *et al.* 1994) (siehe auch Abbildung 6) wurde die Identität des (+)-Catechin (6) verifiziert. Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm des Extraktgemisches bei 330 nm (unteres Chromatogramm) und nach Derivatisierung bei 640 nm (oberes Chromatogramm). Durch das in Reihenschalten zweier verschiedener Detektoren für 330 nm und 640 nm, ergibt sich ein Unterschied von ca. 3 Minuten in den Retentionszeiten der beiden Chromatogramme. Das Chromatogramm bei 640 nm (rotes Chromatogramm) zeigte neben dem Catechin-Peak (RT=32,69) auch Epicatechin (RT=50,12) als Bestandteile des Extraktgemisches. Die Identität dieser Substanzen konnte durch den Retentionszeit- und Spektrenvergleich mit Referenzsubstanzen verifiziert werden. Der Peak bei RT=26,43 könnte nach Treutter *et al.* das Procyanidin B1 sein. Mangels Referenzsubstanz konnte dies aber nicht mit letzter Sicherheit überprüft werden.

Die Identitäten der Peaks 14, 34, 35, 38, 41 und 42 konnte zusätzlich über massenspektrometrische Experimente verifiziert werden. Dazu wurde der Canephron<sup>®</sup> novo Extrakt mit HPLC chromatographisch aufgetrennt. Mittels Reihenschaltung eines UV/VIS-Detektors und eines Tandem-Massenspektrometers konnte das UV/VIS-Signal mit dem entsprechenden Massensignal der betreffenden Peaks verglichen werden. Abbildung 13 zeigt z.B. ein Produktions-Spektrum von Rutin (Quercetin-3-O-rhamnoglucosid) mit einem (M+H)<sup>+</sup>-Signal von m/z = 611.



**Abbildung 12** Chromatogramm des Extraktgemisches einer fixen Kombination der Extrakte von Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern bei 330 nm (unten) und 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung (oben) mit DMAZA (drei Minuten Retentionszeitdifferenz resultieren aus dem Versuchsaufbau).



**Abbildung 13** Produktionspektrum von Rutin (Quercetin 3-O-rhamnoglucosid).

**Tabelle 8:** Peaks aus Abbildung 11 mit Spektren-Qualität und Absorptionsmaxima.

Ifd. Nr	$\lambda_{\max}$		Spektrenqualität	Substanz	Ifd. Nr	$\lambda_{\max}$		Spektrenqualität	Substanz
	1.	2.				1.	2.		
1	265		sauber		30	255	355	sauber	Myricetin-3-O-galactosid
2	268		sauber	Gallussäure	31	327		sauber	
3	379		sauber		32	252	335	sauber	
3a	267		sauber		33	254	339	sauber	Quercetin- Derivat
4	259	291	sauber		34	289	328	sauber	Quercetin-3-O-galaktosid
5	323		sauber		35	255	352	sauber	Quercetin-3-O-glucosid
6	278		sauber	(+)-Catechin	36	253	332	sauber	Quercetin- Derivat
7	277 281				37	254	352	sauber	Quercetin-3-O-arabinofuranosid
8	275		sauber		38	255	348	sauber	Quercetin-3-O-rhamnosid
9	285	313/339			39	254	333	sauber	Quercetin- Derivat
10	230		verrauscht		40	252	339	sauber	Quercetin- Derivat
11	281				40a			verrauscht	
12	273		verrauscht		41	263	322	sauber	Isorhamnetin-3-O-rutinosid
13	325		sauber		42			verrauscht	Kämpferol-3-O-rutinosid
14	325		sauber	Chlorogensäure	43	253	366	sauber	Quercetin- Derivat
15	288		verrauscht	Epicatechin	44	272		verrauscht	
16	293	321	sauber	Quercetin- Derivat	45			verrauscht	
17	310		sauber		46	274	318	verrauscht	
18	272		verrauscht		47	265	315	verrauscht	
19	311		sauber					<b>Koeluentenpaar</b>	
20	281 266		verrauscht		48	268	322	verrauscht	<b>Koeluentenpaar</b>
21	221	267/366	sauber		49	273	313	verrauscht	
22	281	322	verrauscht		50	326		sauber	Sinensitin
23	261		sauber		51	341		sauber	6,7,4'-Methoxy-6-OH-Luteolin
24	284	307			52	281	331	verrauscht	
25	273		verrauscht		53	319		sauber	
26	267		verrauscht		54	271	337	sauber	6,7,3',4'-Methoxy-6-OH-Luteolin
27	328		sauber	Rosmariensäure	55	270	330	verrauscht	
28	295	324	sauber		56	272	329	sauber	6,7,4'-Methoxy-Scutellarein
29	290	323	sauber						

Mittels Tandem-Massenspektrometrie und Elektrospray Ionisation im positiven Modus konnten die Peaks 36, 39, 40, 43 und 47 als Derivate des Quercetins identifiziert werden.

### 3.1.4 Validierung

Die zu validierende Methode diente der rein qualitativen Beschreibung der Inhaltsstoffe eines Extrakt-Gemisches. Deshalb war bei der Validierung der Nachweis der Selektivität ausreichend.

### Selektivität

Die Identität der einzelnen Extraktbestandteile wurde über den Vergleich der Retentionszeit und der UV/VIS-Spektren entsprechender Referenzsubstanzen bestimmt. Dazu wurden die betreffenden Referenzstandards dem Extrakt zugespikt, und das UV/VIS-Spektrum des betreffenden Peaks mit dem der Referenz verglichen.

Bei einigen Substanzen wurden auf zusätzlich selektivere Detektionsverfahren wie die Massenspektrometrie (Flavonoidglycoside, Flavonoid-Aklycone) oder Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA (Catechin, Epicatechin, PC B1) genutzt.

### **Zuverlässigkeit (robustness / roughness)**

#### **Säulentemperatur**

Bei Abweichungen der Säulentemperatur um  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  von der Arbeitstemperatur ( $10^{\circ}\text{C}$ ) veränderte sich die Auflösung  $R_s$  um Werte von 0,02-0,15. Diese Änderungen wurden akzeptiert.

Bei  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  Abweichung von der Arbeitstemperatur kam es zu einer nicht mehr akzeptablen Verschlechterung der Trennung. Die Auflösung  $R_s$  veränderte sich um Werte von 0,1-1.

#### **pH-Wert**

Abweichungen vom pH der mobilen Phase ( $\text{pH} = 2$ ) von  $\pm 1,5$  führten zu Verschlechterung der Peak-Auflösung unter  $R_s = 1$ . PH-Werte über 3,5 resultierten in teilweiser Deprotonierung der phenolischen Inhaltsstoffe, und somit in einer Verschlechterung von Trennung und Peakform.

### **Chromatographie**

Als Messparameter für die Zuverlässigkeit des Trennsystems wurde die Auflösung  $R_s$  des kritischen Peakpaares 37/38 der Substanzen Quercetin-3-O-arabinofuranosid (37) und Quercetin-3-O-rhamnosid (38) herangezogen. Die an den verschiedenen Analysentagen zur Peakidentifizierung gelaufenen Extrakt-Proben wurden zur Berechnung der Reproduzierbarkeit genutzt. Damit ist der resultierende Wert eine Mischung aus Wiederhol-Standardabweichung und Intralaboratoriums-Standardabweichung. Tabelle 9 zeigt Werte aus dem Zeitraum September 1998 bis Januar 1999, und die daraus berechnete Standardabweichung.

**Tabelle 9** Wiederholstandardabweichung der Auflösung des kritischen Peakpaares Quercetin-3-O-arabinofuranosid (37) und Quercetin-3-O-rhamnosid (38).

Analysen-datum	Auflösung $R_s$ des kritischen Peakpaares 37/38	Kenngroößen
07.09.1998	2,668	Mittelwert = 2,9365  relative Standardabweichung (VK) = 10,15 %
07.09.1998	2,817	
17.09.1998	3,651	
25.09.1998	3,192	
26.09.1998	3,122	
26.12.1998	2,950	
26.12.1998	2,950	
06.01.1999	2,701	
06.01.1999	2,686	
19.01.1999	2,667	
19.01.1999	2,898	

### Systemeignungstests (system suitability)

Um die Systemeignung für die Trennung zu testen wurde hier das kritische Peakpaar der Substanzen Quercetin-3-O-arabinofuranosid (37) und Quercetin-3-O-rhamnosid (38) herangezogen. Diese Substanzen sind nur unter genauer Einhaltung der Methoden-Parameter trennbar. Dies macht sie zu einem strengen Systemeignungsparameter. Auflösungen zwischen  $R_s = 1,4$  und  $2,5$  wurden akzeptiert.

HPLC-Systemeignungstests wurden zu Beginn einer zu analysierenden Probensequenz durchgeführt. Es handelte sich um eine Kombination aus der Bestimmung der Wiederhol-Standardabweichung und der Bestimmung des „response factors“ nach einer Leitlinie des „Centers for Drug Evaluation“ der FDA (FDA and CDER 1994) (siehe dazu auch Abbildung 79). Ein Variationskoeffizient einer Mehrfachinjektion ( $n = 6$ ) von kleiner oder gleich 1% bzw. ein „response factor“ von 80-120% wurde akzeptiert.

### 3.2 Bioanalytik

Die zu untersuchenden Plasma- und Urinproben stammten aus einer Humanstudie zur Untersuchung der diuretischen/aquaretischen Wirkung einer fixen Kombination aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern. Ziel war es hierbei u.a., die aus der oralen Arzneiform resorbierten Substanzen bzw. deren Metabolite in

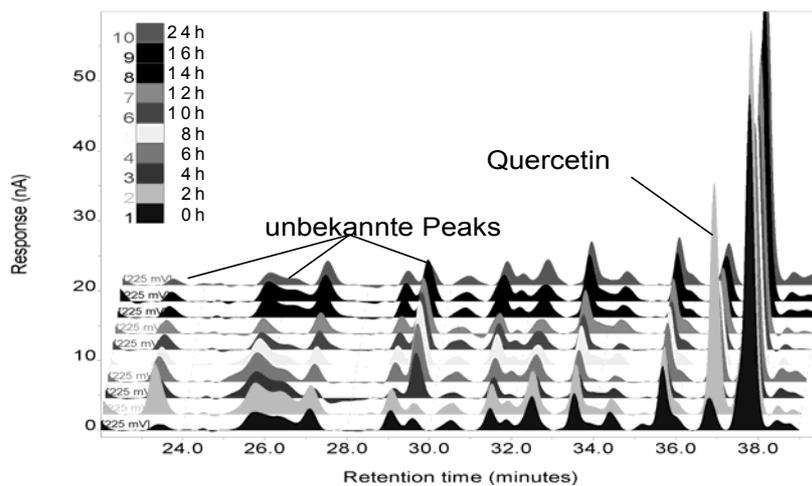
Plasma und Urin der Probanden zu identifizieren. Quantitative Betrachtungen oder pharmakokinetische Berechnungen waren nicht Ziel der Untersuchungen.

### 3.2.1 Detektion von Quercetin in Humanplasma nach Hydrolyse der Konjugate

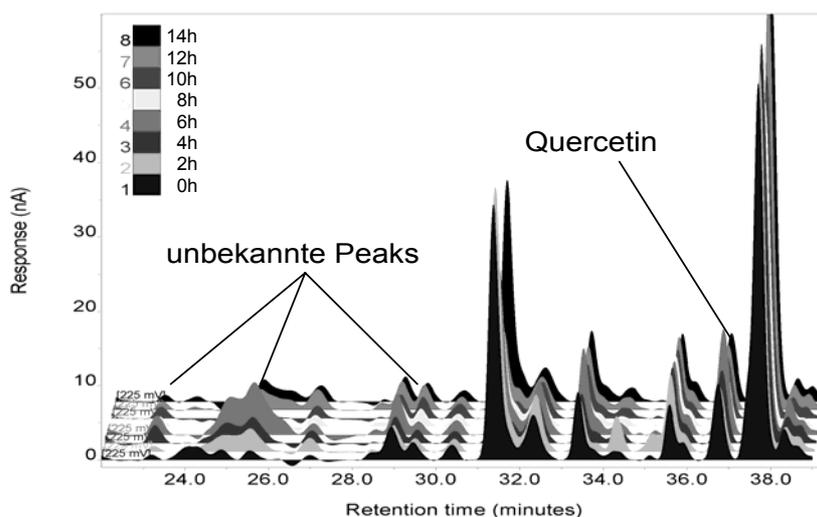
Für die chromatographische Trennung der Plasmaproben wurde ein HPLC-System unter Verwendung der RP-Chromatographie genutzt (siehe Tabelle 6). Die bei der Bestimmung der Extraktbestandteile angewendete UV/VIS-Detektion war für das Erfassen von Quercetin-Plasmaspiegeln nicht sensitiv genug. Aufgrund der für Redoxreaktionen zugänglichen Struktur des Quercetin bzw. seiner Metabolite zum einen, und der besseren Sensitivität des Verfahrens zum anderen wurde ein elektrochemisches Detektionsverfahren (CoulArray<sup>®</sup>, siehe 1.3.2) gewählt.

Die zu untersuchenden Plasma-Proben wurden nach oraler Applikation von 12 Filmtabletten (Verum) den Probanden entnommen, aufbereitet (siehe 2.5) und nach Hydrolyse der Konjugate analysiert. Die so gewonnenen Chromatogramme wurden mit denen der hydrolysierten Plasmaproben nach Einnahme von 12 Placebo-Tabletten verglichen.

In den Chromatogrammen der Plasmaproben der Probanden war nach Verum-Einnahme eine Kinetik des Quercetins (Retentionszeit  $RT = 36,8$  min) zu beobachten (Abbildung 14). In den Chromatogrammen nach Placeboeinnahme (Abbildung 15) gibt es bei dieser Retentionszeit keine Peaks, die eine Konzentrations-Zeit-Kinetik zeigten, wohl aber einen Grund-Plasmaspiegel an Quercetin. Dies kann auf die Aufnahme von Quercetinglukosiden über die tägliche normale Diät zurückgeführt werden. Die Probanden dieser Studie wurden nicht einer flavonoidfreien Diät, sondern lediglich einer Bilanzierung des Flüssigkeitshaushaltes unterzogen. Zu den erlaubten Mahlzeiten gehörte u.a. auch eine morgendliches Vollkorn-Früchte-Müsli, welches reich an Flavonoiden war. Ähnliche Beobachtungen unter Einhaltung einer Standard-Diät machten de Vries *et al.* (de Vries, Janssen *et al.* 1997).



**Abbildung 14:** Kinetik von Quercetin ( $R_t = 36,8$ ) und anderen Substanzen von Glucuronidase behandelten Plasmaproben eines Probanden nach Verum-Gabe.

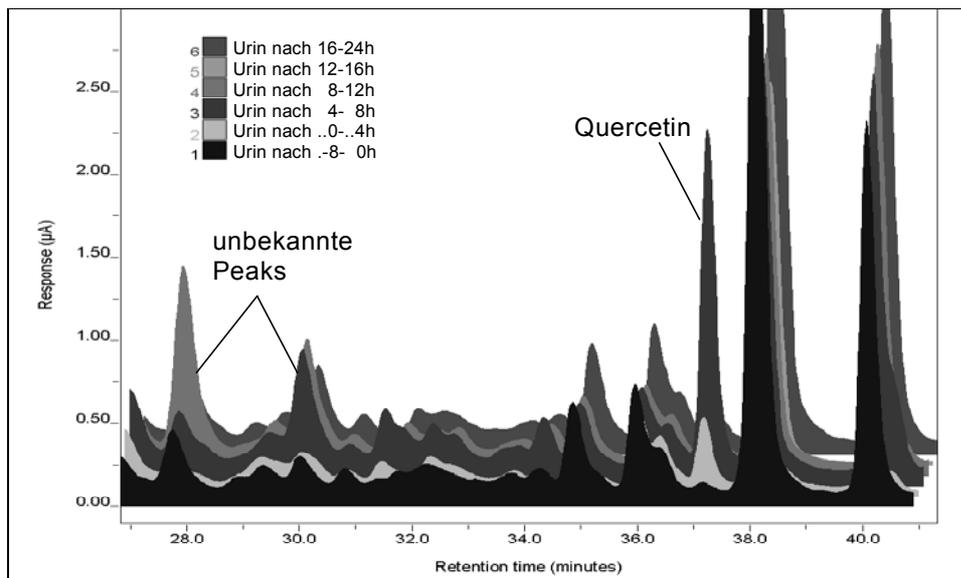


**Abbildung 15:** Kinetik von Quercetin ( $R_t = 36,8$ ) und anderen Substanzen von Glucuronidase behandelten Plasmaproben eines Probanden nach Placebo-Gabe.

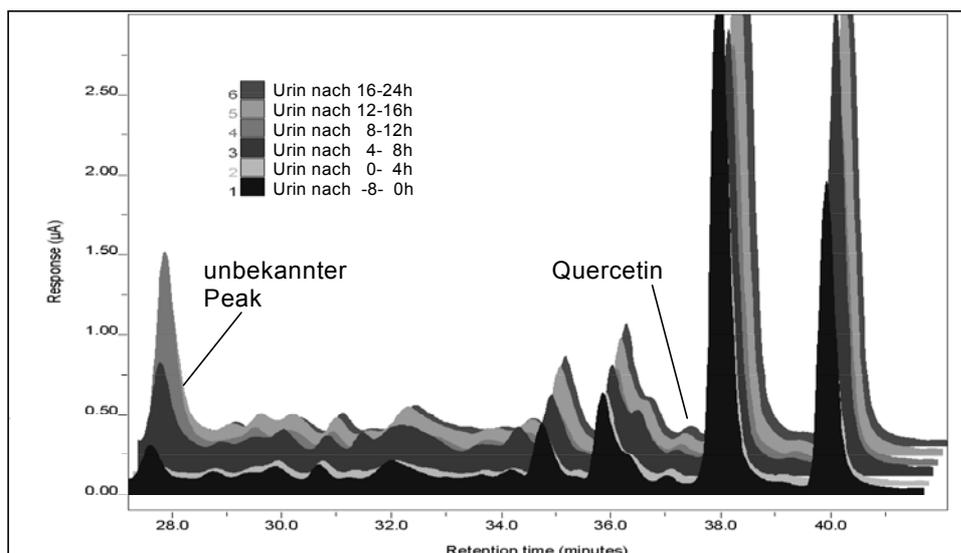
### 3.2.2 Detektion von Quercetin in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate

Nach Einnahme von Verum zeigte der Quercetinpeak ( $R_t = 37$  min) in den mit Glucuronidase behandelten Urinproben eine deutliche Kinetik (Abbildung 16). Die höchste Ausscheidungsmenge lag zwischen vier und acht Stunden nach Einnahme der Medikation. Zudem zeigten weitere Substanzen ( $R_t = 27,8$  und  $30,0$  min) zeitabhängige Konzentrationsänderungen. Die Identität dieser Substanzen ist unbekannt.

Nach Applikation der Placebo-Medikation war auch im Urin der schon in den Plasmaproben zu beobachtende Quercetin-Grundspiegel vorhanden (Abbildung 17). Der nach Verum-Gabe auftretende Peak mit  $R_t = 30,0$  wurde hier nicht detektiert, was auf seine Herkunft aus dem verabreichten Extrakt-Gemisch schließen lässt. Bei Peak  $R_t = 27,8$  handelt es sich offensichtlich um eine endogene Substanz, da sowohl Kinetik als auch Konzentration von der Gabe des Verum unabhängig sind.



**Abbildung 16:** Kinetik ausgewählter Peaks in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate bei oraler Gabe von Verum.

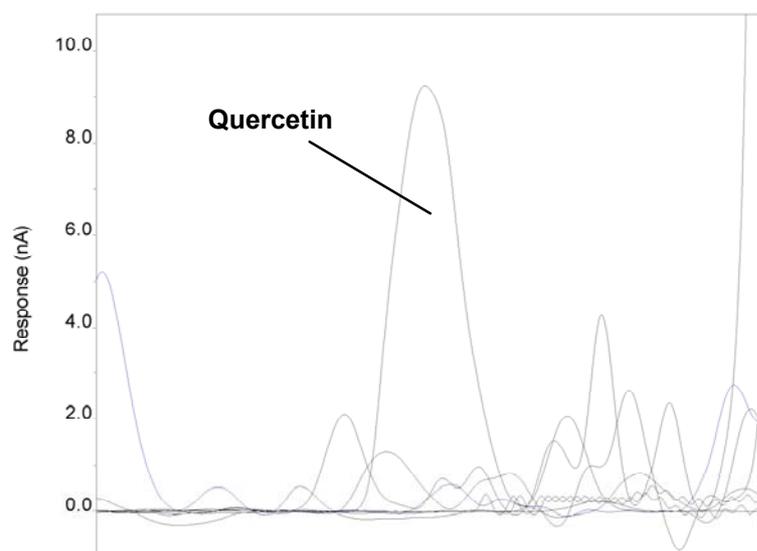


**Abbildung 17:** Kinetik ausgewählter Peaks in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate bei oraler Gabe von Placebo.

### 3.2.3 Validierung der bioanalytischen HPLC-CAD Methode zur Bestimmung von Quercetin in Humanplasma nach Hydrolyse der Konjugate

#### Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden Urin- bzw. Plasma-Blanks (Blank – Probe ohne Analyt) mit einer gespikten Urin-Matrix ( $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Quercetin, LOD) verglichen. Alle Lösungen wurden vor Analyse mit Membranfiltern ( $0,22 \mu\text{m}$ ) sterilfiltriert. Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigten die Peaks der einzelnen Urin- bzw. Plasma-Blanks keine signifikanten Überlagerungen mit dem zu bestimmenden Analyten Quercetin.

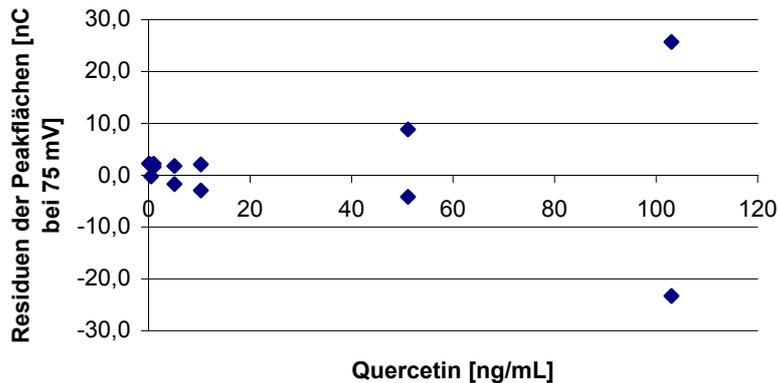


**Abbildung 18:** Chromatogramme von Urin- bzw. Plasma-Blanks und einer mit  $65 \text{ pg on column}$  (LOQ) gespikten Plasma-Probe.

#### Linearität (linearity)

Die Linearität der Methode wurde durch Doppelbestimmung von mit Hydrochinon gespikten Pool-Urin Lösungen an sieben Konzentrationsstufen bestimmt. Der Residuen-Plot zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Kalibrierwerte um die Kalibrierfunktion, so dass auf Linearität geschlossen werden konnte.

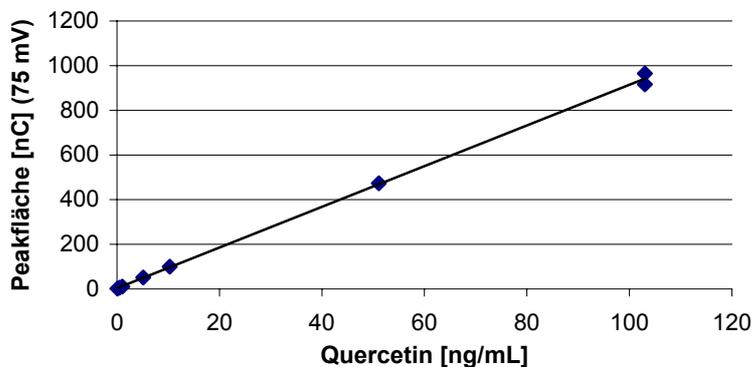
Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Kalibriergeraden beträgt  $0,999$ .



**Abbildung 19:** Residuen-Plot der Quercetin-Kalibriergerade.

### Kalibrierdaten (calibration data):

Aus den Daten zur Bestimmung der Linearität wurde die Kalibrierfunktion  $y = 9,115 x + 3,2208$  errechnet.



**Abbildung 20:** Graphische Darstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Quercetin in Humanplasma.

### Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantification)

Die LOQ wurde in Anlehnung an den Leitlinienentwurf der FDA als die Konzentration festgelegt, bei der die Richtigkeit und Präzision innerhalb des empfohlenen Richtwertes liegt ((FDA and CDER 1998); Präzision VK = 20%, Richtigkeit 80 – 120 %). Die Werte für Präzision und Richtigkeit am LOQ wurden als unterste Konzentrationsstufe der Präzisions-Messungen an drei Tagen bestimmt (Tabelle 10).

Die LOQ lag bei  $1,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Quercetin in Humanplasma bzw.  $65 \text{ pg}$  Quercetin on column.

## Präzision (Precision)

### Wiederholstandardabweichung (Inter-assay-Precision)

Die Bestimmung der Wiederholstandardabweichung wurde durch Mehrfachbestimmung ( $n = 6$ ) an drei Konzentrationsstufen ( $1,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1} = \text{LOQ}$ ,  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $55 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ermittelt. Die Messung wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt. Tabelle 10 gibt die Präzision als Variationskoeffizient (VK) an. Die an den drei Messtagen generierten Präzisionswerte lagen innerhalb der von der FDA für bioanalytische Methoden vorgeschlagenen Richtwerte (FDA and CDER 1998).

**Tabelle 10:** Daten zur Wiederholstandardabweichung der Methode.

	Konzentrationsstufe	$1,3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$55 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>Tag 1</b>	Mittelwert der Flächen [nC] (n=6)	17,8	337,1	580,7
	stabw	1,558	26,838	30,874
	<b>VK [%]</b>	<b>8,78</b>	<b>7,96</b>	<b>5,32</b>
<b>Tag 2</b>	Mittelwert der Flächen [nC] (n=6)	18,2	333,5	585,8
	stabw	0,750	20,115	13,277
	<b>VK [%]</b>	<b>4,13</b>	<b>6,03</b>	<b>2,27</b>
<b>Tag 3</b>	Mittelwert der Flächen [nC] (n=6)	21,3	318,9	548,9
	stabw	1,763	35,286	26,535
	<b>VK [%]</b>	<b>8,26</b>	<b>11,06</b>	<b>4,83</b>

### Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS)

Die Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS) wurde als prozentualer VK von 18 Messwerten einer Konzentrationsstufe angegeben. Die 18 Messwerte ergaben sich aus den sechs Einzelbestimmungen an drei Validierungs-Messtagen. An den einzelnen Messtagen wurden ausführende Laborkräfte, Reagenzien-Sätze und Fließmittel-Chargen variiert. Die an den drei Konzentrationsstufen generierten Werte zur ILS (Tabelle 11) lagen innerhalb der von der FDA vorgeschlagenen Richtwerte (FDA and CDER 1998).

**Tabelle 11:** Präzisionsdaten der Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS).

Konzentrationsstufen	Mittelwert* [µC] (n=18)	stabw	VK [%]
1,3 ng·mL <sup>-1</sup>	19,08	2,12	11,1
30 ng·mL <sup>-1</sup>	329,81	27,61	8,4
55 ng·mL <sup>-1</sup>	571,79	28,68	5,0

**Richtigkeit (Accuracy)**

Die Richtigkeit wurde durch eine Mehrfachbestimmung (n=6) des Analyten in der Urinmatrix an drei Konzentrationsstufen (1,3 ng·mL<sup>-1</sup> = LOQ, 30 ng·mL<sup>-1</sup> und 55 ng·mL<sup>-1</sup>) bestimmt. Die Messung wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt. Dazu wurden die für die Ermittlung der Präzision generierten Daten verwendet.

Die Richtigkeit an der jeweiligen Konzentrationsstufe wurde als prozentuale relative Abweichung der aus der Kalibriergeraden errechneten Fläche zum Nominalwert (Mittelwert der Mehrfachbestimmung s. Präzision, n=6) angegeben (Tabelle 12).

$$\text{Regressionsgerade: } y = 9,115 x + 3,2208$$

$$x = \text{Konzentration [ng Quercetin} \cdot \text{mL}^{-1}]$$

$$y = \text{Fläche [nC]}$$

**Tabelle 12:** Daten zur Richtigkeit der Methode.

	Ist-Konzentration [µg·mL <sup>-1</sup> ]	errechnete Fläche [µC]	Nominalwert [µC]	Abweichung vom Nominalwert [%]
<b>Tag 1</b>	1,29	14,97	17,8	16%
	31,23	287,77	337,1	15%
	55,85	512,10	580,7	12%
<b>Tag 2</b>	1,27	14,79	18,2	18%
	31,11	286,68	333,5	14%
	54,40	498,89	585,8	15%
<b>Tag 3</b>	1,31	15,16	21,3	29%
	30,00	276,57	318,9	13%
	54,86	503,08	548,9	8%

Die an den drei Messtagen bestimmte Richtigkeit der Methode lagen innerhalb der von der FDA für bioanalytische Methoden vorgeschlagenen Richtwerte (FDA and CDER 1998).

### 3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit

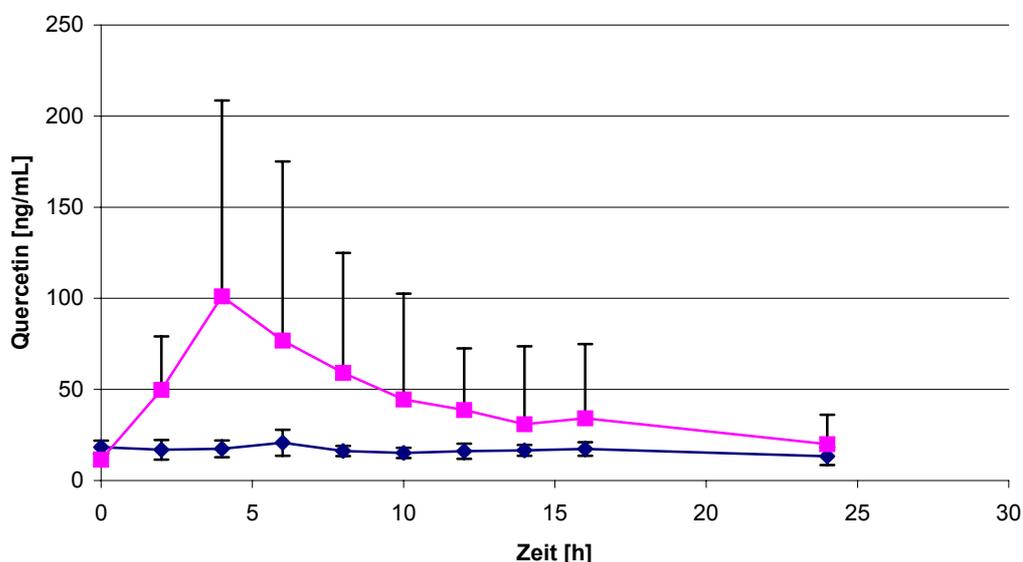
Zielsetzung der durchgeführten Studie war die Untersuchung der diuretischen Wirkung bei Einmalgabe einer oralen Arzneiform in drei verschiedenen Dosierungen bei gesunden männlichen Probanden im Vergleich zu einer oralen Placebothherapie. Dazu wurde eine prospective, randomisierte Doppelblindstudie der Phase IV in Vierfach-crossover-Design durchgeführt. Die Studienmedikation bestand aus 12 Filmtabletten (FTA, Verum), einer Kombination von Trockenextrakten aus Birkenblättern (108,9 mg/FTA), Goldrutenkraut (135,8 mg/FTA) und Orthosiphonblättern (96,8 mg/FTA). Ergänzend zu den eigentlichen Zielgrößen der Studie (u.a. osmolare Clearance, Freiwasser-Clearance) wurden Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit durchgeführt. Die damit verbundene Analyse der Plasma- und Urin-Proben beschränkte sich auf eine Teilkollektiv (n = 3) von Probanden, die sich bezüglich der primären Studien-Zielgrößen als Therapie-Responder hervorhoben. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, eine Bioverfügbarkeit von Quercetin aus einer oralen Arzneiform zu belegen. Die zu untersuchenden Plasma- bzw. Urin-Proben wurden den Probanden vor und nach oraler Applikation entnommen. Das Studienprotokoll sah dafür folgende Entnahme-Zeitpunkte vor:

- Plasma
- vor Einnahme der Studien-Medikation (Verum / Placebo),
  - 16 Stunden lang in zwei Stunden-Intervallen,
  - und 24 Stunden nach Einnahme der Studien-Medikation (Verum/ Placebo).
- Urin
- Acht-Stunden Sammel-Urin vor Einnahme der Studienmedikation,
  - und Sammel-Urin in Vier-Stunden-Intervallen über 24 Stunden
  - sowie einen terminalen Sammelintervall zwischen 24-48 Stunden nach Einnahme der Studienmedikation.

Im Zuge der Probenaufarbeitung wurden die Quercetinkonjugate mittels Glucuronidase-Assay gespalten (siehe 2.5) und resultierendes freies Quercetin bestimmt.

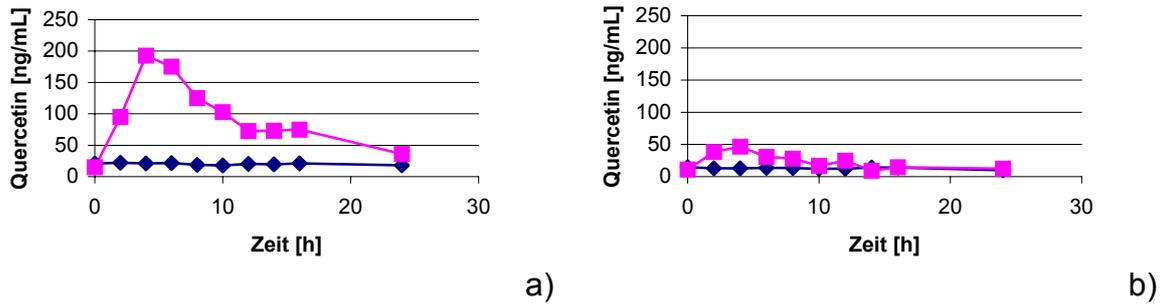
## Plasmaspiegel

Nach Gabe der Verum-Medikation wurde bei allen drei Probanden nach Hydrolyse der Konjugate ein deutlich erhöhter Plasmaspiegel an Quercetin detektiert. Die höchsten Plasmaspiegel wurden nach ca. 4 Stunden ( $t_{max}$ ) gemessen (Abbildung 21). Dies steht in Einklang mit vergleichbaren Untersuchungen, in denen die Studienmedikation ebenfalls aus Flavonoidglycosiden enthaltenden Drogenzubereitungen bestand (Aziz, Edwards *et al.* 1998) (Hollman, v.d. Gaag *et al.* 1996; Manach, Morand *et al.* 1998; Graefe, Wittig *et al.* 2001). Auffallend ist ein zweites Konzentrationsmaximum bei 16 Stunden nach Applikation der Studienmedikation.



**Abbildung 21:** Durchschnittliche Quercetin-Plasmaspiegel ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).

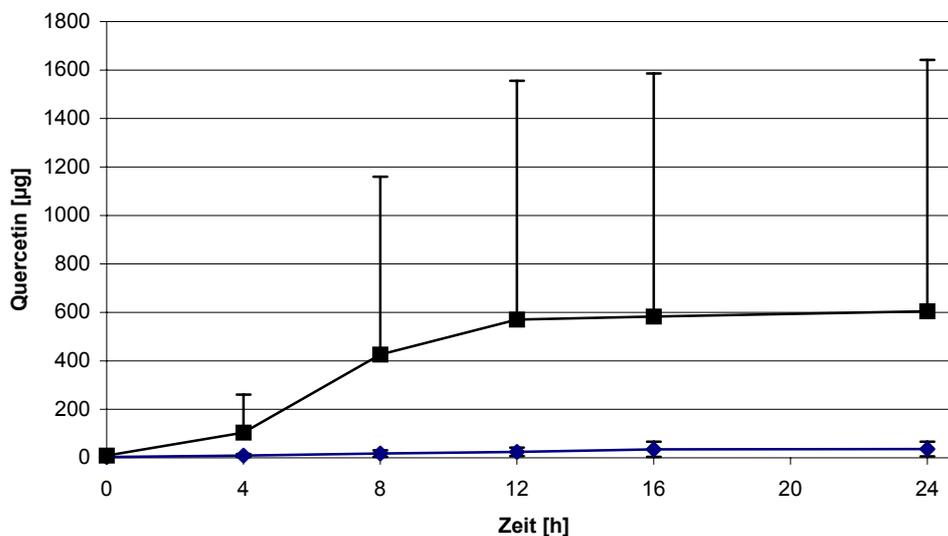
Die zu  $t_{max}$  im Plasma gemessenen Quercetin-Konzentrationen ( $c_{max}$ ) zeigten bei den drei Probanden starke interindividuelle Schwankungen. Die Plasmaspiegel variierten zwischen 50 und 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Quercetin (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Quercetin-Plasmaspiegel der Probanden 01 (a) und 08 (b) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).

### Urinspiegel

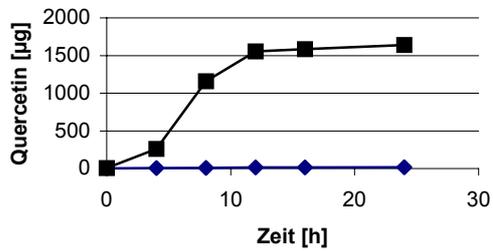
Bei Gabe der Verum-Medikation wurde nach Hydrolyse der Konjugate bei allen drei Probanden eine vom Grundlevel erhöhte Quercetin-Ausscheidung beobachtet. Der Zeitpunkt der höchsten Quercetinausscheidung war der 4-8 Stunden Intervall (Abbildung 23) nach Einnahme der Medikation.



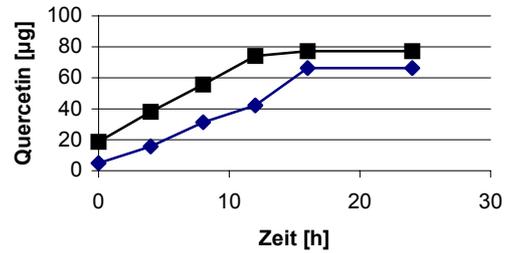
**Abbildung 23:** Durchschnittliche (n=3, Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung) kumulative renale Quercetinausscheidung nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).

Allerdings unterlag das Ausmaß der renalen Quercetinausscheidung der drei Probanden starken interindividuellen Schwankungen Abbildung 24. Dabei ist eine Korrelation zu den Quercetinplasma-Spiegeln zu beobachten. Proband 01 weist

bezüglich der Plasmaspiegel und der renaler Ausscheidung die höchsten Quercetingehalte auf, und hebt sich damit deutlich von den Probanden 06 und 08 ab.



a)



b)

**Abbildung 24:** Kumulative renale Quercetinausscheidung der Probanden 01 (a) und 08 (b) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).

## 4 Procyanidine in „Weißdornblätter mit Blüten“ enthalten- den Extrakten und Fertigarzneimitteln

Unter Verwendung zweier Methoden zur quantitativen Bestimmung von Procyanidinen (PC) wurden marktführende Crataegus-Präparate vergleichend analysiert. Dabei wurde mit einer der Methoden der Gesamtgehalt an Procyanidinen nach Derivatisierung mit DMAZA photometrisch bestimmt. Mit einer zweiten konnten nach HPLC-Trennung die mono- bis trimeren PC detektiert werden.

Bei einigen der in öffentlichen Apotheken erworbenen Präparate wurde durch Analyse mehrerer unterschiedlicher Chargen auch auf Chargenkonformität geprüft.

Tabelle 13 führt die untersuchten Präparate unter den jeweiligen Chargenbezeichnungen auf, um Sie für das Fachpublikum identifizierbar zu machen.

### 4.1 Charakterisierung der Crataegus-Präparate

#### 4.1.1 *Photometrische Gehaltsbestimmung von Procyanidinen nach Umsetzung mit DMAZA*

Die photometrische Bestimmung mit DMAZA (4-Dimethylamino-Zimtaldehyd) erfasste den Gesamtgehalt an PC in den Extrakten und Fertigpräparaten (FAM). Dem, wie unter 2.6 beschrieben hergestellten, Extraktionsansatz wurde vor der Proben-Aufarbeitung 6-Methoxyflavon als Interner Standard zugesetzt. Dieser Interne Standard diente bei der HPLC-NSD-Analyse der Korrektur von Substanzverlusten während der Proben-Behandlung. Auf die Richtigkeit der photometrischen Bestimmung hatte das zugesetzte 6-Methoxyflavon keinen Einfluss.

Aufgrund der Instabilität der Procyanidine nach Extraktion (Leipolz 1999) (Rohr 1999), musste die Probenaufarbeitung von Extrakten und FAM unter genauer Einhaltung des Analysen-Protokolls ablaufen (siehe 2.6). Die hier verwendete Methode (modifiziert nach (Mayr 1995 a)) war damit als Konventionsmethode zu betrachten. Als Kalibrierstandard wurde das Dimer Procyanidin B2 verwendet, welches aus den Fruchtschalen der Kastanienfrüchte isoliert wurde (Leipolz 1999).

**Tabelle 13:** Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *Crataegus*-Präparate des deutschen Arzneimittelmarktes (\* wie auf Umverpackung oder Beipackzettel deklariert; n.d. – nicht deklariert).

Analysen-Nr.	Arzneiform	Charge*	Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV)*	Extraktionsmittel (V/V - Volumen %, m/m – Gewicht %)	mg Extrakt pro Arzneiform oder mL (für Lösungen)*	empfohlene Tagesdosis
Ch-A-01	Dragee	97110201	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-A-02	Dragee	96110100	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-A-03	Dragee	99020202	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-A-04	Dragee	98010300	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-A-05	Dragee	95050200	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-A-06	Dragee	97100502	n.d.	n.d.	300	3 x 1 Tablette
Ch-B-01	Filmtablette	0131096	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	80	3 x 1-2 Tabletten
Ch-C-01	Filmtablette	1380697	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-C-02	Filmtablette	2531298	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-C-03	Filmtablette	1490997	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-C-04	Filmtablette	3090799	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-C-05	Filmtablette	3090799	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-C-06	Filmtablette	3371099	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	450	2 x 1 Tablette
Ch-D-01	Filmtablette	279531	4-7:1	Ethanol 45 % (V/V)	117.9	3 x 1-2 Tabletten
Ch-D-02	Filmtablette	299521	4-7:1	Ethanol 45 % (V/V)	117.9	3 x 1-2 Tabletten
Ch-E-01	Filmtablette	1010898	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	300	2-3 x 1 Tablette
Ch-E-02	Filmtablette	1010798	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	300	2-3 x 1 Tablette
Ch-F-01	Filmtablette	951082	4-7:1	n.d.	210	3 x 1-2 Tabletten
Ch-F-02	Filmtablette	752243	4-7:1	n.d.	210	3 x 1-2 Tabletten
Ch-G-01	Filmtablette	038 A	4-7:1	Ethanol 45 % (V/V)	300	3 x 1-2 Tabletten
Ch-G-02	Filmtablette	11302	4-7:1	Ethanol 45 % (V/V)	300	3 x 1-2 Tabletten
Ch-H-01	Lösung	0310797	4-6.6:1	Ethanol 45 % (m/m)	94	3 x 20-40 Tropfen
Ch-I-01	Lösung	98120699	n.d.	n.d.	487.5 Flüssigextrakt	3 x 20-30 Tropfen
Ch-I-02	Lösung	98122339	n.d.	n.d.	487.5 Flüssigextrakt	3 x 20-30 Tropfen
Ch-I-03	Lösung	97120556	n.d.	n.d.	487.5 Flüssigextrakt	3 x 20-30 Tropfen

#### 4.1.2 Bestimmung mono-, di- und trimerer Procyanidine mittels HPLC-Nachsäulenderivatisierung

Ein Aliquot der unter Absatz 4.1.1 beschriebenen Probenlösung wurde mittels HPLC-Nachsäulenderivatisierung analysiert. Aufbau und Funktionsweise sind ausführlich im Kapitel 1.2.3 beschrieben.

Das zu analysierende Procyanidin PC B2 sowie die Monomere Epicatechin und Catechin wurden über eigene Kalibrierstandards berechnet. Die Procyanidine B5 und C1 wurden als PC B2 berechnet, da Referenzsubstanzen nicht zugänglich waren.

#### 4.1.3 Gehaltsberechnung

Nach Analyse der Fertigarzneimittel mit den unter 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Methoden wurde der Gehalt an PC errechnet und auf verschiedene Ausgangsgrößen bezogen:

#### **Berechnung des PC-Gesamtgehaltes bzw. des Anteils an monomeren, dimeren und trimeren Procyanidinen im Extraktanteil der Präparate in Prozent (m/m)**

Zunächst wurde der PC-Gehalt in der aufgearbeiteten Tablettenmasse (TM) berechnet. Bei der Bestimmung des Gesamtgehaltes von PC mit der DMAZA-Methode wurde PC B2 als Kalibrierstandard und Berechnungsgrundlage verwendet (Formel 3). Bei der Einzelbestimmung der Procyanidine mit der HPLC-NSD-Analytik wurden die Oligomere PC B5, PC C1 und PC B2 ebenfalls mit PC B2 als Kalibrierstandard und die Monomere Epicatechin und Catechin über eigene Kalibrierungen berechnet (Formel 4).

$$\text{Procyanidin-Gehalt [\% TM]} = \frac{A \cdot c(\text{PCB2})K \cdot \text{Vol}_{\text{extr}} \cdot \text{Vol}_{\text{auf}}}{A(\text{PCB2})K \cdot \text{EW} \cdot \text{Vol}_{\text{ab}} \cdot 10000}$$

Dabei entspricht  $\frac{A(\text{REF})E}{c(\text{REF})E} = a$  der Steigung der Kalibrierfunktion.

TM	Tablettenmasse (bei flüssiger Zubereitung Trockenrückstand)
A	gemessene Absorption bei 640 nm
c(PCB2)K	Konzentration der Referenzsubstanz (PC B2) in der Kalibrierung
Vol <sub>extr</sub>	Menge des zur Extraktion zugesetzten Methanols [hier 15,0 mL]
Vol <sub>auf</sub>	Volumen Methanol, das dem Extrakt vor photometrischer Vermessung zugesetzt wird [hier 6,0 mL]
Vol <sub>ab</sub>	Volumen der Extraktlösung, die zur photometrischen Vermessung verwendet wird [hier 10 <sup>-2</sup> mL]
A(PCB2)K	Absorption der Referenzsubstanz in der Kalibrierung
EW	Einwaage der Tablettenmasse/Extrakt (Bianchini, G <i>et al.</i> )

**Formel 3:** Berechnung des Gesamt-Procyanidingehaltes im FAM / Extrakt als Procyanidin B2 in % (m/m) (DMAZA-Methode).

$$\text{Procyanidin-Gehalt [\% TM]} = \frac{F(PC)A \cdot F(IST)K \cdot V_{IST} \cdot c(PC)K \cdot c(IST)A}{F(IST)A \cdot F(PC)K \cdot EW \cdot c(IST)K \cdot 10000}$$

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

TM	Tablettenmasse (bei flüssiger Zubereitung Trockenrückstand)
F(PC)A	Fläche des PC in der Analyse (640 nm)
F(IST)K	Fläche des IST (6-Methoxyflavon) in der Kalibrierung (330 nm)
V <sub>IST</sub>	Menge des zur Extraktion zugesetzten IST-Lösung [hier 15,0 mL]
c(PC)K	Konzentration des PC in der Kalibrierlösung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
c(IST)A	Konzentration des IST in der zugegebenen Standardlösung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
F(IST)A	Fläche des IST in der Analyse (330 nm)
F(PC)K	Fläche des PC in der Kalibrierung (640 nm)
EW	Einwaage der Tablettenmasse (Bianchini, G <i>et al.</i> )
c(IST)K	Konzentration des IST in der Kalibrierung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

**Formel 4:** Berechnung des Gehaltes an monomeren, dimeren und trimeren Procyanidinen im FAM / Extrakt in % (m/m) (HPLC-NSD Methode).

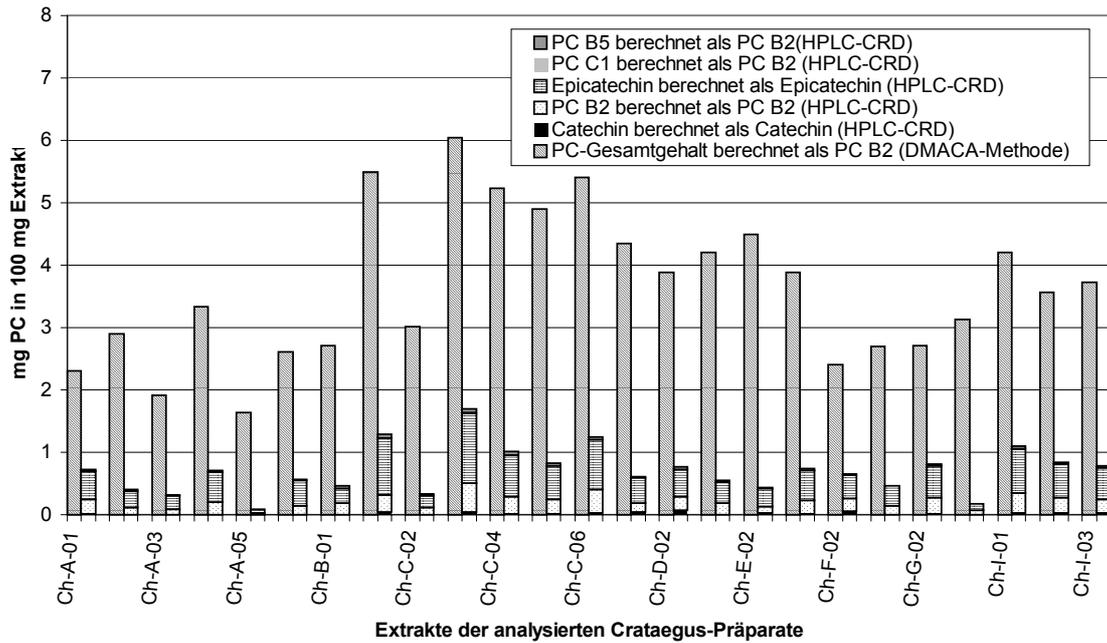
Die mit Formel 3 und Formel 4 ermittelten PC-Gehalte wurden auf den deklarierten Extraktgehalt bezogen (Formel 5). Somit konnte der PC-Gehalt im zur Herstellung des Präparates eingesetzten Extrakt berechnet werden. Die für diese Berechnung benötigten Kernmassen wurden von den einzelnen Herstellern der Präparate bereitgestellt.

$$\text{Procyanidin-Gehalt [\% ET]} = \frac{\%TM \cdot m(KM)}{dG}$$

ET	Extraktanteil der Tablettenmasse
%TM	prozentualer Gehalt an Procyanidinen [%] in der Tablettenmasse
m(KM)	Kernmasse einer Arzneiform des jeweiligen Präparates [mg]
dG	auf der Packung deklariertes Extraktanteil pro Tablette [mg]

**Formel 5:** Berechnung des Gesamt-Procyanidingehaltes bzw. Anteils an monomeren, dimeren und trimeren PC im Extraktanteil von FAM.

Abbildung 25 zeigt für jeden Extrakt der analysierten Crataegus-Präparate den mit der DMAZA-Methode ermittelten Gesamtgehalt an PC (linke Säule). Weiterhin wurde der Anteil an mono- bis trimeren Procyanidinen aufgetragen (rechte gestapelte Säule).

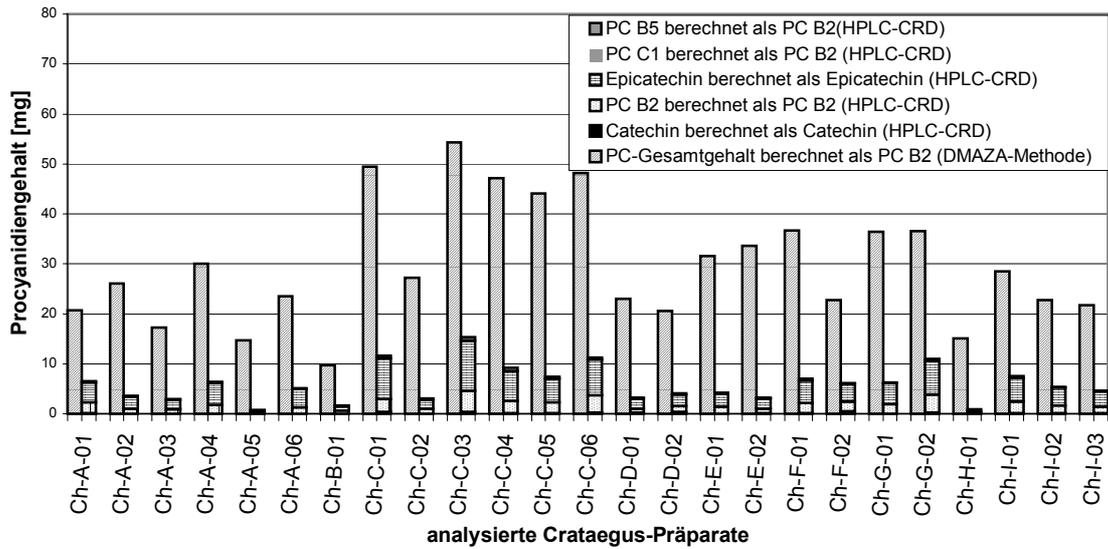


**Abbildung 25:** Gesamt-PC-Gehalt (m/m) und Gehalt (m/m) an mono- bis trimeren PC bezogen auf den im Fertigarzneimittel verarbeiteten Extrakt.

### Berechnung des PC-Gesamtgehaltes bzw. des Anteils an monomeren, dimeren und trimeren Procyanidinen in einer empfohlenen Tagesdosis

Um die analysierten Crataegus-Präparate bezüglich der für die Wirksamkeit u.a. relevanten Substanzen zu vergleichen, wurden die Procyanidin-Mengen errechnet, die durch eine Tagesdosis des jeweiligen Präparates appliziert würden. Die Tagesdosis wurde dabei der Deklaration der Hersteller auf Umverpackungen oder Beipackzetteln entnommen. Bei angegebenen Dosierungs-Spannen wurde die mittlere Dosierung errechnet.

In Abbildung 26 wurden die über eine empfohlene Tagesdosis aufgenommenen PC-Mengen der einzelnen Präparate miteinander verglichen. Dabei stellt die linke Säule den mittels DMAZA-Methode ermittelten PC-Gesamtgehalt, und die rechte, gestapelte Säule den Anteil der einzelnen mono- bis trimeren PC am Gesamtgehalt einer Tagesdosis dar.



**Abbildung 26:** PC-Gesamtgehalt bzw. Anteil an monomeren, dimeren und trimeren Procyanidinen in einer vom Hersteller empfohlenen Tagesdosis.

## 4.2 Validierung der Methoden zur Bestimmung von Procyanidinen in Crataegus-Extrakten und –Fertigprodukten

### 4.2.1 Validierung einer Methode zur Photometrischen Gehaltsbestimmung von Procyanidinen nach Umsetzung mit DMAZA

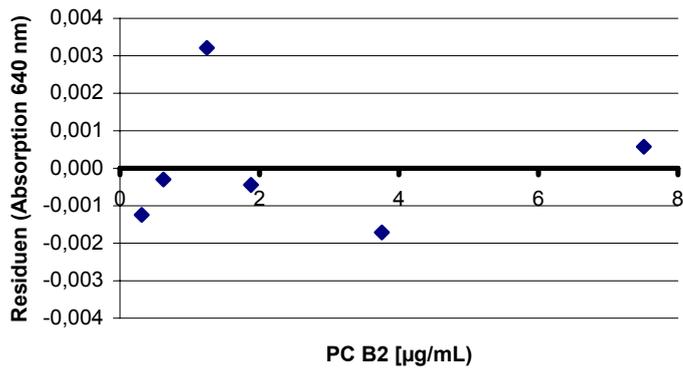
#### Selektivität

Die Selektivität der DMAZA-Methode wurde im Kapitel 1.2.4 ausführlich diskutiert.

#### Linearität

Die Linearität der Methode wurde durch Bestimmung von Procyanidin B2-Lösungen an sechs Konzentrationsstufen bestimmt. Der Residuen-Plot zeigte eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der Kalibrierwerte um die Kalibrierfunktion, so dass auf Linearität geschlossen werden konnte.

Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Kalibriergeraden betrug 1,0.

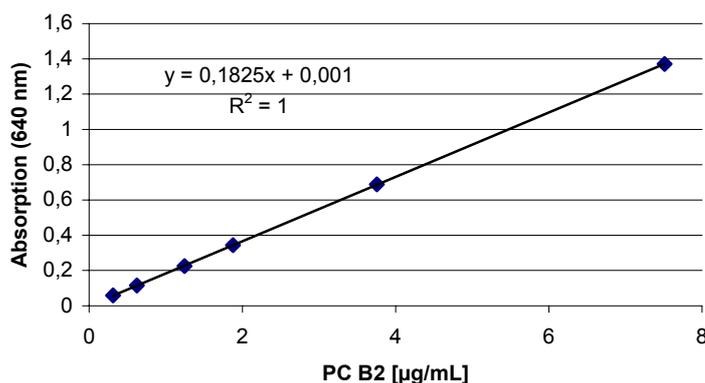


**Abbildung 27:** Residuenplot der PC B2-Kalibriergerade (DMAZA-Methode).

### Kalibrierdaten Spektrophotometrie

Die Berechnung des Gesamt-Procyanidingehaltes erfolgte als PC B2. Es wurden die Kalibrierdaten von Procyanidin B2 verwendet. Die Kalibrierlösungen wurden von einer Stammlösung (PC B2 Reinsubstanz + Methanol) in aufeinanderfolgenden Schritten mit Methanol zu PC B2 Konzentrationen innerhalb des Arbeitsbereiches verdünnt, analog zur beschriebenen Methode bearbeitet und bei 640 nm vermessen.

Kalibrierfunktion:  $y = 0,1825x + 0,001$



**Abbildung 28:** Kalibriergerade für PC B2 (DMAZA-Methode).

### Wiederholstandardabweichung

Die Inter-assay-precision wurde über Vierfach-Bestimmung des PC-Gehaltes des Crataegus-Präparates ermittelt. Dabei wurde das Präparat viermal an einem Tag aufgearbeitet und bei 640 nm spektrophotometrisch vermessen.

Da sich das Probenaufarbeitungs-Protokoll bei der Bearbeitung von festen und flüssigen Arzneiformen unterschied, wurde die Inter-assay-precision für jede der untersuchten Arzneiformen bestimmt. Die Präzisionswerte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Aufarbeitung flüssiger oder fester Proben (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Validierungsdaten zur Wiederholstandardabweichung.

Arzneiform	Analysen-Code	Charge	Mittelwert (n = 4)	Standard- abweichung	VK [%]
Dragee	Ch-A-01	97110201	1,5331	0,1033	6,74
Filmtablette	Ch-C-06	3371099	3,1192	0,2047	6,56
Flüssigkeit	Ch-I-01	98120699	0,7553	0,0187	2,48

### Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (Inter-day-precision)

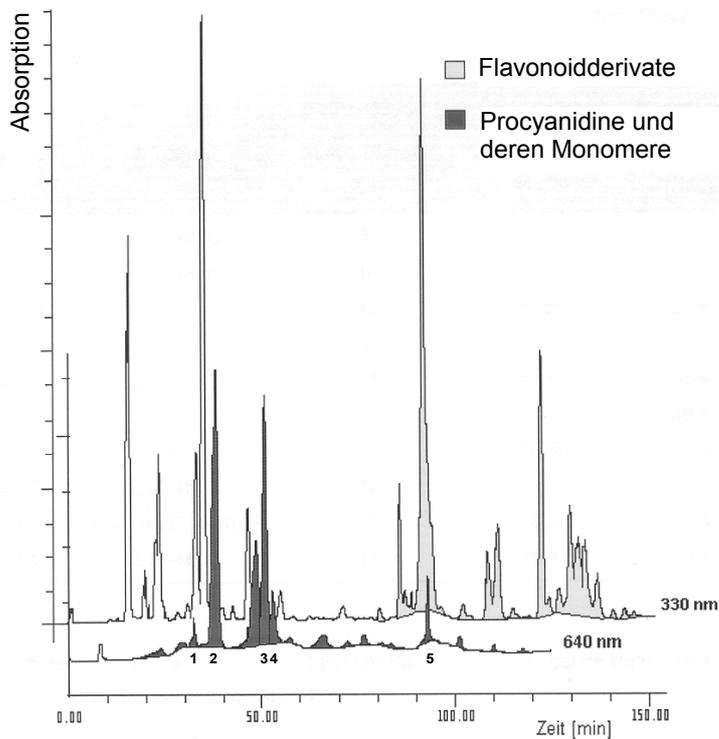
Die Intra-Laboratoriums-Standardabweichung wurde über Vierfach-Bestimmung des Procyanidingehaltes eines Crataegus-Präparates ermittelt. Dabei wurde das Präparat viermal an zwei verschiedenen Tagen aufgearbeitet und bei 640 nm spektrophotometrisch vermessen. An den zwei Tagen wurden sowohl Reagenzien-Chargen als auch ausführende Personen variiert. Der Variationskoeffizient (n = 8) betrug 8,52 %.

#### 4.2.2 Validierung einer Methode zur HPLC-NSD Bestimmung von mono-, di- und trimeren PC

### Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden Referenzsubstanzen der einzelnen Procyanidine sowohl in wässrigen Lösungen analysiert als auch Extrakten zugespikt. Die Retentionszeiten und NSD/UV-Ratios (siehe 1.3.2) in beiden Medien wurden bestimmt und miteinander verglichen. Bezüglich der Retentionszeiten und

NSD/UV-Ratios ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzsubstanzen in den Extrakten und denen in wässrigen Lösungen.

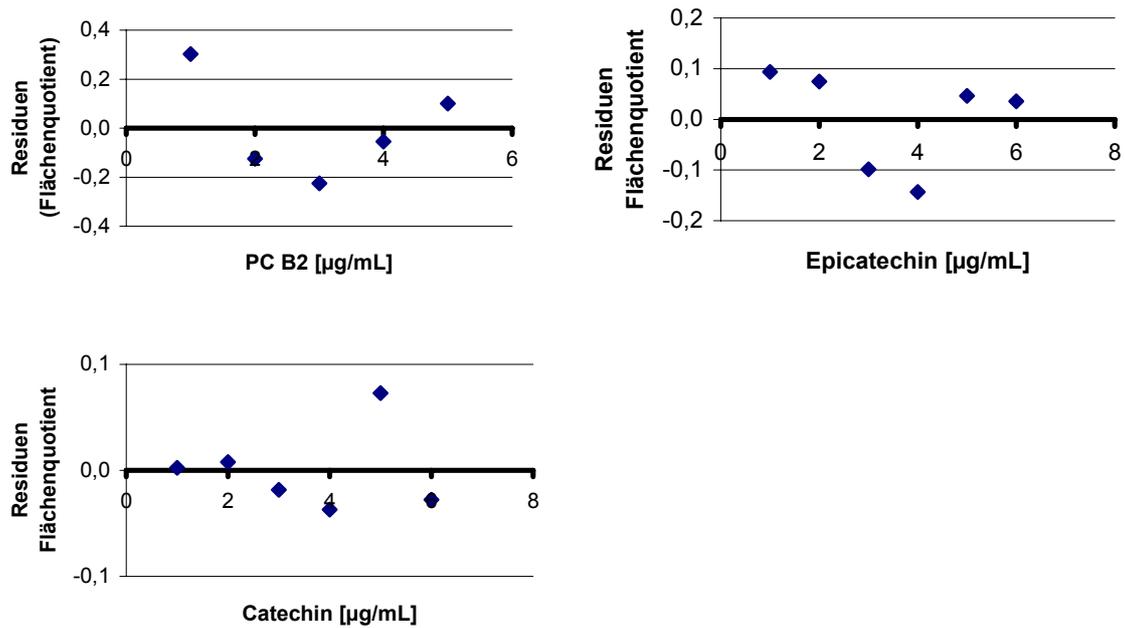


**Abbildung 29:** Trennung eines Crataegus-Extraktes mit Detektion bei 330 nm (UV) und 640 nm (HPLC-NSD, 1 = Catechin, 2 = PC B2, 3 = Epicatechin, 4 = PC C1, 5 = PC B5).

### Linearität

Der Test auf Linearität wurde graphisch mittels Residuen-Plot durchgeführt. Die Residuenplots der Kalibriergeraden von Epicatechin und Catechin zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Messwerte um die Kalibriergerade.

Der Residuenplot der PC B2 Kalibrierung ließ keine eindeutige Aussage über Linearität oder Nichtlinearität zu (Abbildung 30). Der daraus resultierende systematische Fehler konnte aber aufgrund des bei der Präzisionsbestimmung gezeigten größeren zufälligen Fehlers vernachlässigt werden.



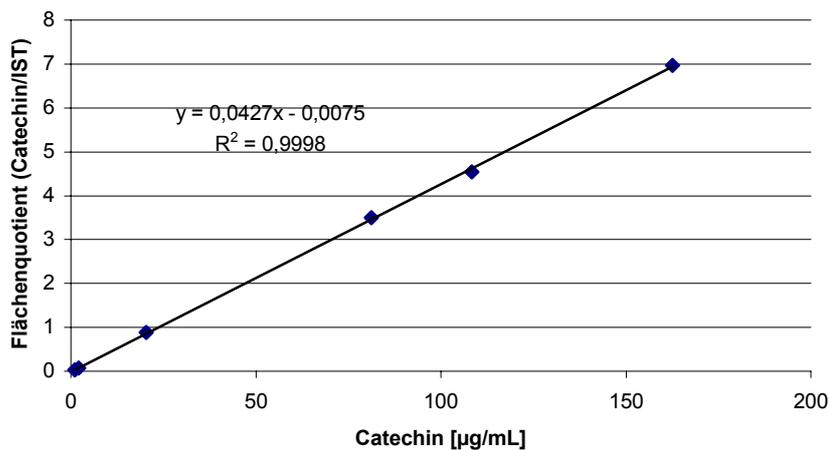
**Abbildung 30:** Residuenplots der Kalibriergeraden für Epicatechin, Catechin und PC B2.

### Kalibrierdaten zur HPLC-NSD Methode

Alle detektierten dimeren und trimeren Procyanidine wurden als Procyanidin B2 berechnet, während die Monomere Catechin und Epicatechin über eigene Kalibrierungen bestimmt wurden. Substanzverluste während der Probenaufarbeitung wurden über den internen Standard (IST) 6-Methoxyflavon korrigiert, indem die Kalibrierfunktionen (Tabelle 15) aus der Stoffkonzentration (Ordinate) und dem Peakflächen-Verhältnis von Substanz-Peak und IST-Peak (Abszisse) errechnet wurde (Abbildung 31).

**Tabelle 15:** Kalibrierdaten für die Referenzsubstanzen der einzelnen Stoffgruppen.

Stoffgruppe	Referenzsubstanz	Kalibrierfunktion	Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ )
di- und trimere PC	Procyanidin B2	$y = 0,0874x - 0,3364$	0,9965
Monomer der PC	Epicatechin	$y = 0,0534x - 0,1506$	0,9980
Monomer der PC	Catechin	$y = 0,0427x - 0,0062$	0,9997



**Abbildung 31:** Kalibriergerade von Catechin (HPLC-NSD).

### Wiederholstandardabweichung der HPLC-NSD Methode

Die Bestimmung der Inter-assay-precision war nicht sinnvoll, da aufgrund der langen Analysenzeit (4 Stunden) nur maximal drei Werte am Tag bestimmt werden konnten. Eine statistische Auswertung dieser drei Werte würde keine sinnvolle Aussage liefern. Es wurde deshalb auf die Daten der Inter-day-precision verwiesen.

### Inter-day-precision HPLC-NSD Methode

Die Inter-day-precision wurde über Vierfach- bzw. Doppel-Bestimmung des Procyanidingehaltes eines Crataegus-Präparates ermittelt. Dabei wurde das Präparat wie beschrieben an fünf verschiedenen Tagen aufgearbeitet und mittels HPLC-NSD vermessen. Während der verschiedenen Aufarbeitungen wurden ausführende Analytiker, Reagenziensätze und Fließmittelchargen variiert.

Die Präzision der Methode wurde sowohl für jeden einzelnen der Analyten, als auch für deren Summe bestimmt. Die VK-Werte sind in Tabelle 16 aufgelistet: Sie erscheinen, verglichen mit denen aus der Analyse chemisch definierter Substanzen üblichen Werten, sehr hoch. Ursachen dafür konnten die sehr komplexe Extrakt-Matrix, die Instabilität und der niedrige Gehalt der Analyten sein. Es stellten sich damit Probleme, die denen in der Bioanalytik gleichen. Betrachtet man die generierten Daten also im Kontext der für die Bioanalytik empfohlenen Richtwerte, so würde die Präzision der Methode ausreichen.

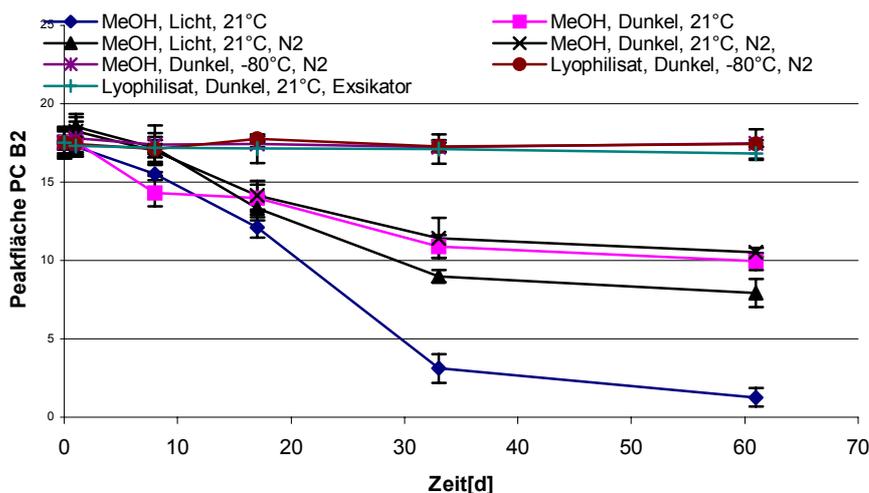
**Tabelle 16:** Validierungsdaten zur Inter-day-precision.

Analysentag	PC Gehalt [%] / berechnet als				
	mono- bis trimer gesamt / als PC B2	Catechin / als Catechin	PC B2 / als PC B2	Epicatechin / als Epicatechin	PC B5 / als PC B5
Mittelwert (n=2) Tag 1	0,5272	0,0169	0,1989	0,4840	0,0255
Mittelwert (n=2) Tag 2	0,5352	0,0190	0,2075	0,4296	0,0280
Mittelwert (n=2) Tag 3	0,5414	0,0171	0,2176	0,4755	0,0261
Mittelwert (n=2) Tag 4	0,5242	0,0155	0,2208	0,4443	0,0254
Mittelwert (n=2) Tag 5	0,5153	0,0263	0,1926	0,4657	0,0271
Mittelwert (n=2) Tag 5	0,5214	0,0222	0,1971	0,4695	0,0281
<b>Mittelwert</b>	<b>0,5275</b>	<b>0,0195</b>	<b>0,2057</b>	<b>0,4615</b>	<b>0,0267</b>
<b>sdv</b>	<b>0,0095</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0115</b>	<b>0,0205</b>	<b>0,0012</b>
<b>VK [%]</b>	<b>1,79</b>	<b>20,89</b>	<b>5,60</b>	<b>4,44</b>	<b>4,50</b>

### Stabilität der Analyte

Die Stabilität der Analyte wurde beispielhaft an PC B2 untersucht. Die Stabilitätsuntersuchungen (Abbildung 32) zeigten, dass Tageslicht die Degradation des PC B2 am stärksten fördern.

Stabilisiert werden konnte PC B2 durch Lagerung unter Inertgas (N<sub>2</sub>). Ebenso war das Procyanidin als Feststoff (Lyophilisat) stabiler als in methanolischer Lösung.



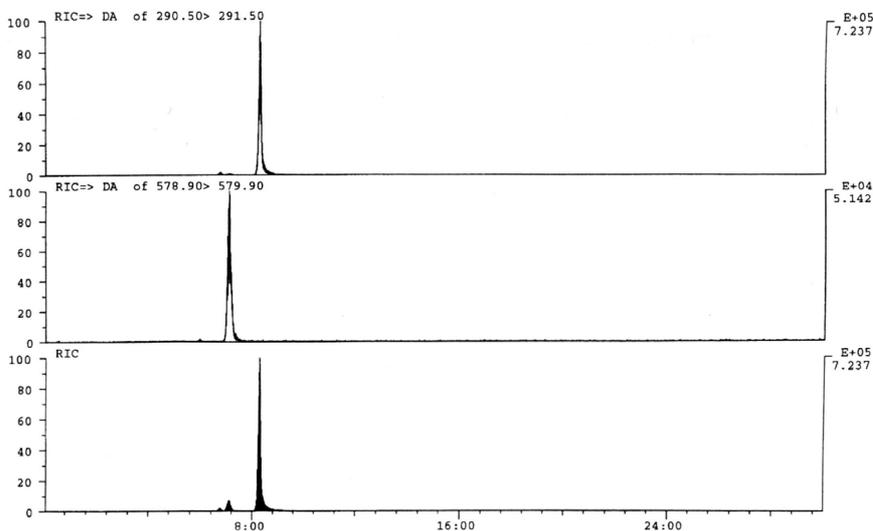
**Abbildung 32:** Stabilität (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung, n = 2) von PC B2 unter verschiedenen Lagerbedingungen.

### 4.3 Bioanalytik

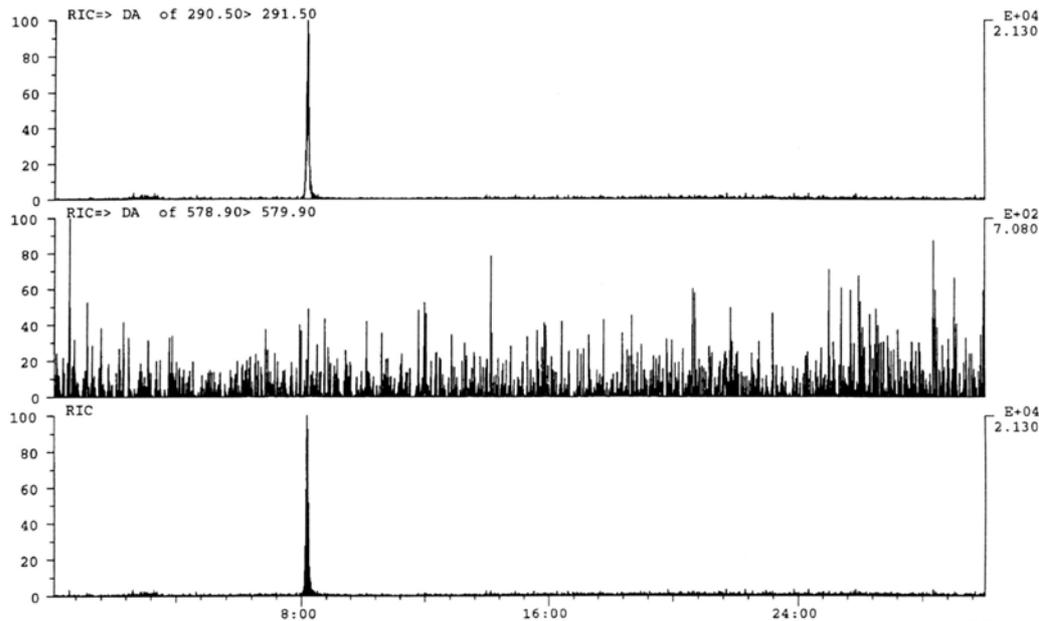
#### 4.3.1 LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Procyanidinen in Humanplasma

Für die Extraktion von Procyanidinen aus Humanplasma konnte die schon für die Quercetinextraktion verwendete Methode verwendet werden (siehe 2.6). Um Plasmaspiegel der PC bzw. ihrer Metabolite messen zu können, mussten ausreichend sensitive und selektive Methoden entwickelt werden. Aufgrund der erwarteten Konzentrationen nach oraler Applikation von Crataegus-Zubereitungen in therapeutischer Dosierung, waren die Detektionsverfahren der UV/VIS- bzw. NSD-VIS- Detektion nicht selektiv bzw. sensitiv genug. Wegen der in der Literatur beschriebenen wesentlich höheren Sensitivität (siehe Einleitung) wurden massenselektive Detektionsmethoden auf ihre Anwendbarkeit geprüft.

Zunächst wurde die Sensitivität des Verfahrens abgeschätzt. Dabei wurden die Referenzen Epicatechin und PC B2 zunächst als wässrig-methanolische Lösungen nach chromatographischer Trennung massenspektroskopisch vermessen (Parameter siehe 2.6). Abbildung 33 zeigt, dass die Signalintensität von PC B2 relativ zu Epicatechin kleiner war.



**Abbildung 33:** Retentionszeiten von Epicatechin (oben,  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und Procyanidin B2 (mitte, ca.  $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) gelöst in 50 % wässrigem Methanol. Signalvergleich im RIC (recombined ions chromatogramm, unten).



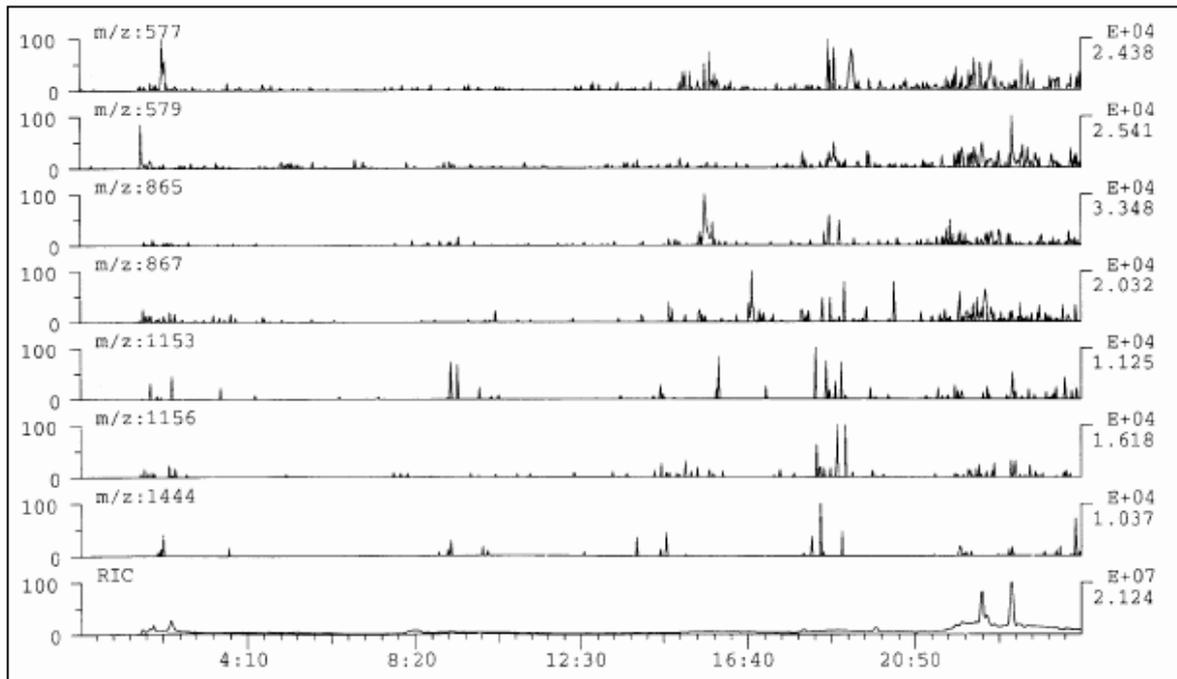
**Abbildung 34:** Epicatechin (oben,  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und PC B2 (mitte,  $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in Humanplasma. Signalvergleich im RIC (recombined ions chromatogramm, unten).

Danach wurden die Referenzsubstanzen zu Humanplasma zugespielt und mit identischen Mess-Parametern analysiert. Abbildung 34 zeigt ein deutliches Signal für Epicatechin ( $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ ng}$  on column), während sich PC B2 in einer Konzentration von ca.  $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,05 \text{ ng}$  on column) unterhalb des LOD befindet.

Die LOD im Plasma für Epicatechin und Catechin lagen im Bereich um  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , für PC B2 und Quercetin um  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Geräteparameter siehe 2.6). Damit war die Sensitivität der MS-Detektion vergleichbar mit der der UV/VIS- ( $\text{LOD}_{\text{PCB2/Epicat.}} \sim 30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), aber wesentlich besser als die der NSD- ( $\text{LOD}_{\text{PCB2}} = 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $\text{LOD}_{\text{Epicat.}} = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Detektion.

#### 4.3.2 Bestimmung von Procyanidinen in Humanplasma mittels LC-MS/MS

In einer Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Procyanidinen wurde Crataegutt<sup>®</sup>novo 450 oral appliziert. Die 4 verabreichten Filmtabletten enthielten zusammen  $1800 \text{ mg}$  Extrakt aus Weißdornblätter mit Blüten (DEV 4-6.6 : 1, Auszugsmittel Ethanol 45% (m/m)). Zwei Stunden nach Gabe der Studienmedikation wurden den drei Probanden Blutproben entnommen und daraus Plasma gewonnen. Nach einer Probenaufarbeitung (siehe 2.6) wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert.



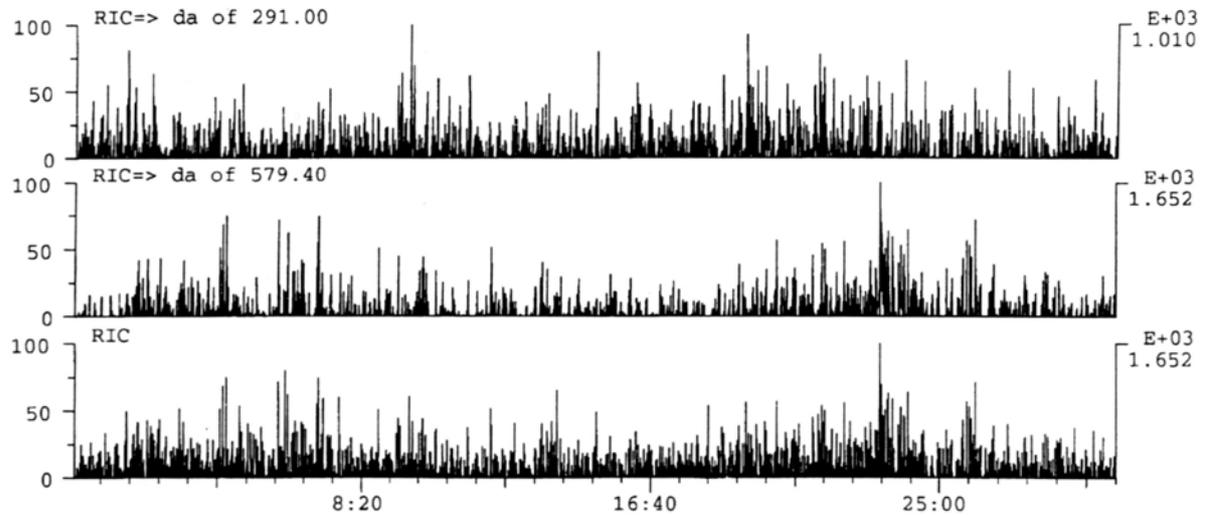
**Abbildung 35:** Massenspuren relevanter Massen für PC verschiedenen Polymerisationsgrades in Plasma zwei Stunden nach Gabe von vier Tabletten Crataegutt@novo 450.

Zunächst wurde auf relevante Massen im Bereich 50–2000 amu gescannt. In keiner der entnommenen Plasmaproben konnte nach Aufarbeitung und Hydrolyse der jeweiligen Konjugate (siehe Methodenteil) eines oder mehrere der gesuchten Flavonoide / Procyanidine oberhalb des LOD bestimmt werden. Abbildung 35 zeigt die Massenspuren relevanter Massen für PC verschiedener Polymerisationsgrade nach chromatographischer Trennung in humanem Plasma, zwei Stunden nach Gabe von 4 Filmtabletten des Crataegus-Präparates. Keine der aufgezeichneten Massenspuren zeigte auswertbare Signale.

Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, wurden SRM-Experimente (siehe 1.3.2) durchgeführt (Tabelle 17). Der LOD konnte dabei ca. um den Faktor 10 gesenkt werden.

**Tabelle 17:** SRM-Experimente zur Bestimmung von Quercetin, PC B2 und Epicatechin.

Analyt	precursor [M+H] <sup>+</sup>	Produktionen	Stoßenergie [eV]
Quercetin	303	153	30
		229	50
PC B2	579	291	20
		427	20
Epicatechin	291	139	15
		165	15

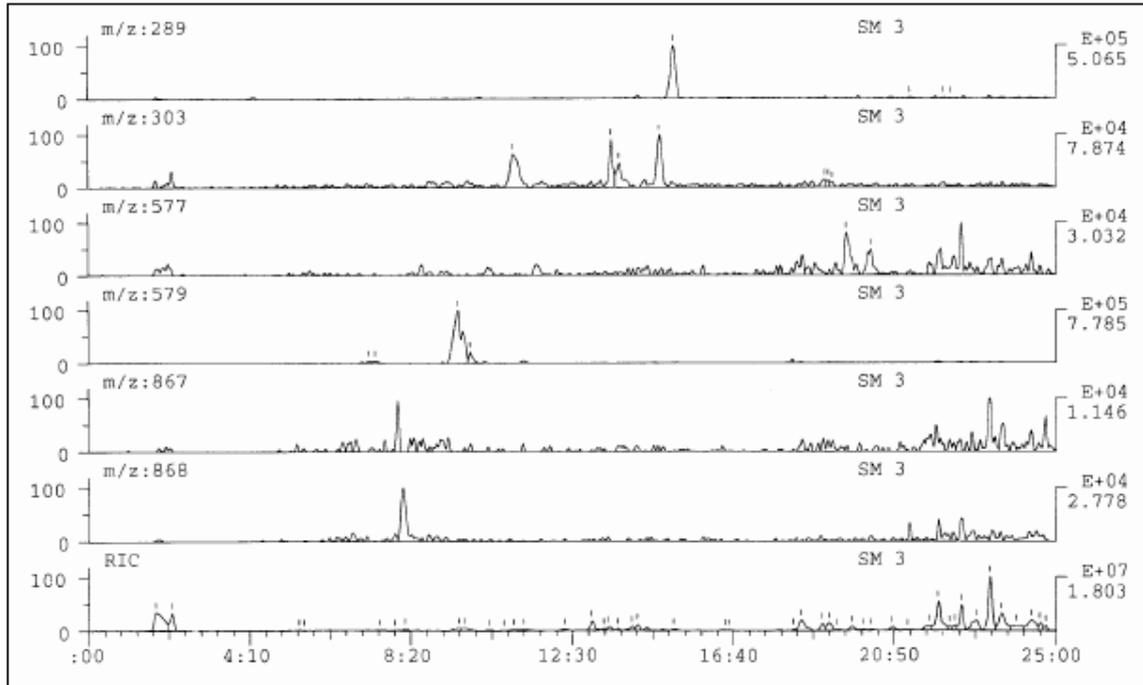


**Abbildung 36:** Massenspektren der SRM-Experimente auf Epicatechin (oben) und PC B2 (mitte) in Humanplasma (RIC = recombined ions chromatogram).

In den untersuchten Plasma-Proben zeigten sich keine signifikanten Signale von Epicatechin ( $\text{LOD}_{\text{SRM}} = 1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und PC B2 ( $\text{LOD}_{\text{SRM}} = 5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Abbildung 36). Damit waren diese Substanzen mit der angewandten LC-MS/MS Methode nicht nachweisbar.

#### 4.4 Übertragung der LC-MS/MS Methode von der Bioanalytik auf die (Phyto)analytik in Crataegus-Fertigpräparaten

Abbildung 37 zeigt die Massenspektren relevanter Massen für Procyanidine (PC) verschiedenen Polymerisationsgrades in einem Extrakt von Crataegutt<sup>®</sup>novo 450 nach chromatographischer Auftrennung. Dabei wurden zunächst alle auftretenden Massen zwischen 200 und 2000 amu (atomic mass unit) aufgezeichnet. Die für Procyanidine relevanten Massen der A- und B-Reihe konnten zur besseren Übersicht aus dem Gesamtionenstrom extrahiert und mittels Massenspektren graphisch dargestellt werden.



**Abbildung 37:** Ausgewählte Massenspektren relevanter Massen für PC verschiedenen Polymerisationsgrades in einem Extrakt von Crataegutt® novo 450.

Signale traten bei Procyanidinen niedrigen Polymerisationsgrades unterhalb 1000 amu auf, vor allem die  $[M+H]^+$  Massen von Epicatechin ( $m/z = 289$ ) und die von PC A2 ( $m/z = 577$ ), B2 ( $m/z = 579$ ) und C2 ( $m/z = 867$ ). Außerdem erhielt man vier deutliche Signale bei der Massenspur von  $m/z = 303$ . Es handelte sich dabei wahrscheinlich um Fragmente von Quercetinglucosiden, die unter Neutralverlust des Zuckers das  $[M+H]^+$ -Ion das Aglykon Quercetin bildeten. Oberhalb 1000 amu waren die auftretenden Signale nicht als signifikante Peaks zu werten. Es handelte sich hierbei wohl eher um in der Gasphase des Ionensprays gebildete Artefakte.

## 5 Analyse phenolischer Inhaltsstoffe aus Bärentraubenblätter-Extrakt enthaltenden Fertigarzneimitteln in Urin

### 5.1 Methodenentwicklung

Die zu entwickelte Methode diente der Analyse von Hydrochinon in Human-Urin. Dazu musste Hydrochinon chromatographisch sowohl von Arbutin-Metaboliten als auch Arbutin selbst abgetrennt werden. Authentische Proben stammten von einer klinischen Studie, in der die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus von Arbutin aus einem Bärentraubenblätter-Extrakt enthaltenden Phytopharmaka untersucht wurden. Ausgangspunkt und Ziele der Probandenstudie wurden in der Einführung (1.4.1) dargestellt.

Die für die Methodenentwicklung benötigten Referenzsubstanzen

- Hydrochinon
- Benzochinon
- Hydrochinonsulfat und
- Arbutin

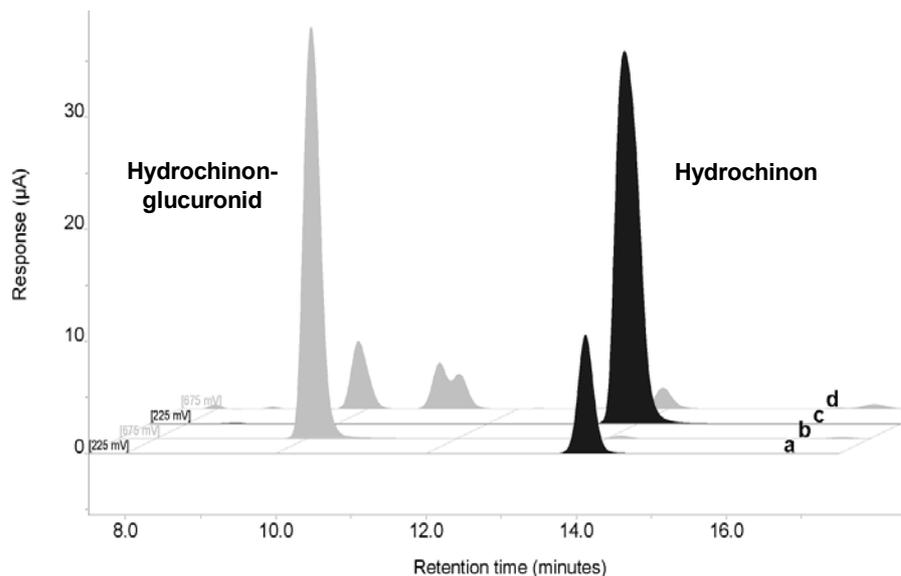
waren kommerziell erhältlich.

Hydrochinonglucuronid musste biochemisch synthetisiert werden.

#### 5.1.1 Biochemische Synthese des Standards Hydrochinonglucuronid

Zur biochemischen Synthese von Hydrochinonglucuronid wurde Hydrochinon mit aktivierter Glucuronsäure und aus Rattenleber isolierten Mikrosomen umgesetzt (Michels 2000). Der Reaktions-Cocktail enthielt nach Abschluss der Reaktion Hydrochinonglucuronid und Reste des nicht umgesetzten Ausgangsstoffes Hydrochinon (Abbildung 38, Chromatogramme a und b). Die Identität des biochemisch synthetisierten Hydrochinonglucuronides wurde durch enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase verifiziert. Abbildung 38 c und d zeigt die Chromatogramme des Hydrochinonglucuronid enthaltenden Reaktionsansatzes vor und nach Inkubation mit molusker  $\beta$ -Glucuronidase. Nach Inkubation mit dem Enzym war eine deutliche Abnahme des Hydrochinonglucuronids und eine gleichzeitige Zunahme von freigesetztem Hydrochinon zu beobachten.

Bei der Nutzung von  $\beta$ -Glucuronidasen zur Identifizierung von Glucuroniden war zu beachten, dass dieses Enzym nicht nur selektiv Glucuronide spaltet, sondern in gewissem Maße auch Sulfate und Glucoside. Im vorliegenden Reaktions-Ansatz war der Einsatz dennoch sinnvoll, da in diesem *In-vitro*-Ansatz weder Sulfate noch Glucoside des Hydrochinon anwesend waren.



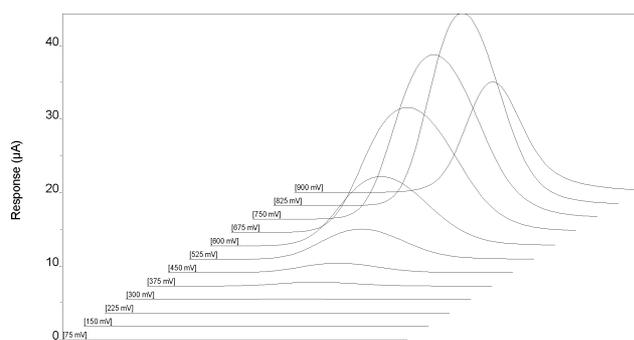
**Abbildung 38:** Chromatogramme des Rattenleber-Mikrosomen Assays vor (a @ 225 mV, b @ 675 mV) und nach (c @ 225 mV, d @ 675 mV)  $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung bei 7 % Anteil organischer Phase.

### 5.1.2 Coulometrische Array Detektion von Hydrochinon und Hydrochinon-Konjugaten

Zur Bestimmung der Analyten in wässriger bzw. Urin-Matrix wurde ein auf dem Prinzip der potentiostatischen Coulometrie beruhender Multi-Elektroden Detektor (CAD: coulometric array detection) eingesetzt (siehe auch Kapitel 1.3.2). Durch die Reihenschaltung von 12 Graphitelektroden konnten ebenso viele Elektrolysespannungen parallel angelegt werden. Für phenolische Strukturen hatten sich dabei in Vorversuchen Potentiale von 75 – 900 mV (Elektroden-Setup in 75 mV Schritte) als geeignet erwiesen.

Mit Hilfe des mit einer HPLC-Anlage gekoppelten CAD-Detektors wurden zunächst substanzspezifische diskrete Voltammogramme der Analyten generiert (Abbildung 39 und Abbildung 40). Neben der rein optischen Beurteilung dieser Voltammogramme sind eingehendere qualitative Aussagen möglich, wenn man innerhalb des Peak-

Klusters das Verhältnis des größten Peaks (dominanter Kanal) zu dem jeweiligen Vorgänger (vorheriger Kanal) bzw. Nachfolger (folgender Kanal) betrachtet. Der Vergleich der Peakhöhen-Verhältnisse eines Analyten mit dem der entsprechenden Referenzsubstanz wurde zur Substanz-Identifizierung in der Urin-Matrix herangezogen (Tabelle 18).



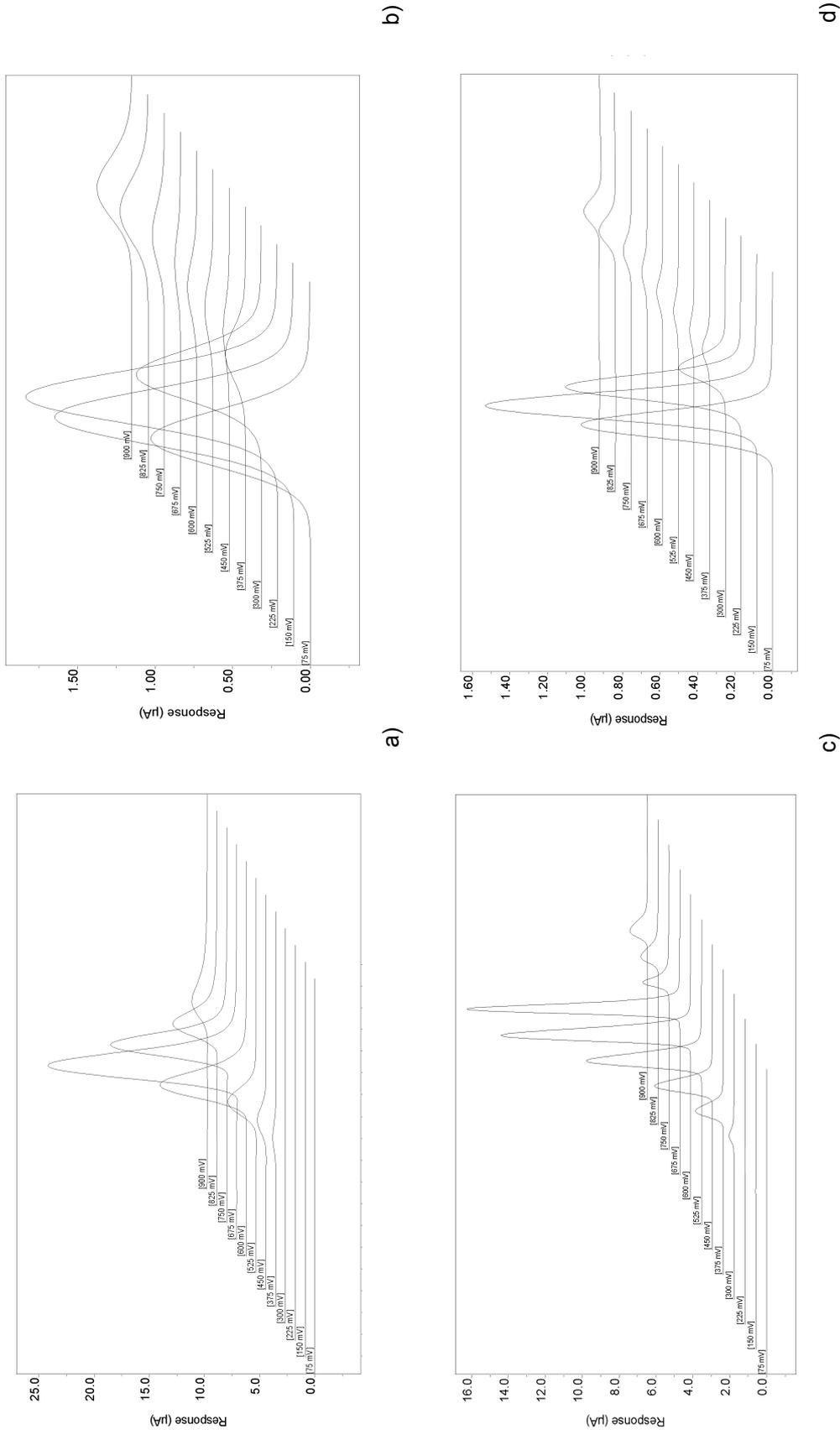
**Abbildung 39:** Voltammogramm der Referenzsubstanz Hydrochinonglucuronid (75-900 mV, 75 mV Schritte).

Eine **Quantifizierung** des Analyten ist über die Peakfläche (AUC unter dem Voltammogramm) des größten Peaks im Cluster (dominanter Kanal) möglich. Die so erhaltenen Flächenwerte können in Relation zu einer externen/internen Kalibrierung gesetzt werden.

### 5.1.3 Einfluss des Lösungsmittels und der Analyt-Konzentration auf die Eigenschaften des Voltammogrammes

In einem Vor-Validierungsschritt wurde der Einfluss von pH-Wert, Lösungsmittel und Analyt-Konzentration auf die Voltammogramm-Charakteristika (dominanter Kanal, Peak-Kluster) untersucht.

Eine **pH-Wert** Änderung der mobilen Phase zwischen pH = 3,4 und pH = 2 zeigte weder eine Auswirkung auf das Voltammogramm noch auf das chromatographische Verhalten des Analyten. Dies resultierte aus der schwachen Azidität der Analyte. Als schwache Säuren lagen die Moleküle innerhalb des getesteten pH-Bereiches in protonierter Form vor.



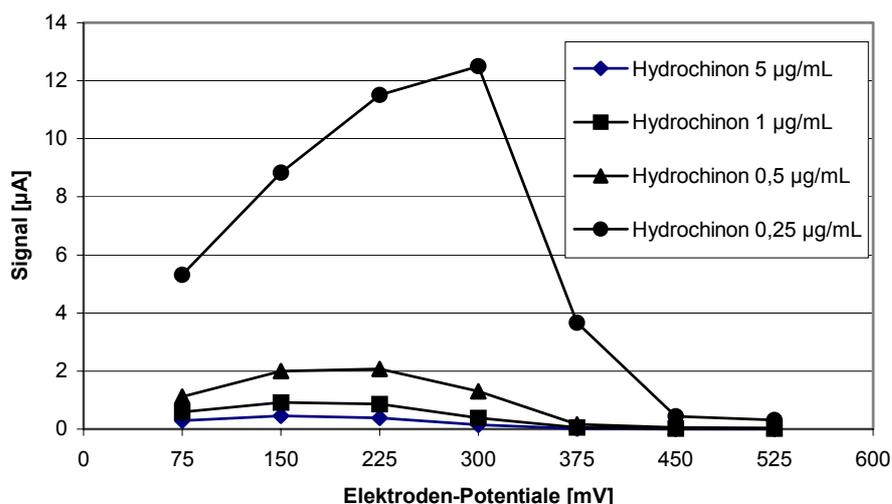
**Abbildung 40 (a-d):** Voltammogramme der Referenzsubstanz-Lösungen ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) von Arbutin (a), Hydrochinonsulfat (c), Benzochinon (d) und Hydrochinon (b),  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , (75-900 mV, 75 mV Schritte).

Der Einfluß des **Lösungsmittels** auf die erhaltenen Voltammogramme war minimal. So zeigte der Peakhöhen-Ratio-Vergleich der Hydrochinon Peak-Kluster in wässrigem 20 %-igem Methanol und in Humanurin eine Übereinstimmung von über 90 % (Tabelle 18).

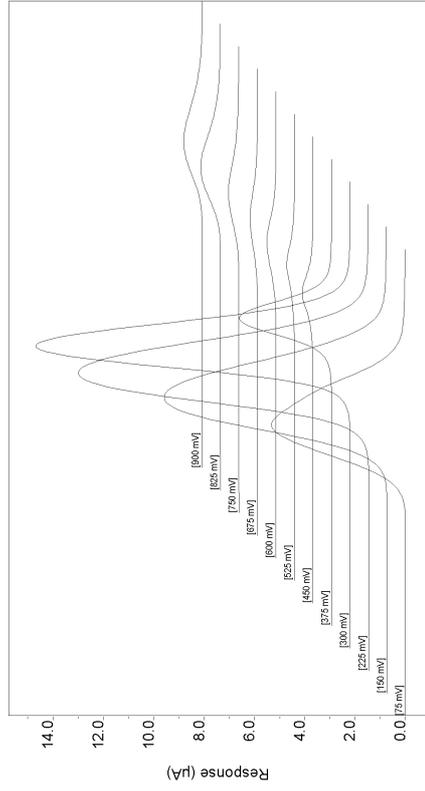
**Tabelle 18:** Peakhöhen-Ratio-Vergleich (Cullison and Gamache 1997) der Peak-Kluster der Hydrochinon-Referenzsubstanz in wässrigem 20 %-igem Methanol mit *in vivo* freigesetztem Hydrochinon in Humanurin.

Peakhöhen-Ratio -Vergleich	3/2 (dominanter Kanal/ vorheriger Kanal)	3/4 (dominanter Kanal/ nachfolgender Kanal)
Hydrochinon Standard	1,06	2,02
Hydrochinon in Urin	1,17	1,88
Richtigkeit [%]	90,6	93,1

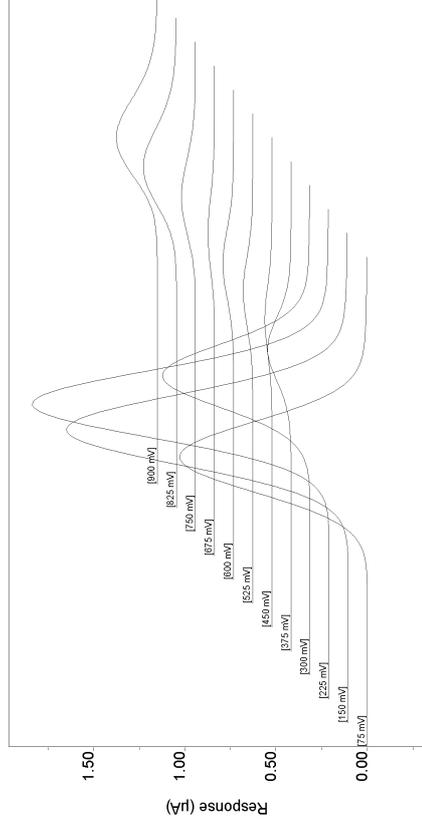
Das relative Verhältnis der Potentiale im Voltammogramm wurde im linearen Bereich kaum durch die **Stoffkonzentration** beeinflusst. Allerdings wurde bei Verringerung der Konzentration eine leichte Betonung der niedrigeren Potentiale beobachtet (Abbildung 42 b-d). Oberhalb des linearen Bereichs kam es durch unvollständigen Umsetzung des Analyten zu einer Abflachung des Signals. Da andere, noch nicht gesättigte Elektrodenpotentiale weiterhin linear stiegen, änderte sich damit die Form des Peak-Klusters (Abbildung 42a und Abbildung 41).



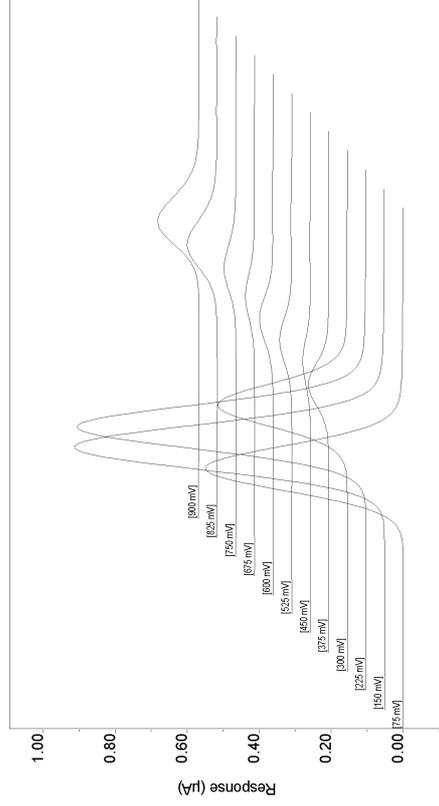
**Abbildung 41:** Konzentrationsabhängige Veränderung des Peak-Klusters von Hydrochinon im (untere drei Kurven) und außerhalb (obere Kurve, Sättigung) des Arbeitsbereiches.



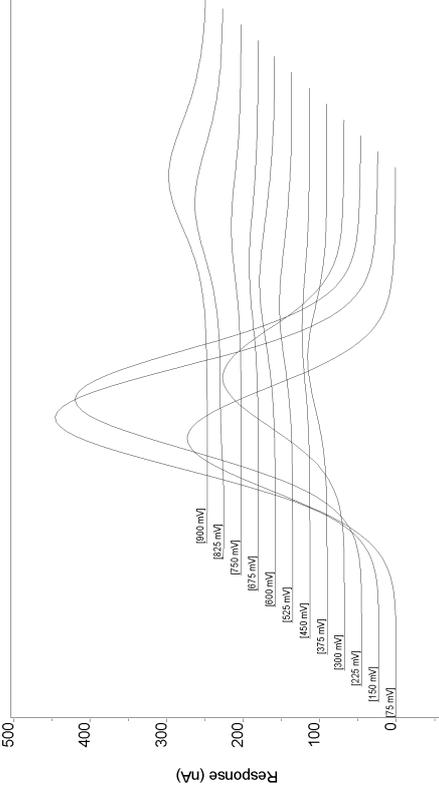
a)



b)



c)



d)

**Abbildung 42 (a-d):** Voltammogramme (12 Potentiale 75-900 mV) von wässrig-methanolischer Hydrochinon-Lösungen verschiedener Konzentrationen ( $a = 5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $b = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $c = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $d = 0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

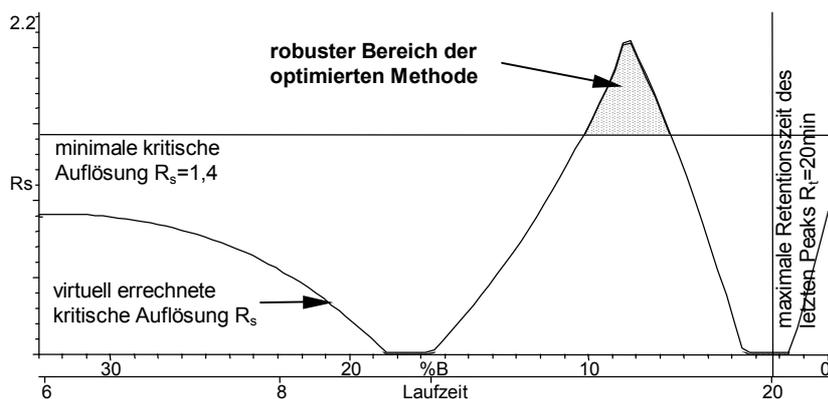
#### 5.1.4 Software-gestützte Methodenentwicklung

Zunächst wurde eine Methode zur Trennung der im wässrigen Medium gelösten o.g. Referenzsubstanzen entwickelt. Der Hydrochinonglucuronid und Hydrochinon enthaltende Rattenleber-Microsomen-Ansatz (RMA, Kapitel Material und Methoden) wurde mit den Standards Hydrochinonsulfat und Arbutin gespikkt und diente als Referenzsubstanz-Mischung (RSM). Zur selektiven Bestimmung von Hydrochinon musste dieses chromatographisch von Arbutin, von den beschriebenen systemischen Metaboliten Hydrochinonglucuronid und Hydrochinonsulfat und vom möglichen Oxidationsprodukt Benzochinon abgetrennt werden. Die Entwicklung eines dafür geeigneten Gradientenprofils wurde mit Hilfe der Methodenentwicklungs-Software DryLab<sup>®</sup> durchgeführt.

Die RSM wurde an drei linearen Gradienten (0 – 100 % organischer Phase) mit Gradientenzeiten (tG) von 20, 40 bzw. 60 Minuten getrennt. Die dabei für die einzelnen Substanzen erhaltenen Werte für Retentionszeiten und Peakflächen wurden zur Dateneingabe in DryLab<sup>®</sup> verwendet. Mit diesen Werten errechnete die Software nun virtuell alle Chromatogramme des RSM die mit linearen Gradienten zwischen tG = 20 und 60 Minuten erzeugt werden konnten. In diesen virtuellen Chromatogrammen wurde jeweils die „kritische Auflösung“ berechnet. Als „kritische Auflösung“ ist die kleinste Auflösung zwischen zwei beliebigen Peaks im Chromatogramm definiert.

Die Berechnungen der Software zeigten, dass eine Trennung mit einer Auflösung oberhalb  $R_s = 0,1$  mit einem linearen Gradienten nicht möglich war. Weiterhin konnte anhand der Software-integrierten Gradienten-Modulation gezeigt werden, dass eine isokratische Trennung der RSM bei einem Anteil von ca. 9 – 17 % organische Phase eine befriedigende Auflösung liefern würde.

In einem zweiten Experiment wurden durch reale isokratische Trennung des RSM bei 7 und 12 % Anteil organischer Phase Werte für die DryLab<sup>®</sup> Dateneingabe generiert. Die von DryLab<sup>®</sup> generierte Graphik zur „kritischen Auflösung“ (Abbildung 43) zeigte eine maximal erreichbare Auflösung des kritischen Peakpaares von  $R_s = 2,2$ .

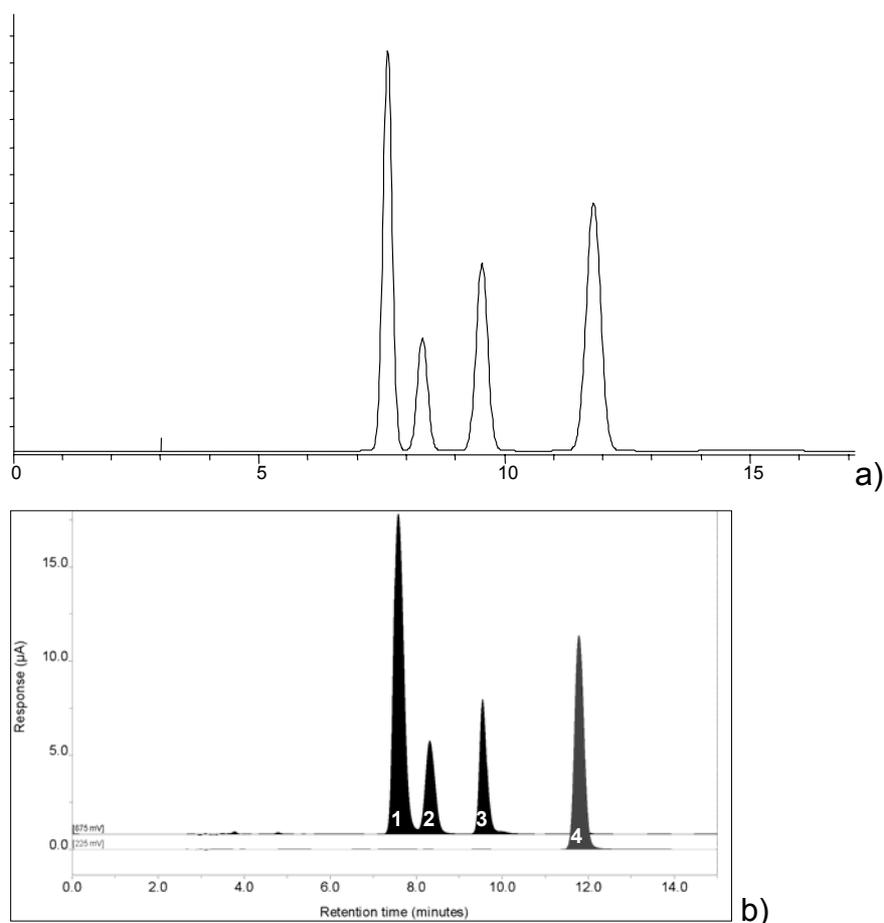


**Abbildung 43:** DryLab®-Graphik zur „kritischen Auflösung“ (Ordinate) der isokratischen Trennung des Rattenleber-Microsomen-Ansatzes (RMA) bei variablem organischen Fließmittel-Anteil und daraus resultierender Verkürzung der Laufzeit (Abszisse).

Für die zu entwickelnde Methoden wurden als Rahmenbedingungen eine minimale kritische Auflösung von  $R_s = 1,4$ , eine maximale Retentionszeit des letzten Peaks von 20 min und ein Retentionsfaktor von  $k < 0,2$  gewählt. Innerhalb dieser Parameter gibt der schraffierte Teil der AUC (area under the curve) in Abbildung 43 den Bereich einer „ausreichend“ guten Trennung des RSM-Systems. Da der Anteil organischer Phase im Bereich von 9,5-13,5 % variiert werden kann, ohne die gewählten Rahmenbedingungen zu verletzen, ist die Methode in diesem Bereich robust.

Ein Anteil von ca. 10 % organischer Phase wurde als optimaler Anteil am Fließmittel zur isokratischen Trennung errechnet. Die Übertragung des virtuell errechneten Gradienten auf das reale HPLC-System war problemlos möglich (Abbildung 44).

Für die weitere Methodenentwicklung und auch für die spätere Validierung wurde eine Matrix aus gepooltem Urin verwendet. Diese bestand zu gleichen Anteilen aus Urin von Frauen ( $n=3$ ) und Männern ( $n=3$ ). Die Zusammensetzung ergab sich aus dem ebenfalls ausgewogenen Probandenverhältnis der klinischen Studie und den Leitlinien der FDA (FDA and CDER 1998), die die Verwendung einer homogenen Matrix empfehlen. Das Mischen von Urin-Proben weiblichen und männlichen Ursprungs resultierte aus dem deutlichen Unterschied bezüglich des endogenen Metaboliten-Spektrums, das zwischen weiblichen und männlichen Probanden bestand.



**Abbildung 44:** Simuliertes (a) und reales (b) Chromatogramm des Rattenleber-Microsomen-Ansatzes (RMA) mit Hydrochinonglucuronid (1), Arbutin (2), Hydrochinonsulfat (3) und Hydrochinon (4) (@ 10 % organische Phase, isokratisch; simultane elektrochemische Detektion bei 675 mV (1, 2, 3) und 225 mV (4)).

Bei Übertragung der optimierten isokratischen Trenn-Methode auf die Urin-Matrix zeigten sich bei 10 % organischer Phase partielle Interferenzen zwischen Hydrochinon und Urin-Matrix-Bestandteilen. Es wurde deshalb eine Trennung bei 15 % organischer Phase gewählt, da hier, basierend auf simulierten RSM-Daten und realen Urin-Matrix-Daten, keine nennenswerten Interferenzen zu erwarten waren.

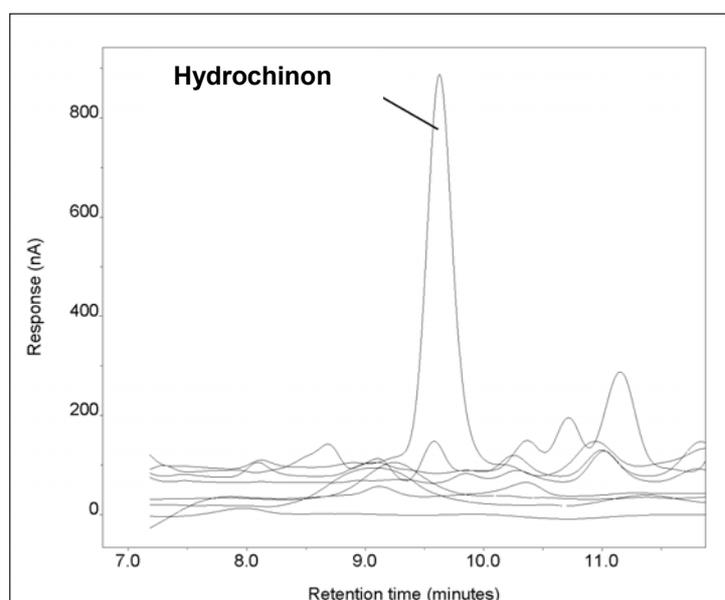
Der Arbeitsbereich für die Methode zur Hydrochinon-Bestimmung wurde auf Grund vorangegangener Studien zur Bioverfügbarkeit von Arbutin nach oraler Applikation (Paper, Koehler *et al.* 1993) (Siegers, Siegers *et al.* 1997) auf 250 - 1000 ng mL<sup>-1</sup> festgelegt. Dieser recht kleine Arbeitsbereich ist völlig ausreichend, da auf Grund der

genannten Publikationen Hydrochinon-Konzentrationen über  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  im Urin nicht zu erwarten waren.

### 5.1.5 Validierung der Methode zur Quantifizierung von Hydrochinon in Human-Urin

#### Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden 10 blank Urin-Proben (5 weiblich, 5 männlich) mit einer gespikten Urin-Matrix ( $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hydrochinon,  $2 \times \text{LOQ}$ ) verglichen. Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigten die einzelnen Urin-Blank Proben keine signifikanten Überlagerungen mit dem zu bestimmenden Analyten.



**Abbildung 45:** Chromatogramme von 10 Urin- Blank- Proben und einer mit  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  Hydrochinon gespikten Urin- Matrix- Probe.

#### Linearität

Die Linearität der Methode wurde durch Doppelbestimmung von gepoolten und mit Hydrochinon gespikten Urin-Lösungen an 6 Konzentrationsstufen bestimmt. Der Residuen-Plot zeigte eine gleichmäßige Verteilung der Kalibrierwerte um die Kalibrierfunktion, so dass auf Linearität geschlossen werden konnte.

Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Kalibriergeraden beträgt 0,9996.

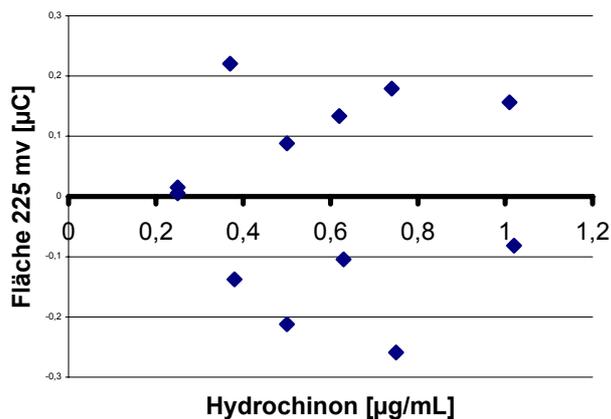


Abbildung 46: Residuen-Plot der Hydrochinon-Kalibriergerade.

### Kalibrierdaten

Aus den Daten zur Bestimmung der Linearität wurde die Kalibrierfunktion  $y = 23,809 x + 0,0974$  errechnet.

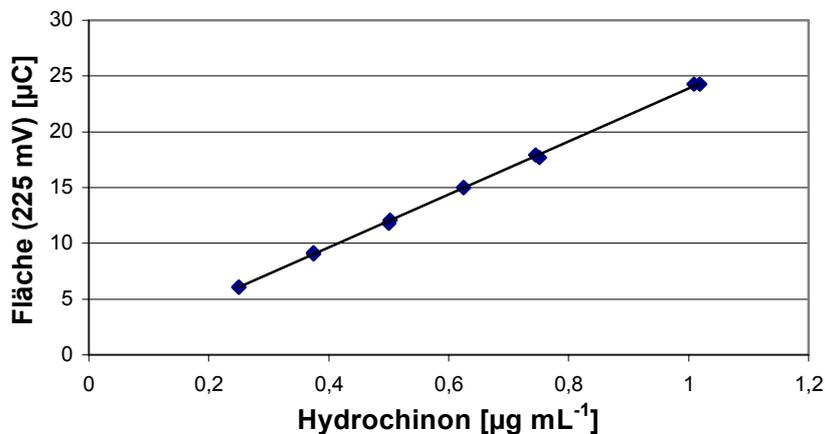


Abbildung 47: Graphische Darstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Hydrochinon in Humanurin.

### Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Bestimmungsgrenze wurde als die Konzentration festgelegt, an der die Richtigkeit und Präzision innerhalb des empfohlenen Richtwertes liegt (FDA and CDER 1998); Präzision VK = 20%, Richtigkeit 80 – 120 %). Die Werte für Präzision und Richtigkeit am LOQ wurden als unterste Konzentrationsstufe der Präzisions-

Messungen an drei Tagen bestimmt (Tabelle 10). Die Bestimmungsgrenze lag bei  $250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hydrochinon in Urinmatrix bzw.  $12,5 \text{ ng}$  Hydrochinon on column.

## Präzision

### *Wiederholstandardabweichung (Inter-assay-Precision)*

Die Wiederholstandardabweichung wurde durch Mehrfachinjektion ( $n = 6$ ) an drei Konzentrationsstufen ( $0,25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = \text{LOQ}$ ,  $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $0,75 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ermittelt. Die Messungen wurden an zwei weiteren Tagen wiederholt. Tabelle 10 gibt die Präzision als Variationskoeffizient (VK) an. Die Abweichungen an allen drei Prüftagen liegen unter denen von der FDA (FDA and CDER 1998) empfohlenen Richtwerten.

**Tabelle 19:** Daten zur Wiederholstandardabweichung der Methode.

	Konzentrationsstufe	$0,25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0,75 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Tag 1	Mittelwert der Flächen [ $\mu\text{C}$ ] ( $n=6$ )	6,63	13,20	17,58
	stabw	0,192	0,529	0,232
	<b>VK [%]</b>	<b>2,90</b>	<b>4,01</b>	<b>1,32</b>
Tag 2	Mittelwert der Flächen [ $\mu\text{C}$ ] ( $n=6$ )	6,11	12,17	18,18
	stabw	0,076	0,137	0,172
	<b>VK [%]</b>	<b>1,24</b>	<b>1,12</b>	<b>1,32</b>
Tag 3	Mittelwert der Flächen [ $\mu\text{C}$ ] ( $n=6$ )	6,28	11,92	18,10
	stabw	0,204	0,160	0,290
	<b>VK [%]</b>	<b>3,25</b>	<b>1,34</b>	<b>1,60</b>

### *Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (Inter-day-Precision)*

Die Intra-Laboratoriums-Standardabweichung wurde als prozentualer Variationskoeffizient (VK) von 18 Messwerten einer Konzentrationsstufe angegeben. Die 18 Messwerte ergaben sich aus den sechs Einzelbestimmungen an drei Validierungsmesstagen. An den einzelnen Messtagen wurden ausführende Laborkräfte, Reagenzien-Sätze und Fließmittel-Chargen variiert. Die Abweichungen an allen drei Konzentrationsstufen liegen innerhalb der von der FDA (FDA and CDER 1998) empfohlenen Richtwerte.

**Tabelle 20:** Präzisionsdaten der Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS).

Konzentrationsstufen	Mittelwert* [µC] (n=18)	stabw	VK %
0,25 µg·mL <sup>-1</sup>	6,30	0,240	3,82
0,50 µg·mL <sup>-1</sup>	12,11	0,405	3,34
0,75 µg·mL <sup>-1</sup>	17,88	0,308	1,72

**Richtigkeit (Accuracy)**

Die Richtigkeit wurde durch eine Mehrfachbestimmung (n=6) des Analyten in Urinmatrix an drei Konzentrationsstufen (0,25 µg·mL<sup>-1</sup> = LOQ, 0,5 µg·mL<sup>-1</sup> und 0,75 µg·mL<sup>-1</sup>) bestimmt. Die Messung wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt. Dazu wurden die für die Ermittlung der Präzision generierten Daten verwendet.

Die Richtigkeit an der jeweiligen Konzentrationsstufe wurde als prozentuale relative Abweichung der aus der Kalibriergeraden errechneten Fläche zum Nominalwert (Mittelwert der Mehrfachbestimmung s. Präzision, n=6) angegeben (Tabelle 12). Die Abweichungen an allen drei Prüftagen liegen unter denen von der FDA (FDA and CDER 1998) empfohlenen Richtwerten.

Regressionsgerade:  $y = 23,809 x + 0,0974$

x = Konzentration [µg Hydrochinon·mL<sup>-1</sup>]

y = Fläche [µC]

**Tabelle 21:** Daten zur Richtigkeit der Methode

	Ist-Konzentration [µg·mL <sup>-1</sup> ]	errechnete Fläche [µC]	Nominalwert [µC]	Abweichung vom Nominalwert [%]
Tag 1	0,254	6,14	6,63	7,39
	0,528	12,68	13,20	3,95
	0,750	17,95	17,58	2,10
Tag 2	0,251	6,06	6,11	0,75
	0,508	12,19	12,17	0,14
	0,759	18,17	18,18	0,08
Tag 3	0,250	6,05	6,28	3,67
	0,502	12,05	11,92	1,09
	0,751	17,98	18,10	0,65

## Stabilität

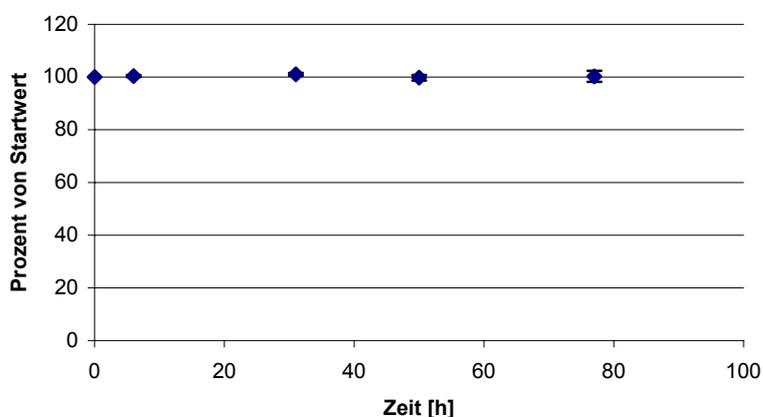
### Gefrier- und Auftaustabilität

Die Gefrier- und Auftaustabilität wurde durch Messung des Degradations-Verhaltens des Analyten Hydrochinon in der Urinmatrix während vier Tieffrier- und Auftauzyklen bestimmt. Ein Zyklus umfasste das Einfrieren der Probe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (erster Zyklus mindestens 24 h, folgende mindestens 12 h), das Auftauen der Probe bis Erreichen der Raumtemperatur ohne Wärmezufuhr und das Vermessen der Probe.

Der Analyt Hydrochinon erwies sich unter die beschriebenen Bedingungen als stabil.

**Tabelle 22:** Gefrier- und Auftaustabilität von Hydrochinon in Humanurin

	Zyklusbeginn [h]	Prozent vom Startwert [%] (Mittelwert, n=2)
Startwert	(0)	100,00
1. Zyklus	6	100,39
2. Zyklus	31	101,02
3. Zyklus	50	99,77
4. Zyklus	77	100,55



**Abbildung 48:** Graphische Darstellung (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung, n=3) der Gefrier- und Auftaustabilität ( $-80/25^{\circ}\text{C}$ ) von Hydrochinon in Urinmatrix ( $0,5\ \mu\text{g Hydrochinon mL}^{-1}$ ) über 4 Gefrier- und Auftauzyklen (Mittelwert, n=2).

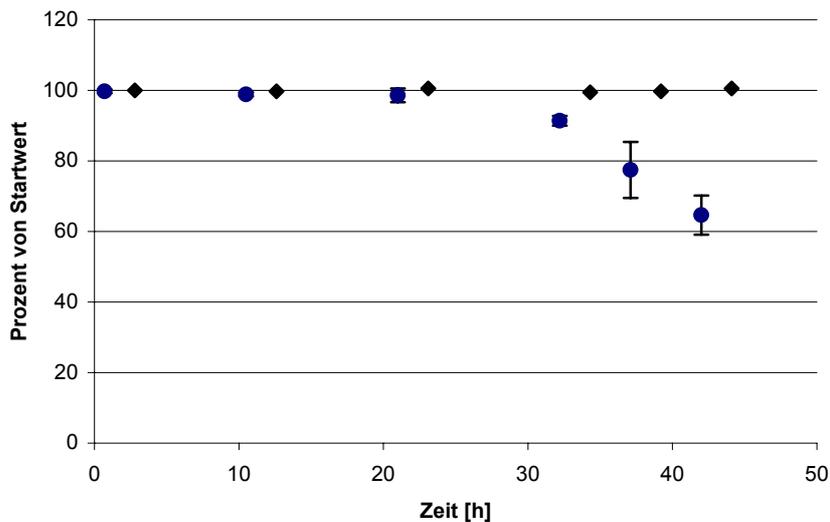
### Autosamplerstabilität

Zur Ermittlung der Stabilität des Analyten Hydrochinon in wässrigen Lösungen und in der Urin-Matrix (enthält 0,5 % Ascorbinsäure) wurden jeweils Proben (n = 3) im Autosampler ( $15^{\circ}\text{C}$ , Lichtschutz) gelagert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Hydrochinon war in wässriger Lösung bis ca. 24 Stunden, in Urin-Matrix bis 44 Stunden stabil. Die hohe Stabilität des Analyten in der Urin-Matrix ist wohl u.a. auf die Anwesenheit von Ascorbinsäure zurückzuführen.

**Tabelle 23:** Autosamplerstabilität von Hydrochinon in wässriger Lösung bzw. Urin-Matrix.

Zeit [h]	Prozent vom Startwert [%]	
	wässrige Lösung, (n = 3)	Urin-Matrix, (n = 3)
0,7	100,00	
2,8		100,00
10,5	99,16	
12,6		99,74
21,0	98,89	
23,1		100,52
32,2	91,64	
34,3		99,48
37,1	77,66	
39,2		99,74
42,0	64,82	
44,1		100,52



**Abbildung 49:** Graphische Darstellung (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung, n=3) der Stabilität von Hydrochinon ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) gelöst in Urinmatrix (◆) bzw. Reinstwasser (●) und gelagert im Autosampler bei  $15^\circ\text{C}$ .

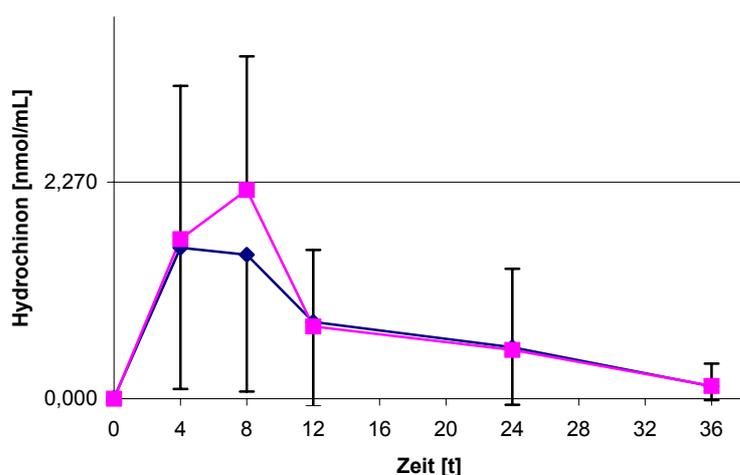
## 5.2 Bioverfügbarkeitsuntersuchungen

Über die renale Eliminierung sollte die relative Bioverfügbarkeit von Arbutin aus Einmaldosen im Vergleich einer festen zu einer flüssigen Arzneiform bestimmt

werden. Die als Bärentraubenblätter-Extrakt (945 mg Extrakt mit 210 mg Arbutin) gegebene Studienmedikation bestand zum einen aus zwei Filmtabletten zum anderen aus 100 mL einer wässrigen Lösung.

Die beschriebenen Harn-desinfizierenden Effekte von Arbutin werden durch seine Metabolite im unteren Urinaltrakt bewirkt (siehe 1.4.1). Eine Bestimmung dieser Metabolite beschränkte sich daher auf den Urin der Probanden. Die renal vorliegenden Arbutin-Metabolite Hydrochinonglucuronid und Hydrochinonsulfat wurden mit Hilfe von Kapillarelektrophorese (CE) (Glöckl 2001), freies Hydrochinon über die hier validierte HPLC-Methode bestimmt. Benzochinon als möglicher Metabolit konnte im Probanden-Urin nicht nachgewiesen werden (LOD  $\approx$  100 ng on column)

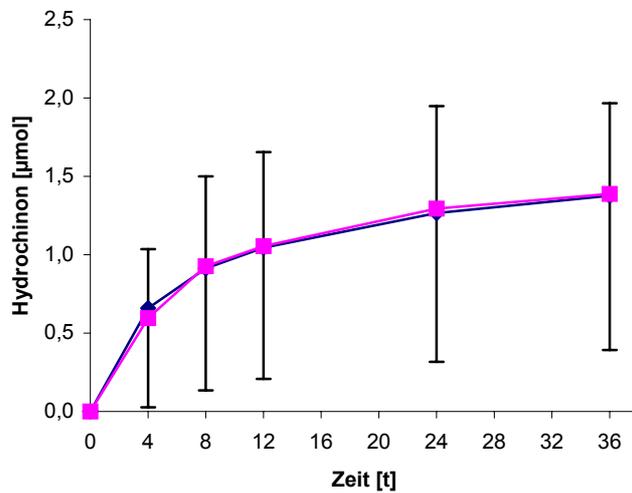
Bezüglich der im Urin gemessenen Hydrochinon-Konzentration lagen alle Gehalte deutlich oberhalb des LOD, aber nur 30 von ca. 200 Proben oberhalb des validierten LOQ. Die folgenden Ergebnisse wurden daher als Schätzungen gewertet.



**Abbildung 50:** Mittlere Kinetik der renalen Elimination von Hydrochinon nach Applikation von 945 mg Bärentraubenblätter-Trockenextrakt als Filmtablette (◆) und als wässrige Lösung (■) (n = 16, LOQ bei  $2,27 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

Das mit dem Bärentraubenblätter-Trockenextrakt applizierte Arbutin (210 mg,  $\approx 771,3 \mu\text{mol}$ ) wurde zu ca. 0,18 % als freies Hydrochinon ( $\approx 1,38 \pm 0,79 \mu\text{mol}$ ) ausgeschieden. Der Zeitpunkt der maximalen Hydrochinon-Ausscheidung lag bei beiden Arzneiformen im 4-8 Stunden-Intervall nach Applikation. Die maximale

Ausscheidung von Hydrochinon innerhalb dieses Intervalls betrug sowohl nach Gabe der Filmtabletten als auch nach Gabe der wässrigen Lösung ca. 0,3 µg.



**Abbildung 51:** Mittlere (n = 16) kumulative Elimination von Hydrochinon nach Applikation von 945 mg Bärentraubenblätter-Trockenextrakt als Filmtablette (◆) und als wässrige Lösung (■).

## 6 Detektion von Quercetinglucuroniden nach oraler Gabe von Zwiebelmus

### 6.1 Methodenentwicklung

Die systemisch verfügbaren Metabolite des Quercetins nach oraler Gabe von Quercetin bzw. Quercetinglykosiden werden kontrovers diskutiert. Publikationen der letzten Jahre postulieren die An- bzw. Abwesenheit von Quercetinglucuroniden, Quercetinglukosiden, Quercetinsulfaten, Isorhamnetin oder freiem Quercetin (siehe auch 0). Meist weisen die dort angewandten analytischen Verfahren mangelhafte Selektivität auf. So reicht z.B. eine Identifizierung unbekannter Metabolite mittels HPLC-UV/VIS nicht aus, da Quercetin-3-O-glucosid und Quercetin-3-O-glucuronid weder durch Retentionszeit noch durch das UV/VIS-Spektrum zu unterscheiden sind. Somit bestand ein Bedarf an selektiven und sensitiven Detektionsmethoden.

Aus diesem Antrieb heraus wurde eine Methode entwickelt, die sowohl freies als auch konjugiertes Quercetin selektiv und ausreichend sensitiv detektieren konnte. Als authentisches Untersuchungsmaterial wurden Plasma-Proben einer Humanstudie zur Bioverfügbarkeit von Quercetinglucuroniden (Graefe, Wittig *et al.* 2001) verwendet.

In vorangegangenen Experimenten erwies sich die Detektion von Quercetin und seinen Metaboliten in biologischen Matrices mittels HPLC-MS (Massenspektrometrie) bezüglich der Selektivität den Verfahren der UV/VIS-Detektion oder der elektrochemischen Detektion als überlegen (Nielsen, Freese *et al.* 2000). Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde zunächst die Anwendbarkeit „weicher“ Ionenerzeugungsverfahren wie ESI (electrospray ionization) und APCI (atmospheric pressure chemical ionization) getestet, so dass nicht nur die Detektion von Analyt-Fragmenten, sondern auch die intakter Molekülonen möglich war.

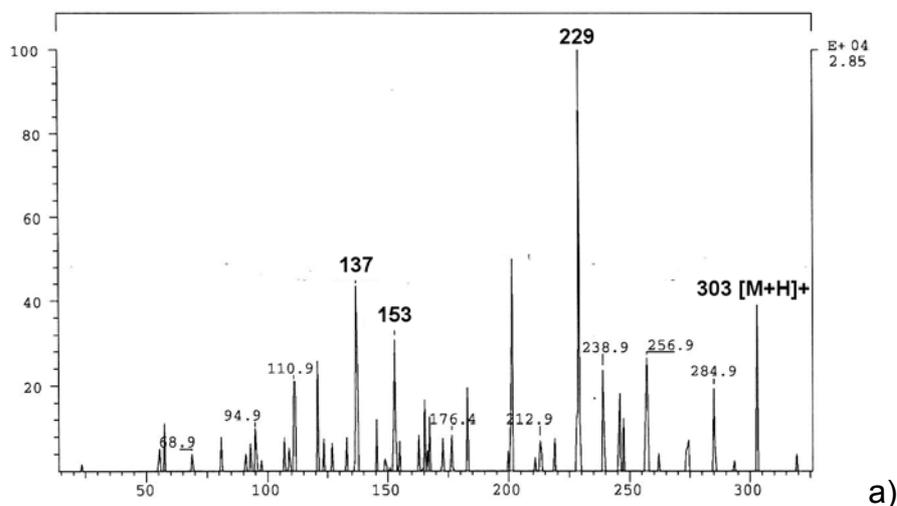
#### 6.1.1 Einfluss des Verfahrens zur Ionenerzeugung

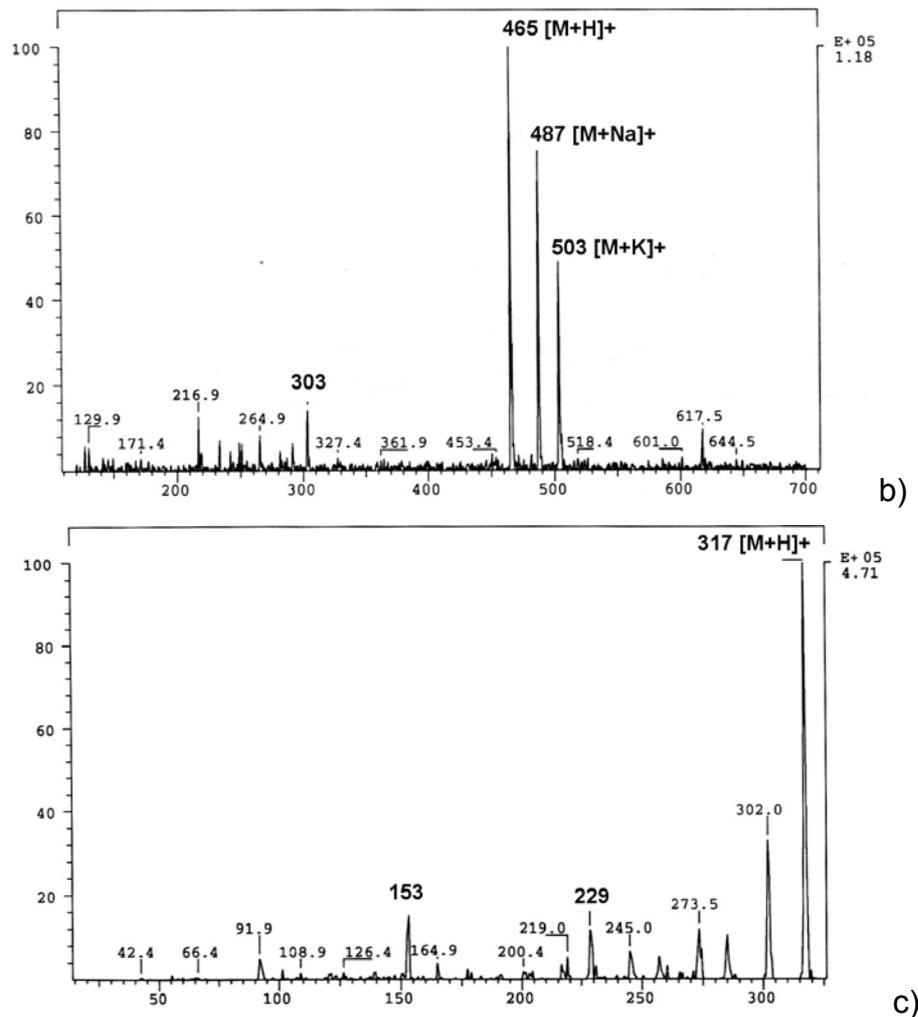
Zunächst wurde das Ionisations-Verhalten für die Analyten beispielhaft an Quercetin untersucht. Dazu wurde unter Anwendung der in Frage kommenden Ionisationsverfahren ESI und APCI zunächst Molekülonen von Quercetin im positiven und negativen Modus aufgenommen. Diese Tests zur Ionisierbarkeit erfolgten mit in Methanol / wässrige Phosphorsäure pH2 (80:20) gelöstem Quercetin.

Das gewählte Lösungsmittel resultiert aus der für die Trennung der Plasmaproben verwendeten HPLC-Methode (siehe 2.5). Wie im sauren Lösungsmittel zu erwarten, war die Intensität der Molekülionen im positiven Detektionsmodus höher als im negativen. Bei den Ionisierungsverfahren erwies sich ESI als das geeignetere, da auch hier die Intensität des generierten Signals höher als das bei APCI war.

Um das Fragmentierungsverhalten unter Experimentalbedingungen abschätzen zu können, wurden durch CID (collision induced dissoziation) generierte Produktionspektren erzeugt. Diese Experimente wurden ebenfalls unter Verwendung der Ionisierungsverfahren ESI und APCI im positiven und negativen Modus durchgeführt. Auch hier erwies sich bei den vorgegebenen chromatographischen Bedingungen das Verfahren ESI im positiven Detektionsmodus als den anderen überlegen. Die CID-Spektren von Quercetin im positiven ESI-Modus (Abbildung 52) zeigten nicht nur das Molekülion ( $m/z [M+H]^+ = 303$ ) und die dazugehörigen charakteristischen Fragmente ( $m/z = 229$ ,  $m/z = 153$ ,  $m/z = 137$ ), sondern auch das beste Signal-Rausch-Verhältnis.

Nachdem sich die ESI-Ionisierung im positiven Modus als geeignete Analysetechnik erwiesen hatte, wurden CID-Spektren von allen Referenzsubstanzen aufgenommen (Abbildung 52). Quercetin-3-O-glucosid und Isorhamnetin waren kommerziell verfügbar. Die Substanzen Quercetinsulfat und Quercetin-3-O-glucuronid waren nicht zugänglich. Während das Glucuronsäure-Konjugat biochemisch synthetisiert werden konnte, gelang dies für das Schwefelsäure-Konjugat nicht.





**Abbildung 52:** Produkt-Ionenspektren (ESI pos.) von Quercetin (a; Prekursorion m/z 303), Quercetin-3-O-glucosid (b; Prekursorion m/z = 465) und Isorhamnetin (c; Prekursorion m/z = 317).

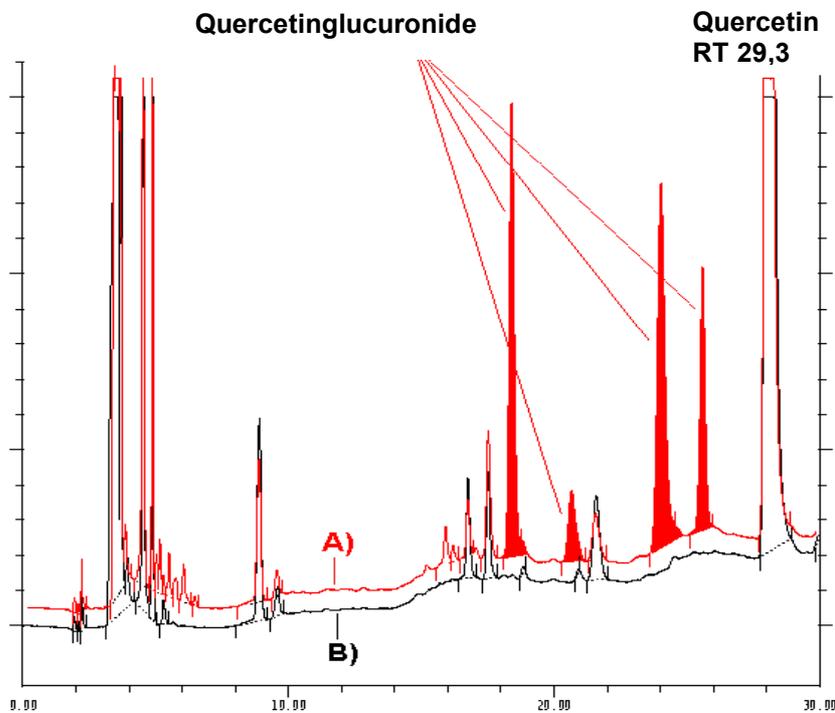
### 6.1.2 Biochemische Synthese authentischer Referenzsubstanzen

Die als Referenzsubstanzen nicht verfügbaren Quercetinglucuronide wurden biochemisch durch Umsetzung von aktivierter Glucuronsäure und Quercetin unter Katalyse einer UDP-Glucuronyltransferase (UGT-Assay) hergestellt (siehe 2.8).

Nach Abschluss der enzymatischen Reaktion wurde der Reaktionsansatz HPLC-chromatographisch getrennt und zunächst mittels UV-Detektion (254 nm) analysiert. Im Chromatogramm konnten vier Peaks bei  $R_t = 25,6$ ;  $24,1$ ;  $20,7$  und  $18,4$  min detektiert werden. Diese Substanzen waren polarer als Quercetin ( $R_t = 29,3$ ) und zeigten UV/VIS-Spektren, die für Quercetinglykoside typisch sind.

Um die Identität der mutmaßlichen Quercetinglucuronide zu bestimmen, wurde zunächst ihre biochemische Dekonjugierbarkeit getestet. Nach Inkubation mit

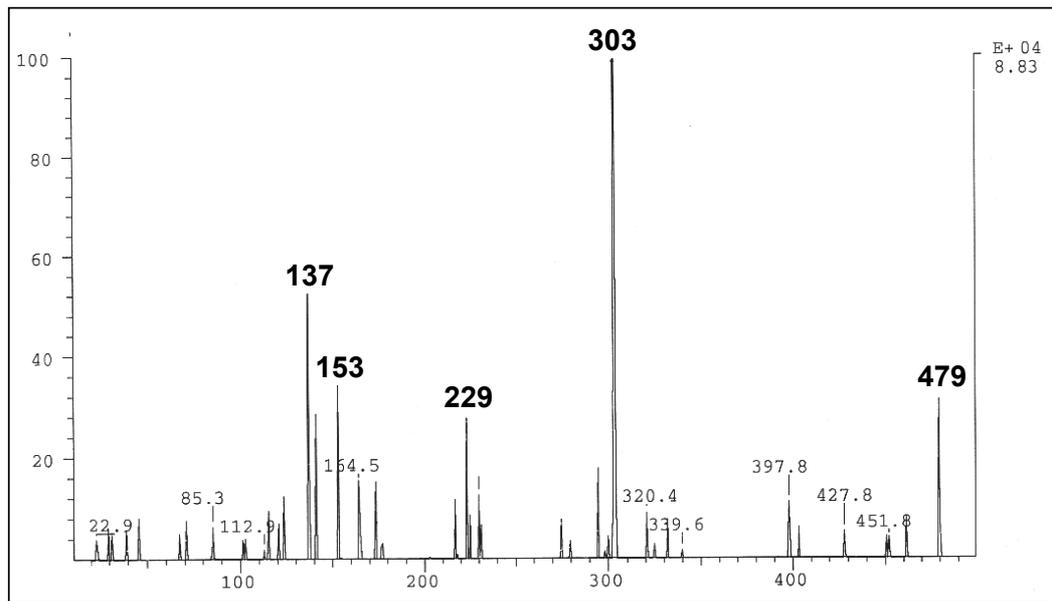
$\beta$ -Glucuronidase verschwanden alle vier Peaks nahezu vollständig und der Peak des Quercetins vergrößerte sich proportional.



**Abbildung 53:** HPLC- Chromatogramme (UV 254 nm) des Glucuronyltransferase- Assays vor (A) und nach (B)  $\beta$ -Glucuronidase Behandlung.

Diese erfolgte biochemische Spaltung der Quercetin-Konjugate war aber nur ein Hinweis auf die vermutete Identität der synthetisierten Quercetin-Metabolite. Da Glucuronidasen fast immer auch Sulfatase- und Glucosidase-Aktivität besitzen, konnte es sich bei den Reaktionsprodukten auch um Quercetin-Sulfate oder -Glucoside handeln.

Um also die Identität der postulierten Quercetinglucuronide zu verifizieren, wurden HPLC-MS-Experimente durchgeführt. Alle vier Peaks zeigten wie erwartet das Molekülion  $[M+H]^+$   $m/z = 479$  als intensivstes Signal. Auch die danach generierten CID-Spektren der Quercetinglucuronide (Abbildung 54) enthielten das Molekülion des intakten Quercetinglucuronides ( $m/z = 479$ ) sowie das Ion des Aglycons Quercetin ( $m/z = 303$ ). Weiterhin wurden die charakteristischen Fragmente von Quercetin ( $m/z = 229$ ,  $m/z = 153$ , and  $m/z = 137$ ) detektiert. Die Bildung der charakteristischen Ionen des CID-Spektrums von einem Quercetinglucuronid ist in Abbildung 55 dargestellt.



**Abbildung 54:** Produktionspektrum eines Quercetinglucuronides im UGT-Assay (Prekursorion  $m/z$  479;  $[M+H]^+$ ,  $R_t = 13,6$ ).

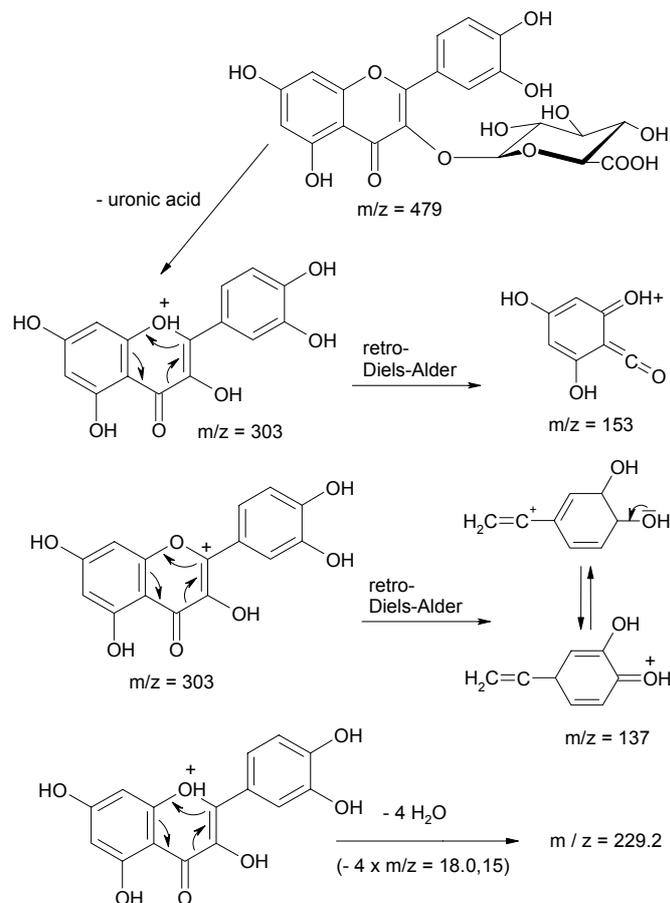
Damit war die Identität der vier biochemisch generierten Quercetinglucuronide bestätigt. Ziel der Arbeiten zur Methodenentwicklung war es, Rahmenbedingungen für SRM-Experimente festzulegen, die eine eindeutige und selektive Bestimmung der einzelnen Analyten ermöglicht.

### 6.1.3 SRM (selected reaction monitoring)-Experimente

Basierend auf den CID-Spektren der Referenz-Substanzen Quercetin, Quercetin-3-O-glucosid, Isorhamnetin (Abbildung 52) und denen der Quercetinglucuronide (Abbildung 54) aus dem UGT-Assay wurden mehrere SRM-Experimente konzipiert und durchgeführt (Tabelle 24).

Bei SRM1 wurde der Neutralverlust der Glucuronsäure (-176 amu) detektiert, indem die Fragmentierung des Prekursorions Quercetinglucuronid ( $m/z = 479$ ,  $[M+H]^+$ ) zum Aglycon Quercetin ( $m/z = 303$ ,  $[Quercetin+H]^+$ ) bei einer Stoßenergie von 30 eV aufgezeichnet wurde. Mit diesem Experiment ist es möglich Substanzen als Glucuronide bzw. Hexuronsäure-Konjugate zu identifizieren.

Ein zweites SRM-Experiment (SRM2) wurde durchgeführt, um die Identität des Glucuronid-Aglykons Quercetin zu identifizieren. Dazu wurde bei einer Stoßenergie von 50 eV das Quercetin-Fragment  $m/z = 229$  aufgezeichnet.



**Abbildung 55:** Fragmentierungsschema von Quercetin (modifiziert nach (Li, Van den Heuvel *et al.* 1995)).

Zwei weitere SRM-Experimente wurden zum Nachweis freien Quercetins genutzt. Dabei wurde ausgehend vom Prekursorion Quercetin ( $m/z = 303$ ) die Fragmentierung zu den charakteristischen Quercetinfragmenten  $m/z = 153$  (SRM 3) bzw.  $m/z = 229$  (SRM 4) detektiert.

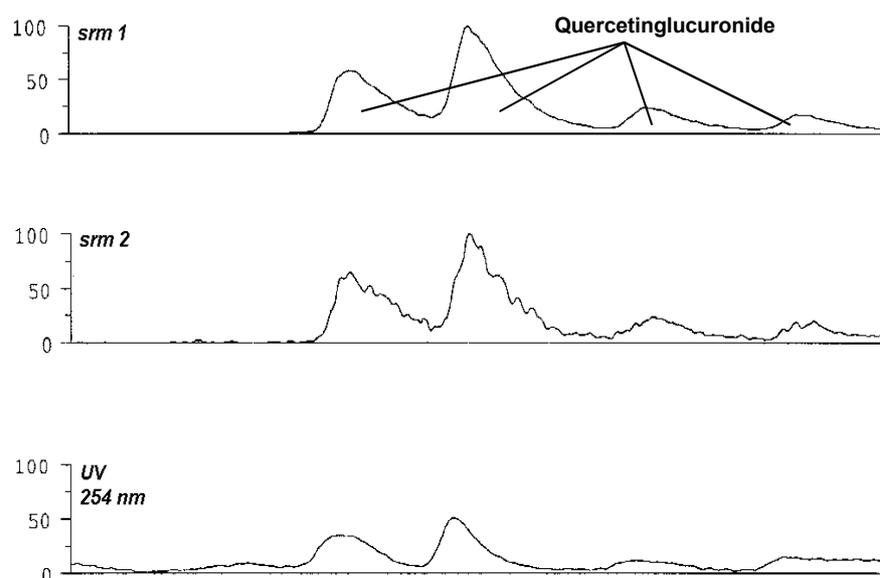
SRM5 detektiert den Neutralverlust an Glucose (30 eV, Prekursorion  $m/z = 465$ ) und SRM6 den Neutralverlust an Sulfat (30 eV, Prekursorion  $m/z = 383$ ) zum Quercetin-Aglykon (Prekursorion  $m/z = 303$ ). Die Parameter für Experiment SRM6 beruhen theoretischen Überlegungen, da die Referenzsubstanz Quercetinsulfat weder kommerziell verfügbar, noch biochemisch synthetisierbar war. Die dem Experiment zugrunde liegende Annahme, das Molekülion des Quercetinsulfates ( $m/z = 383$ ) würde unter Neutralverlust des Schwefelsäure-Restes (-80 amu) zum Ion des Aglykon fragmentieren ( $m/z = 303$ ), wird durch das Verhalten der Referenzen Quercetin-3-O-glucosid und Quercetin-3-O-glucuronid gestützt.

Mit SRM7 wurde auf Anwesenheit von Isorhamnetin geprüft. Dazu wurde die Fraktionierung des Molekülions ( $m/z = 273$ ) zum charakteristischen Fragment  $m/z = 153$  aufgezeichnet.

**Tabelle 24:** SRM-Experimente zur selektiven Analyse von Quercetin und Quercetinkojugaten.

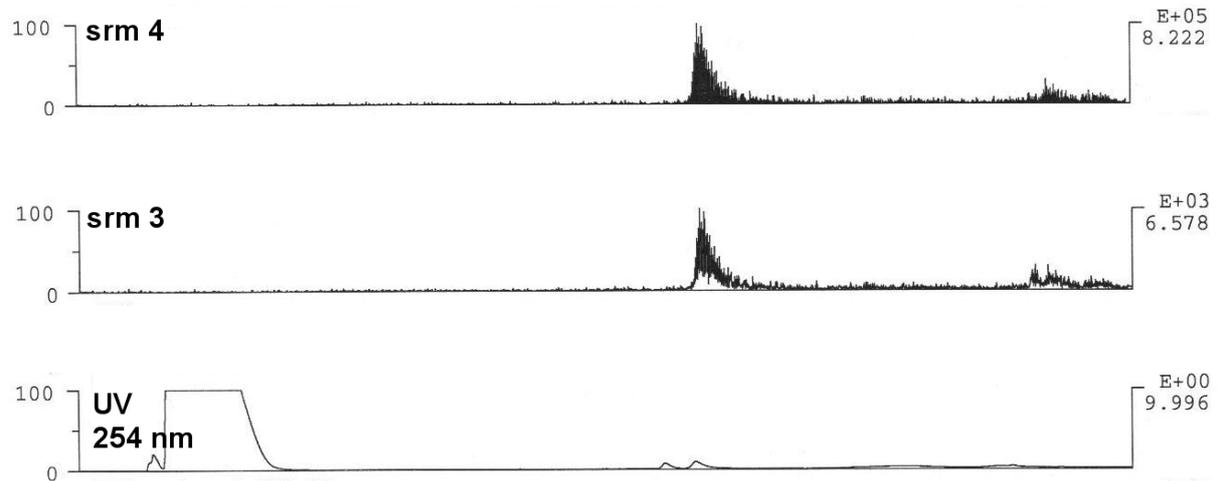
Experiment	Analyt	Prekursorion [M+H] <sup>+</sup>	Produktionen	Stoßenergie [eV]
SRM 1	Quercetinglucuronid	479	303	30
SRM 2	Quercetinglucuronid	479	229	50
SRM 3	Quercetin	303	153	30
SRM 4	Quercetin	303	229	50
SRM 5	Quercetinglucosid	465	303	30
SRM 6	Quercetinsulfat	383	303	30
SRM 7	Isorhamnetin	273	153	35

Die Chromatogramme in Abbildung 56 zeigen die Ergebnisse der SRM-Experimente SRM1 und SRM2 im UGT-Assay. Alle vier Glucuronide des UGT-Assays geben deutliche Signale in beiden SRM-Spuren, so dass die HPLC-UV und HPLC-MS Ergebnisse zu den Metaboliten des  $\beta$ -Glucuronidase-Assays verifiziert werden konnten.



**Abbildung 56:** HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 1 und 2) mit vier synthetisierten Quercetinglucuroniden in einer Probe des UGT-Assays.

Mit Hilfe der SRM-Experimente SRM 3 und 4 konnte im UGT als Substrat eingesetztes und nicht enzymatisch umgesetztes Quercetin detektiert werden (Abbildung 57).



**Abbildung 57:** HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 3 und 4) mit nicht umgesetzten Quercetin in einer Probe des UGT-Assays.

## 6.2 Bioanalytik

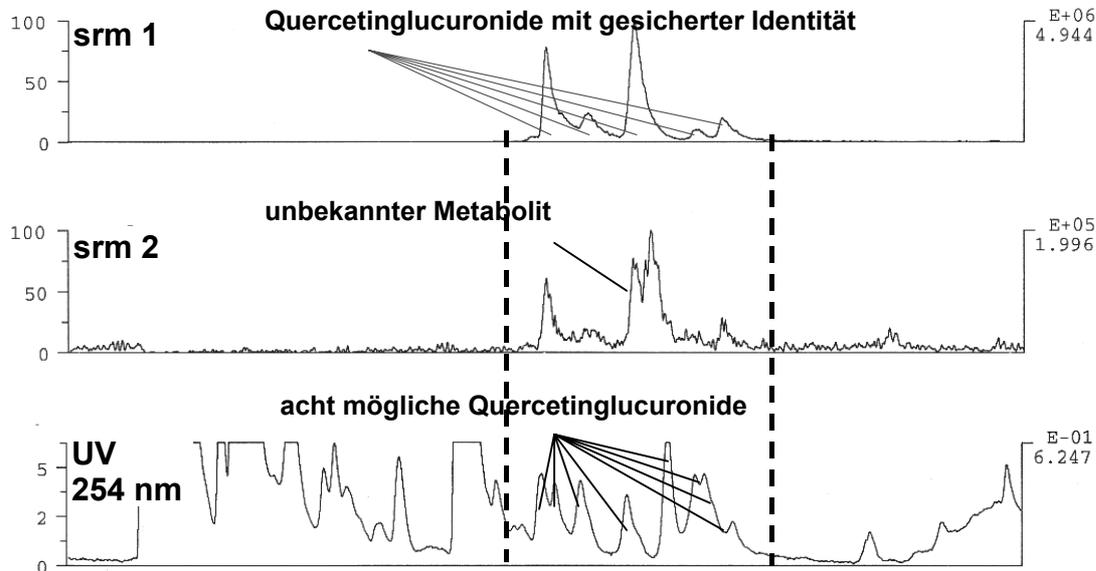
Schlüsseltechnik zur Charakterisierung unbekannter Metabolite in Humanplasma war das Scannen nach Prekursorionen und die darauf folgende Durchführung von Produktions- und SRM- Experimenten.

### 6.2.1 Detektion der Quercetinglucuronide in Humanplasma

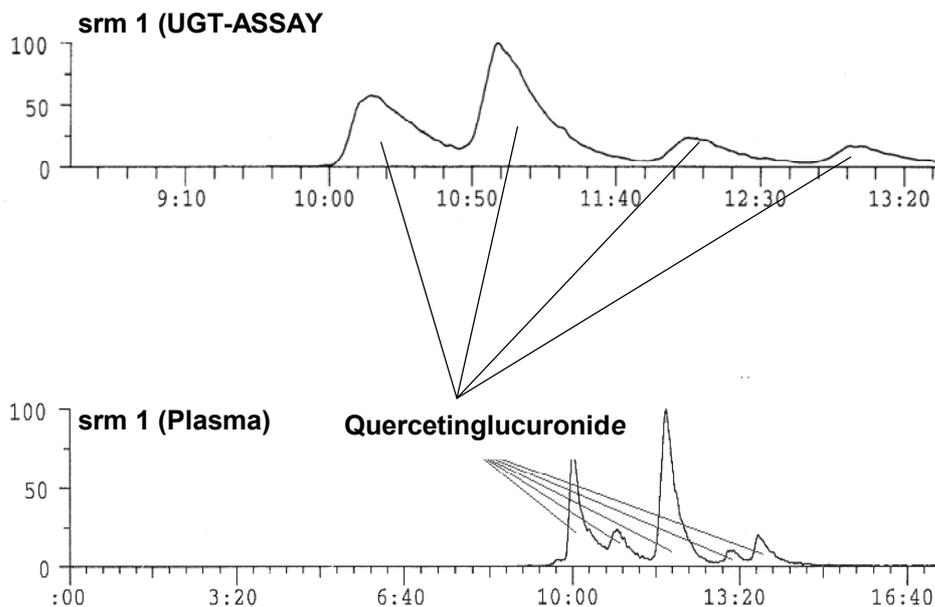
Es wurden Plasmaproben gesunder Probanden nach oraler Gabe von ca. 400 g Zwiebelmus untersucht. Nach Probennahme und -aufbereitung (siehe 2.5) wurden die Plasma-Proben zunächst mittels HPLC-UV/VIS (254 nm) analysiert. Im Chromatogramm erscheinen acht zusätzliche Peaks zwischen RT = 9,0 und RT = 14,0 als mögliche Quercetin- Metabolite (Abbildung 58, unten). Zur näheren Bestimmung der unbekannt Metabolite im Humanplasma wurden die in Tabelle 24 gezeigten SRM-Experimente durchgeführt (Abbildung 58).

Das Experiment SRM1 konnte fünf Hexuronsäure-Konjugate eines Flavonols bei den Retentionszeiten RT = 10,02, 10,8, 11,9, 13,15 und 13,6 Minuten identifizieren

(Abbildung 58, oben). Durch SRM2 konnte die Identität des Aglycons der Glucuronide als Quercetin bestimmt werden. Des weiteren zeigt das SRM2-Chromatogramm die Anwesenheit eines weiteren Metaboliten, der noch zu identifizieren ist (Abbildung 58, unten).



**Abbildung 58:** HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 1 und 2) mit Humanplasma-Proben nach oraler Gabe von Zwiebelmus.

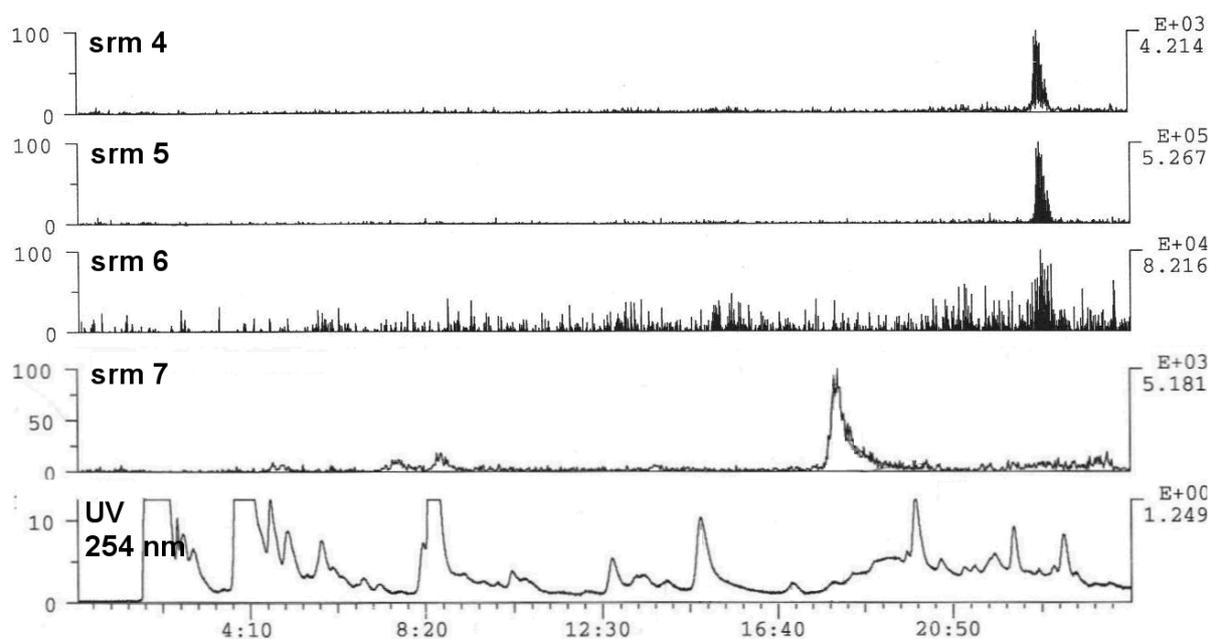


**Abbildung 59:** Vergleich der SRM 1-Experimente von Proben des UGT-Assays und des Humanplasmas nach Gabe von Zwiebeln.

Zusammengenommen demonstrieren beide SRM-Experimente die Anwesenheit von fünf Quercetinglucuroniden in humanem Plasma nach oraler Gabe von Quercetinglucosiden.

Vier der *in-vivo* detektierten Quercetinglucuronide und die vier *in-vitro* generierten Quercetinglucuronid-Referenzsubstanzen haben identische Retentionszeiten (Abbildung 59). Im Humanplasma konnte ein weiteres Glucuronsäure-Konjugat des Quercetin bei  $R_t = 13,6$  gefunden werden. Die Plasmaproben wurden ebenfalls auf frei vorliegendes Quercetin hin untersucht.

Um die Anwesenheit anderer postulierter Quercetin-Metabolite im Humanplasma zu ermitteln, wurden weitere SRM-Experimente durchgeführt (Tabelle 24, SRM 4-7). Zur Detektion von frei im Plasma vorliegendem Quercetin wurde SRM4 durchgeführt. Das entsprechende Chromatogramm in Abbildung 60 zeigte keine Signale an der betreffenden Retentionszeit ( $LOD \sim 20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Gleiche Resultate lieferten die Tests auf Anwesenheit von Quercetinglucosid (SRM5) ( $LOD \sim 20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und Quercetinsulfat (SRM6). Für beide Substanzen konnten keine Signale detektiert werden. Das SRM-Experiment 7 dagegen war erfolgreich. Die entsprechende Spur in Abbildung 60 zeigt ein deutliches Signal. Die Identität des im Plasma erhaltenen Signals für Isorhamnetin wurde durch den Vergleich mit der Retentionszeit und dem CID-Spektrum der Referenzsubstanz bestätigt.



**Abbildung 60:** HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 4-7) mit Humanplasma-Proben nach oraler Gabe von Zwiebelmus (nach  $R_t = 20$  – Peaks der Spülphase).

## 7 Glucuronidaseaktivität humaner Nabelschnur-Endothel-Zellen (HUVEC *In-vitro*-Modell)

### 7.1 Methodenentwicklung

Sowohl Literaturdaten als auch eigene Arbeiten (Kapitel 6) wiesen darauf hin, dass Quercetin nach oraler Applikation von Quercetinglykosiden systemisch hauptsächlich in Form von (fünf) Glucuronsäure-Derivaten vorliegt.

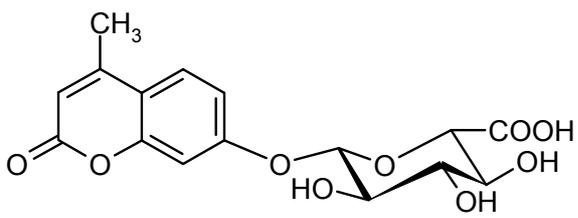
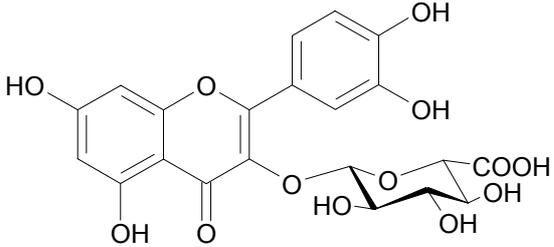
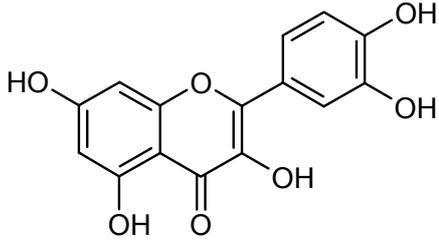
Die experimentellen Daten zu verschiedenen pharmakologisch relevanten Aktivitäten von Quercetinderivaten zeigen übereinstimmend stärkere Aktivitäten für das freie Quercetin im Vergleich mit seinen Konjugaten. Da für viele Gewebe Glucuronidaseaktivität beschrieben wurde (siehe 0), ist denkbar, daß Quercetin am Zielorgan aus seinen Konjugaten freigesetzt wird. Eine solche konjugatsspaltende Aktivität ist auch für das Venenendothel denkbar, das eine den Arterien vergleichbare Physiologie aufweist und deshalb als Modell zur Untersuchung atherogener Prozesse verwendet wird. Ausgehend von den für Quercetin beschriebenen antiatherosklerotischer Aktivitäten sollte untersucht werden, ob Quercetin am Gefäßendothel aus Konjugaten freigesetzt werden kann, und somit für dieses Gewebe eine Glucuronidaseaktivität nachgewiesen werden kann.

Als *In-vitro*-Modell für humanes Venenendothel-Gewebe wurden HUVEC-Zellkulturen (Human Venous Endothelial Cells) gewählt. Indikator für eine Glucuronidase-Aktivität der Endothel-Zellen *in-vitro* sollte die Spaltung von Polyphenol-Glucuroniden zu den korrespondierenden Aglykonen im HUVEC-*In-vitro*-Modell sein. Die Versuche wurden mit einer für die Bestimmung von Glucuronidase-Aktivität oft verwendeten Modellsubstanz, dem Methylumbelliferonglucuronid (MUG), durchgeführt. Des Weiteren wurde Quercetin-3-O-glucuronid (Qu3G) als zweite Testsubstanz im HUVEC-*In-vitro*-Modell untersucht. Es diente als Modellsubstanz für die Quercetinglucuronide, die nachweislich nach oraler Gabe von Quercetinglykosiden systemisch verfügbar waren (Graefe, Wittig *et al.* 2001) (Manach, Morand *et al.* 1998) (Crespy, Morand *et al.* 1999) (Kapitel 6).

Abbildung 61 zeigt die Strukturen der Modellsubstanzen 4-Methylumbelliferon-glucuronid (MUG) und Quercetin-3-O-glucuronid (Qu3G) und die nach Glucuronid-

Abspaltung entstehenden korrespondierenden Aglykone 4-Methylumbelliferon (MUB) und Quercetin (Qu).

**Abbildung 61:** Modellsubstanzen zur Überprüfung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität.

Glucuronid	Aglykon
4- Methylumbelliferonglucuronid (MUG) 	4- Methylumbelliferon (MUB) 
Quercetin-3-O-glucuronid (Qu3G) 	Quercetin (Qu) 

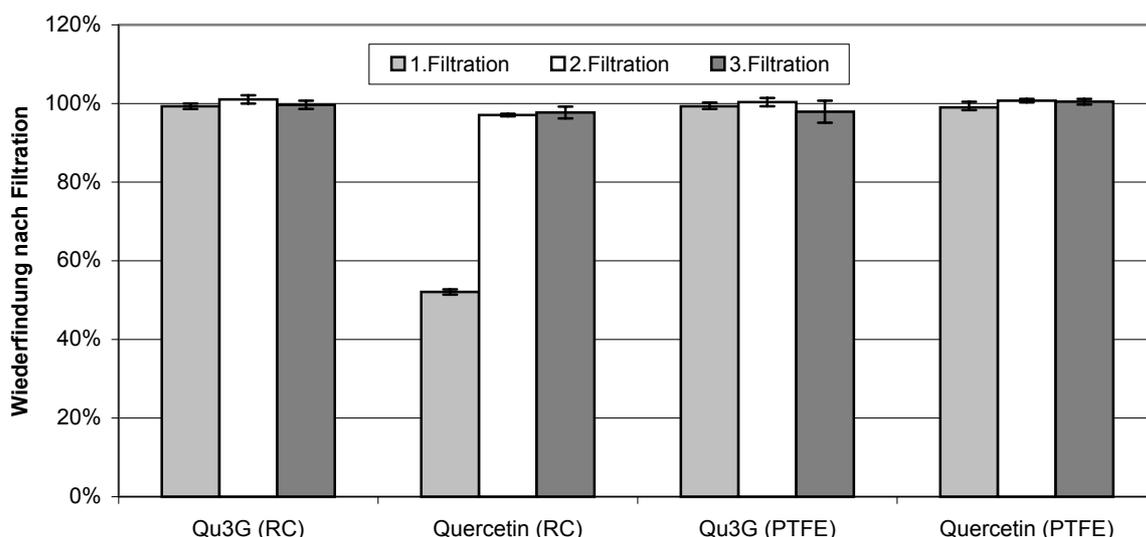
Da im Rahmen der Probenaufarbeitung ein Filtrationsschritt notwendig war, wurde die Auswahl eines geeigneten Filtermaterials, sowie die Stabilität der Analyte untersucht.

### Auswahl eines geeigneten Filtermaterials

Ein Problem bei der Filtration von Lösungen ist die möglicherweise Adsorption des Analyten am Filtermaterial. Dies hätte einen Mindergehalt des Analyten in der gefilterten Probenlösung und damit falsche Ergebnissen zur Folge. Auch die Modellsubstanzen MUG und Qu3G wurden für die Applikation auf die HUVEC-Kulturen in einem wässrigem Zellkultur-Medium (siehe Absatz 2.8) in Lösung gebracht. Diese Lösungen wurden vor der HPLC-Analyse sterilfiltriert (0,22 $\mu$ m). Um Adsorption der Analyten an Filtermaterialien zu untersuchen, wurden die Materialien „regenerierte Cellulose“ (RC) und „PTFE“ (Teflon) auf Adsorptions-Effekte getestet.

Nylon wurde ohne Test ausgeschlossen, da hier die Adsorption von polaren Substanzen bereits bekannt war.

Zur Ermittlung des Adsorptionsverhaltens der Analyten wurde die jeweilige Analyt-Lösungen in drei 150 µL-Aliquots nacheinander durch den identischen Filter filtriert und für jede Filtration separat die Wiederfindung bestimmt. (Abbildung 62).

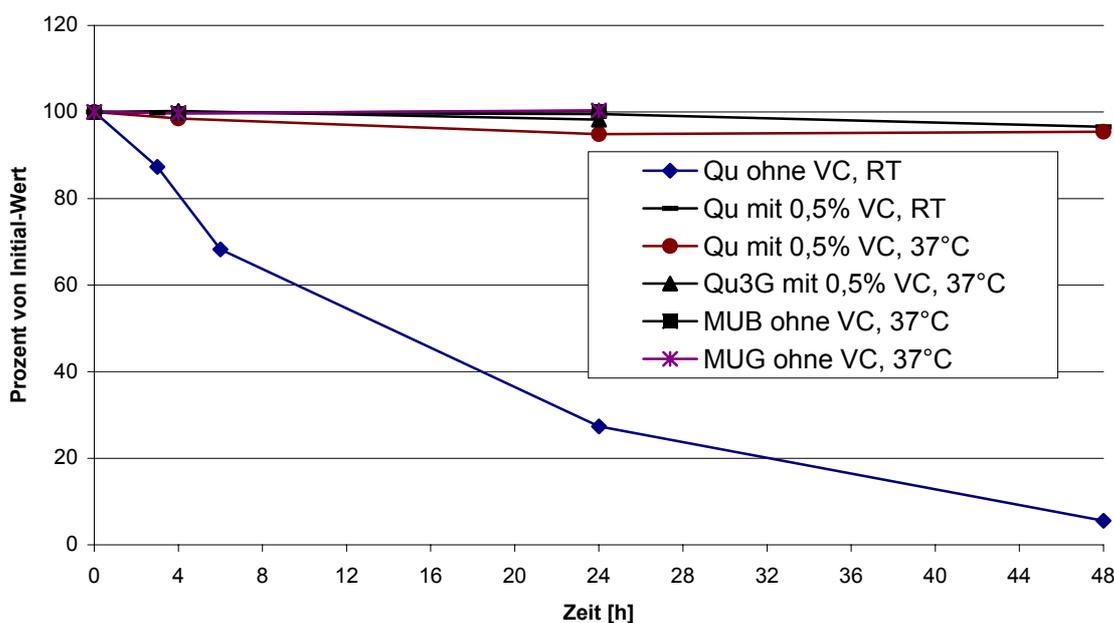


**Abbildung 62:** Wiederfindung (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung,  $n = 2$ ) von Quercetin und Quercetin-glucuronid nach Mehrfach-Filtration durch einen Filter verschiedener Filtermaterialien.

Sowohl das Adsorptionsverhalten der beiden Glucuronide (Qu3G, MUG), als auch das der Aglykone (Qu, MUB) entsprachen einander. Abbildung 62 gibt die Ergebnisse des Filtertests beispielhaft für Qu3G und Qu wieder. Qu3G zeigte keine nennenswerte Adsorption an den getesteten Filtermaterialien. Quercetin dagegen zeigte eine relativ hohe Affinität zu regenerierter Cellulose. Eine Affinität zum Filtermaterial PTFE (Teflon) konnte bei beiden Analyten nicht beobachtet werden. Deshalb wurde dieses Material für die Filtration der Probenlösungen gewählt.

### Stabilität der Analyten

Die Stabilität der Substanzen MUG, MUB, Qu3G und Qu wurde zunächst im Zellmedium bestimmt. In Abbildung 63 ist die Stabilität der Analyten unter Assaybedingungen über 24 bzw. 48 Stunden dargestellt.



**Abbildung 63:** Stabilität von MUG, Quercetin (mit und ohne Zusatz von Vitamin C - VC) in powered Medium 199 bei Raumtemperatur (RT) und unter Assay-Bedingungen (37°C, 5%ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

Mit Ausnahme des Quercetins waren alle getesteten Substanzen sowohl bei Raumtemperatur (RT, 20°C) als auch unter Assay-Bedingungen (pH ~ 7, 37 °C, 5%ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) über mindestens 24 Stunden stabil. Aufgrund der Instabilität von Quercetin (Abbildung 63) wurden der Lösung zur Stabilisierung 0,5 % Vitamin C als Antioxidans zugesetzt. Damit konnte die Quercetin-Lösung bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden, unter Assay-Bedingungen für ca. 12 Stunden stabilisiert werden.

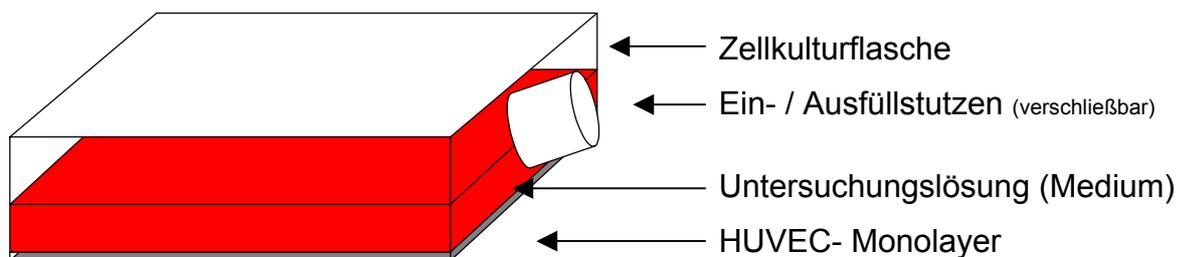
## 7.2 HUVEC-Assay

Die für den HUVEC-Assay verwendeten Endothelzellen stammten aus Nabelschnur-Venen gesunder Neugeborener. Zur Gewinnung wurden sie durch eine Collagenase-Lösung von den Venen-Innenwänden abgelöst und ausgespült. Nach Reinigung der Zellsuspension wurden Einzell-Rasen (Monolayer) in Zellkulturflaschen angezüchtet (modifiziert nach (Nolte, Eigenthaler *et al.* 1991)). Die Anzucht wurde von Frau Petra Thalheimer (Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg) durchgeführt.

### 7.2.1 Experimentelles Design

Außer dem eigentlichen HUVEC-Assay (siehe 2.8) wurden zusätzlich folgende Experimente durchgeführt:

- Um die Stabilität der Analyten während der Experimente unter Assay-Bedingungen zu ermitteln, wurden identische Untersuchungslösungen ohne HUVEC-Zellen inkubiert. Somit konnte der Teil des Glucuronids, der durch chemische Instabilität gespalten wurde, bestimmt werden. Dieser Anteil wurde von dem am HUVEC-Monolayer enzymatisch gespaltenen Teil abgezogen.
- Ebenso wurden HUVEC-Kulturen mit den entsprechenden Medien ohne Zusatz des Analyten unter identischen Bedingungen inkubiert (Kontrolle).



**Abbildung 64:** Schematische Darstellung einer Zellkulturflasche mit HUVEC-Assay.

Dabei wurde der Gehalt an Analyten nach entsprechender Probenaufarbeitung (siehe 2.8) in folgenden Lösungen bestimmt:

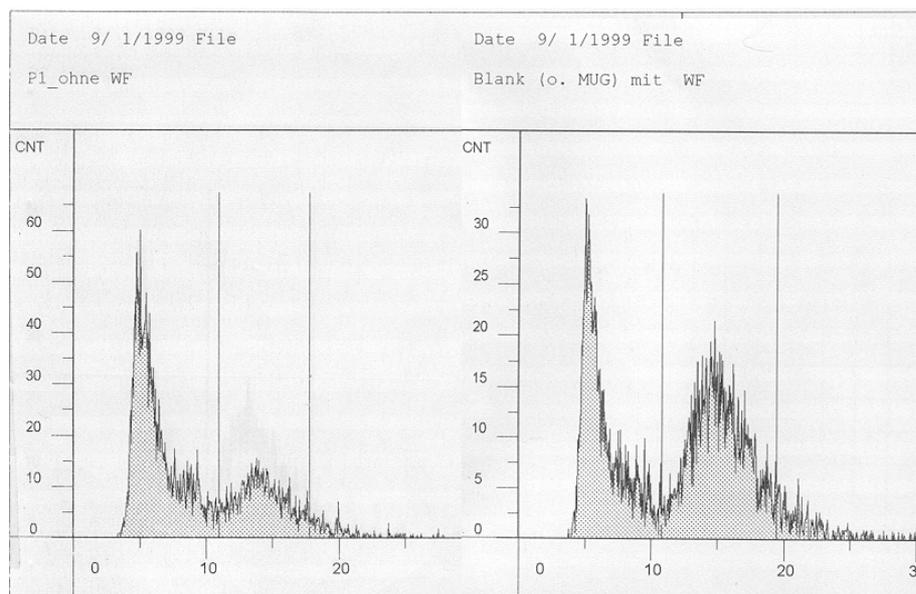
- Das inkubierte Untersuchungslösung (Medium) mit oder ohne Analyte,
- die Waschlösungen zur Beseitigung der Mediumreste vom HUVEC-Monolayer,
- die zur Ablösung der HUVEC-Zellen verwendete, und von diesen befreite Trypsin / EDTA-Lösung,
- das Zellysat.

Details zur Probengewinnung und –aufarbeitung gibt das Kapitel 2.8 im Material und Methoden-Teil.

### 7.2.2 Vitalität der HUVEC-Zellen während des Assays

Die Vitalität der HUVEC-Zellen wurde mittels Mikroskopie und Zellgrößen-Bestimmung überwacht. Mikroskopisch konnte eine Schädigung der Zellen durch Ablösen des Monolayers vom Flaschenboden erkannt bzw. Desintegration der Monolayer-Oberfläche beobachtet werden.

Zur weiteren Kontrolle wurden die Zellsuspensionen nach den Experimenten einer Zellzahl- und Größenanalyse (CASY<sup>®</sup>) unterzogen. Vitale Zellen unterscheiden sich dabei von lysierten Zellen durch ein größeres Zellvolumen um 15 fL. Je höher also der relative Anteil der voluminöseren Zellen, desto weniger geschädigt ist ein Monolayer. Abbildung 65 zeigt Ergebnisse der Zellgrößen-Analyse von Monolayern, die bereits mittels Mikroskopie als vital bzw. geschädigt identifiziert wurden.



**Abbildung 65:** Vergleich der Zellgrößen Fraktionen (gemessen mittels CASY 1<sup>®</sup>) eines geschädigten (links) und eines vitalen (rechts) HUVEC-Monolayers (unterschiedliche Ordinaten-Skala beachten, Ordinate = Counts, Abszisse = Zellvolumen [fL]).

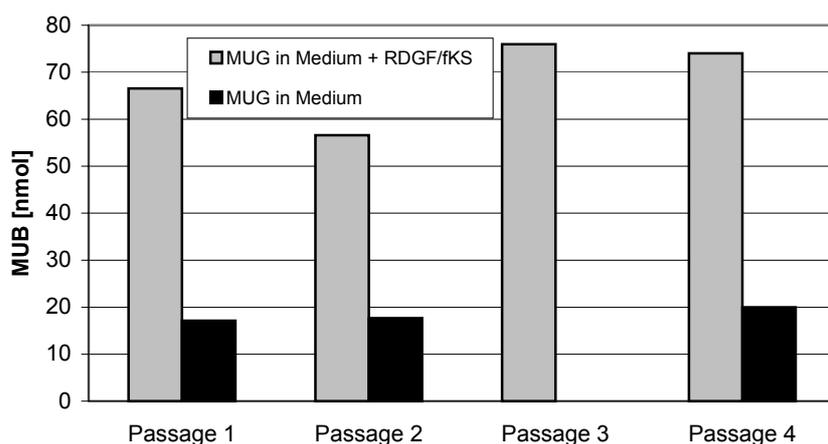
## 7.3 Glucuronidase-Aktivität humaner Endothelzellen

### 7.3.1 Einfluss der Zell-Passagen

Die Auswirkung des Alters der Zellkultur, also der Anzahl der durchlaufenen Passagen, auf die Glucuronidase-Aktivität der HUVEC-Zellen wurde anhand vergleichender Experimente untersucht.

In zwei Versuchsreihen wurden HUVEC-Kulturen der ersten bis vierten Passage mit MUG-Lösung überschichtet und für vier Stunden inkubiert. Der MUG-Lösung einer Versuchsreihe wurden dabei zusätzlich die Wachstumsfaktoren RDGF (retina derived growth factor; isoliert von Rinder Augäpfeln) und fKS (fötales Kälberserum) zugesetzt. Abbildung 66 stellt graphisch dar, dass in keinem der beiden Experimente eine Korrelation zwischen Anzahl der Zell-Passagen und Glucuronidase-Aktivität der Endothelzellen bestand.

Zu beobachten war jedoch ein starker Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Glucuronidase-Aktivität der Zellkulturen. Der Gehalt des innerhalb von vier Stunden freigesetztem MUB verdreifachte sich unter dem Einfluß von RDGF und fKS. Der Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Glucuronidase-Aktivität der HUVEC-Kulturen wurde daraufhin eingehender untersucht.

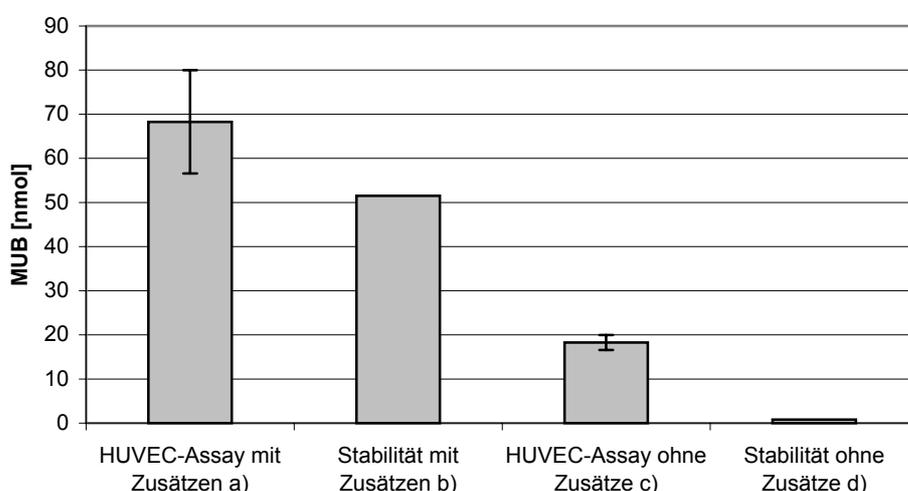


**Abbildung 66:** Gehalt an MUB im Medium nach Inkubation (4h) von HUVEC-Assays verschiedener Zellpassagen (Passage 3 mit MUG in Medium => starke Zellschädigung).

### 7.3.2 Einfluss der Wachstumsfaktoren RDGF und fKS

Während der Anzucht in künstlichen Medien bestand die Gefahr, dass die HUVEC-Zellen ihre physiologischen Eigenschaften, wie z.B. Expression von Enzymen, durch Alterung partiell oder vollständig verlieren könnten. Ursachen dafür konnten u.a. eine nicht optimale Versorgung durch das Zellmedium sein. Um die Versorgung der Zellen in *In-vitro*-Kulturen zu gewährleisten, wurden dem Zellmedium Wachstumszusätze wie RDGF und fötales Kälberserum (fKS) zugesetzt.

Die in Abbildung 66 dargestellten Daten lassen vermuteten, dass die Wachstumszusätze die Glucuronidase-Aktivität der Endothelzellen beeinflussen. Dazu wurden Monolayer unter Verwendung der Wachstumszusätze RDGF und fKS angezüchtet. Nachdem sich die Monolayer ausgebildet hatten, wurden die Zellmedien abgesaugt. Reste des Mediums wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Die bis dahin gleichbehandelten Zellrasen wurden nun in zwei Testreihen (jeweils n = 4) unterteilt. Beide HUVEC-Testreihen wurden mit MUG-Lösungen überschichtet, wobei dem Medium einer der Testreihen Wachstumszusätze (RDGF, fKS) zugesetzt wurden.

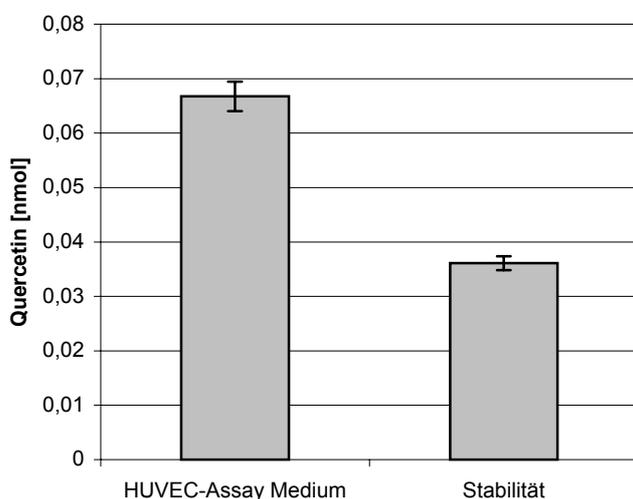


**Abbildung 67:** Einfluss der Wachstumsfaktoren RDGF und fKS auf die Glucuronid-Spaltung im HUVEC- und Stabilitäts- Assay (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung, n=4).

Es zeigte sich, dass in den HUVEC- bzw. Stabilitäts- Assays, deren Medium RDGF und fKS enthielt (Abbildung 67 a und b), erheblich mehr MUB aus MUG freigesetzt wurde als in den Assays ohne Zusätze (Abbildung 67 c und d). Der erhöhte Umsatz konnte aber nicht auf eine Stimulierung der Glucuronidase-Aktivität der Endothelzellen zurückzuführen sein, da auch in den Stabilitäts-Assays, die mit RDGF und fKS inkubiert waren wesentlich höhere MUB-Gehalte detektiert wurden (Abbildung 67 b). Vielmehr zeigten die Wachstums-Zusätze selbst eine konjugatspaltende Aktivität, die stärker als die der HUVEC-Kulturen ausgeprägt war.

### 7.3.3 Dekonjugation von Quercetin-3-O-glucuronid im HUVEC-In-vitro-Modell

Zur Verifizierung der mit MUG bzw. MUB gefundenen Glucuronidaseaktivität wurden Lösungen von Quercetin-3-O-glucuronid (Qu3G) mit HUVEC-Kulturen inkubiert. Die Glucuronidase-Aktivität der Endothel-Zellen wurde auch hier durch Detektion des enzymatisch freigesetzten Aglykons Quercetin (Qu) im Zellmedium gezeigt. Aufgrund der Instabilität des Quercetins wurde den Lösungen 0,5% Ascorbinsäure zugesetzt und die Inkubationszeit bei 37°C auf vier Stunden begrenzt. Der Anteil des Glucuronids Qu3G, der thermisch/chemisch während der Inkubationszeit zu Quercetin abgebaut wurde, konnte anhand der Stabilitäts-Experimente ermittelt werden.



**Abbildung 68:** Gehalt an Quercetin in Zellmedium nach vierstündiger Inkubation einer Quercetin-3-O-glucuronid-Lösung mit und ohne HUVEC-Zellen (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung,  $n = 2$ ).

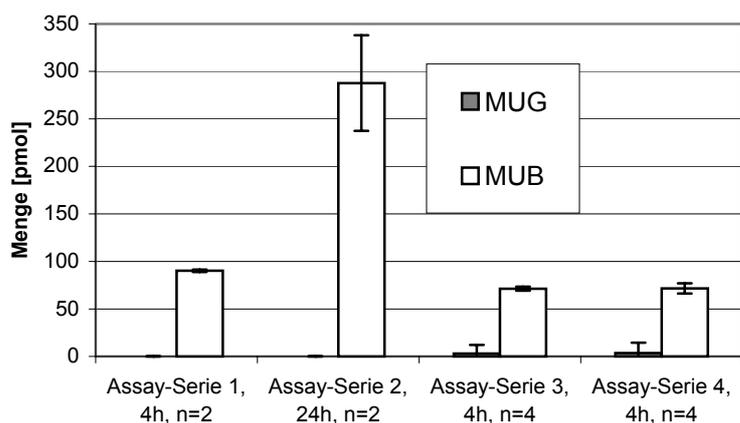
Die im HUVEC-Assay aus Qu3G freigesetzte Menge an Quercetin war ca. doppelt so groß wie die im Stabilitäts-Assay. Somit waren der Anteil des an den Endothelzellen enzymatisch gespaltenen und des chemisch/thermisch degradierten Glucuronids ungefähr gleich. Insgesamt gesehen waren die Gehalte an Aglykon in den Qu3G-Experimenten verglichen mit den Gehalten an MUB in den MUG-Experimenten sehr viel geringer.

## 7.4 Aufnahme der Aglykone in das Endothelgewebe

Um zu überprüfen, ob nach Spaltung des Glucuronids zum korrespondierenden Aglykon letzteres in die Endothelzellen aufgenommen worden war, wurden die Zellverbände der gewaschenen HUVEC-Monolayer zerstört, und die Zelllysate auf Gehalte von MUG, MUB, Qu3G und Quercetin hin untersucht.

### 7.4.1 Methylumbelliferon (MUB)

Bei Analyse der Zelllysate konnte das Aglykon MUB sowohl nach vier als auch nach 24 Stunden Inkubationszeit detektiert werden (Abbildung 69). Nach 24 Stunden ist, im Vergleich zu den vier Stunden-Gehalten, eine Zunahme an freiem MUB zu beobachten.



**Abbildung 69:** Gehalt an MUG und MUB im Zelllysate verschiedener HUVEC-Assays nach vier bzw. 24 Stunden Inkubation.

MUG konnte im Zelllysate nicht detektiert werden ( $LOD = 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Nur bei den Assay-Reihen 3 und 4 ( $n = 4$ ) wurden bei jeweils einem der vier HUVEC-Kulturen auch geringe Spuren von MUG im Zelllysate gefunden. Allerdings wiesen die Monolayer dieser zwei Kulturen bei der mikroskopischen Vitalitäts-Kontrolle starke Schäden auf. So könnten die gemessenen MUG-Gehalte Artefakte eines ungenügend effektiven Waschvorgangs gewesen sein.

### 7.4.2 Quercetin

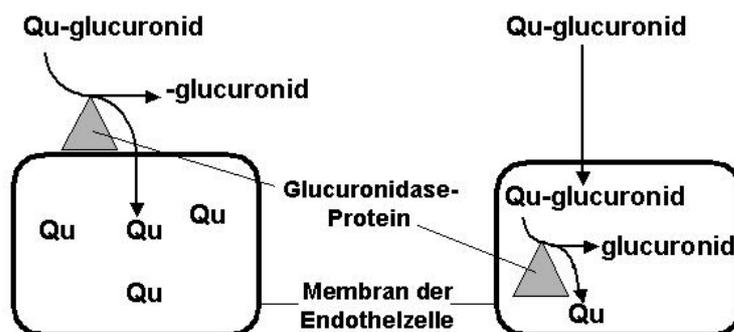
Auch bei den Experimenten mit Qu3G konnte das Aglykon Qu im Zelllysat detektiert werden (Abbildung 71).

Die Lysate nach 24 Stunden Inkubation wurden nicht analysiert, da schon nach zehn Stunden Inkubation die HUVEC-Zellen stark geschädigt waren. Der Monolayer löste sich vom Flaschenboden und desintegrierte in einzelne, teilweise lysierte Zellen.

### 7.4.3 Lokalisierung der Glucuronidase-Aktivität

Für die Deglucuronidierung der Quercetinglucuronide *in-vivo* sind prinzipiell zwei Wege denkbar:

1. Die Glucuronide werden extrazellulär bzw. während der Aufnahme dekonjugiert und das resultierende Aglykon in die Zelle aufgenommen (Abbildung 70, links). Hinweise hierfür könnte u.a. die Abwesenheit von Glucuroniden im Zelllysat, bzw. eine von der extrazellulären Konzentration abhängige Aufnahme des Aglykons in die Zelle sein.
2. Glucuronide werden zunächst intakt in die Zelle inkorporiert und erst im Zelllumen dekonjugiert (Abbildung 70, rechts). Die Anwesenheit von Glucuroniden im Zelllysat könnte diese Arbeitshypothese untermauern.



**Abbildung 70:** Mögliche Lokalisierung des Glucuronidase-Proteins und resultierende Resorptionsmechanismen von Quercetin in Endothelzellen.

Zur Untersuchung dieser Arbeitshypothesen wurden folgende Lösungen für vier Stunden mit HUVEC-Zellen inkubiert:

- Quercetin in PBS-Puffer mit 0,5 % Albumin
- Quercetin-3-O-glucuronid in PBS-Puffer mit 0,5 % Albumin
- Quercetin-3-O-glucuronid in PBS-Puffer

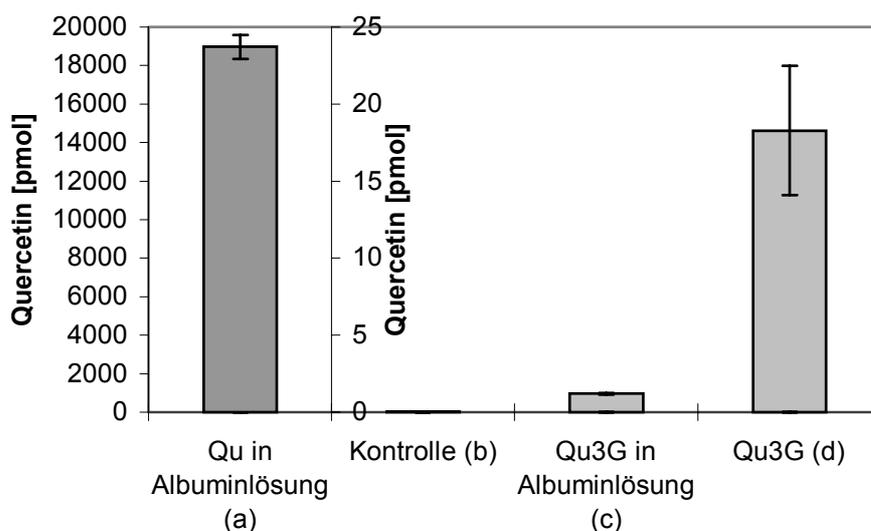
Untersucht werden sollte, inwieweit Quercetin-3-O-glucuronid im Zelllysate der HUVEC-Zellen zu detektieren sein würde bzw. in welcher Form - glucuronidiert oder deglucuronidiert – das Ausmaß der Aufnahme in die Zelle größer sein würde.

Die Analyse der Zelllysate ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 71):

- a) Nach Inkubation mit einer Quercetin Lösung in 0,5 % Albumin enthaltendem PBS-Puffer wurden ca. 19000 pmol freies Quercetin im Zelllysate detektiert. Qu3G, das durch eventuell intrazellulär vorhandene Glucuronyltransferasen synthetisiert werden könnte, wurde nicht detektiert. Vitalitätskontrollen zeigten einen stark geschädigten Monolayer.
- b) Die Inkubation des Zellmediums mit 0,5% Albumin mit HUVEC-Zellen ohne Qu bzw. Qu3G (Kontrolle) gab keine Signale bei den Retentionszeiten der Analyte.
- c) Nach Inkubation mit einer Quercetin-3-O-glucuronid Lösung in 0,5 % Albumin enthaltendem PBS-Puffer wurden ca. 2 pmol freies Quercetin im Zelllysate detektiert. Auch hier wurde kein Qu3G detektiert.
- d) Nach Inkubation mit einer Quercetin-3-O-glucuronid Lösung in PBS-Puffer wurden ca. 18 pmol freies Quercetin im Zelllysate detektiert. Das eingesetzte Glucuronsäure-Derivat Qu3G wurde ebenfalls nicht detektiert.

Die Ergebnisse der o.g. Experimente lassen eine Deglucuronidierung vor bzw. während der Aufnahme des Aglykons als wahrscheinlich gelten. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass keine Aufnahme des intakten Glucuronids in die Endothel-Zellen erfolgte. In keiner der Zelllysate wurde Qu3G detektiert (LOD  $\sim 500 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Zudem zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme von extrazellulärem freiem Qu in die Endothelzellen. Die Qu-Gehalte im Zelllysate nahmen in dem Maße ab, indem das extrazelluläre Angebot sank. Dieses extrazelluläre Angebot war bei der Qu-Albumin-Lösung am höchsten. Bei der Qu3G-Lösung c) (Abbildung 71) war das extrazelluläre Qu-Angebot geringer als bei d), weil Albumin zugesetzt wurde, das enzymatisch freigesetztes Qu sofort band, und damit der Inkorporation unzugänglich machte.



**Abbildung 71:** Quercetiningehalt in HUVEC-Zelllysaten nach Inkubation mit Quercetin bzw. Quercetin-3-O-glucuronid.

#### 7.4.4 Aufnahme oder Adsorption der Aglykone

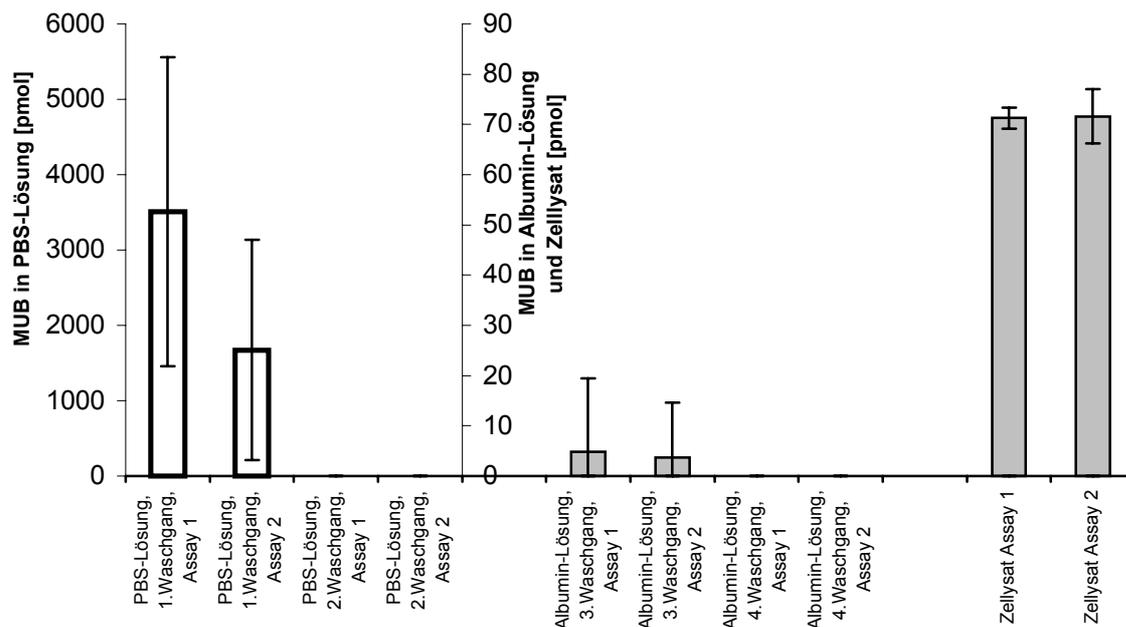
Sowohl Quercetin als auch Methylumbelliferon haben eine hohe Plasmaeweiß-Bindung (Boulton, Walle *et al.* 1999). Es ist deshalb möglich, dass am Endothel enzymatisch dekonjugiertes Aglykon an die Zellmembran-Proteine der HUVEC-Zellen adsorbiert, ohne wirklich in die Zelle inkorporiert zu werden. Bei Lyse-Behandlung mit Aceton und Ultraschall würden sowohl inkorporiertes als auch adsorbiertes Aglykon gelöst und gemeinsam im Zelllysate bestimmt. Eine analytische Differenzierung zwischen in die Zelle aufgenommenem und außen an der Zellmembran adsorbiertem Aglykon wäre nicht möglich. Durch ein vollständiges Entfernen der extrazellulär adsorbierten Substanzen vor Vollzug der Zellyse, würde man im Zelllysate nur noch inkorporiertes Aglykon detektieren.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die Reste des Inkubationsmediums mit den darin gelösten Analyten beseitigt, indem die HUVEC-Monolayer zweimal mit PBS-Puffer gewaschen wurden. Im zweiten Waschgang konnte kein Aglykon mehr nachgewiesen werden.

Um eventuell an den Zellmembranen adsorbierte Aglykone möglichst vollständig zu entfernen, wurden zusätzlich zwei Waschgänge mit einer 0,5 % Albumin-Lösung in PBS-Puffer durchgeführt. Das Albumin fungierte hier als „Wasch“-Protein. Unter

Ausnutzung der hohen Plasmaeiweiß-Bindung der Aglykone MUB und Qu wurde freies Aglykon an das Albumin gebunden bzw. extrazellulär an die HUVEC-Membranen gebundenes Aglykon von diesen abgelöst.

Die Effektivität dieser Waschschrte wurde am MUB-Gehalt in einem HUVEC-Experiment mit MUG und Albumin enthaltendem Zell-Medium untersucht. Abbildung 72 zeigt die Gehalte an MUB in den verschiedenen Waschlösungen und im Zellysate.



**Abbildung 72:** Gehalt an MUB (Mittelwert  $\pm$  größte Abweichung,  $n = 4$ ) in verschiedenen Waschlösungen und Zellysaten (unterschiedliche Ordinatoreinteilung beachten; Assay 1 und Assay 2 sind Experimente identischen Versuchsablauf).

Die zwei Waschschrte mit PBS-Puffer entfernten nahezu vollständig das nicht an Zellproteine gebundene freie MUB vom Monolayer. Die nachfolgenden zwei Albuminlösung-Waschschrte konnten Reste von an der Zellmembran adsorbiertem MUB binden und somit entfernen. In der Lösung des letzten Albuminwaschschrtes konnte kein MUB detektiert werden. Das Zellysate enthielt aber dennoch große Mengen an MUB, was auf eine Inkorporation des Aglykons hindeutete.

#### 7.4.5 Präzision des HUVEC-Assay

Aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit von HUVEC-Kulturen gleicher Herkunft und Alters konnten Experimente zur Präzision des HUVEC-Assays nur als Vierfach-Bestimmung durchgeführt werden. Minimale Forderung nach den Richtlinien-

Entwürfen der FDA zur Validierung bioanalytischer Methoden wäre eine Sechsfach-Bestimmung.

**Abbildung 73:** Daten zur Präzision des HUVEC-Assays.

	Wiederhol-Präzision		Intra-Laboratoriums-Präzision (n = 8)
	Tag 1	Tag 2	
Mittelwert der Gehalte [pmol] (n = 4)	71,31	71,60	71,46
stabw	2,72	4,40	3,39
<b>VK%</b>	<b>3,8</b>	<b>6,1</b>	<b>4,7</b>

Die während der Präzisionsabschätzung generierten Abweichungen liegen innerhalb der im Richtlinien-Entwurf der FDA empfohlenen Grenzen. Auch unter dem Gesichtspunkt, dass mit einer Vierfachbestimmung die volle Varianz des Systems HUVEC-Assay nicht erfasst wurde, war es erstaunlich präzise.

## 7.5 Validierung der Analytik

Zur Detektion von Quercetin und Quercetinglucuronid in albuminhaltigen Lösungen wurde die in Absatz 3.2.3 validierte HPLC-CAD-Methode verwendet.

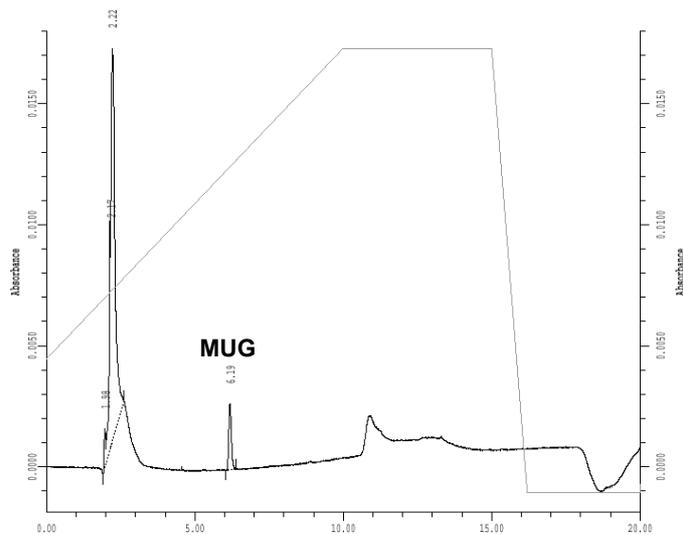
MUB und MUG wurden mit einer HPLC-UV-Methode analysiert. Geräteparameter und Methodenbedingungen sind im **Absatz 2.5 aufgeführt**.

### Selektivität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden die Chromatogramme von gespiktem Zellmedium (Konzentration 2 x LOQ) mit denen nachfolgender Lösungen verglichen. Geprüft wurde dabei auf Interferenzen zwischen den Peaks der Analyte und den verschiedenen Matrix-Peaks in den Lösungen von:

- Zellmedium mit und ohne Albuminzusatz,
- Zellmedium mit und ohne Albuminzusatz nach Inkubation mit HUVEC-Zellen,
- PBS-Puffer,
- bei 37°C gestressten Lösungen der Analyte,
- Zelllysat der Kontroll-Assays (siehe 7.2.1).

Kein Signal in den genannten Lösungen zeigte signifikante Überlagerungen mit den Signalen der zu bestimmenden Analyte.

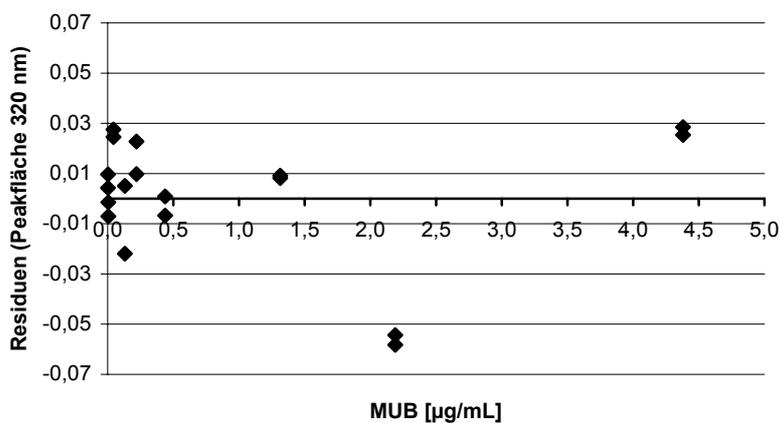


**Abbildung 74:** Chromatogramm eines mit MUG (ca.  $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1} \approx 4 \times \text{LOD}$ ) gespikten HUVEC-Zelllysates.

### Linearität

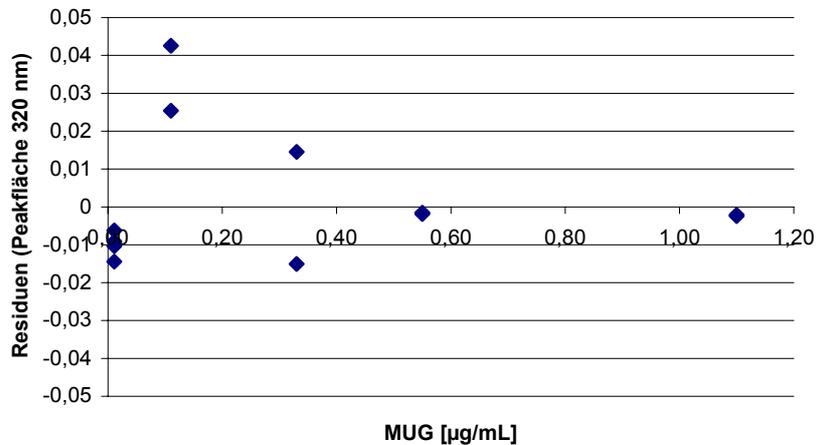
Die Linearität der HPLC-UV-Methode wurde für MUG und MUB durch Doppelbestimmung von gespiktem Zellmedium an acht Konzentrationsstufen bestimmt. Der Residuen-Plot zeigte eine Verteilung der Kalibrierwerte um die Kalibrierfunktion ohne erkennbare Tendenz. Es wurde deshalb auf Linearität geschlossen.

Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Kalibriergeraden für MUB betrug 0,9999.



**Abbildung 75:** Residuen-Plot der Kalibriergeraden für 4-Methylumbelliferon (MUB) in Medium 199.

Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Kalibriergeraden für MUG betrug 0,9993.

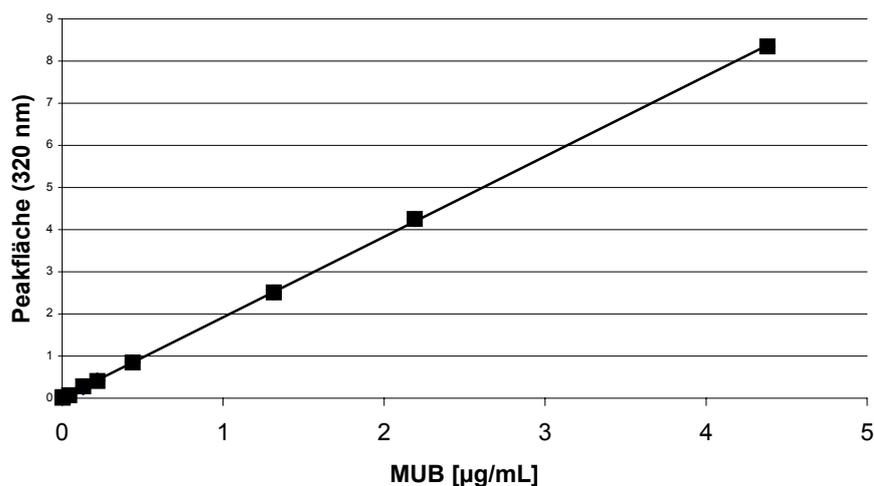


**Abbildung 76:** Residuen-Plot der Kalibriergeraden für 4-Methylumbelliferonglucuronid (MUG) in Medium 199.

### Kalibrierdaten

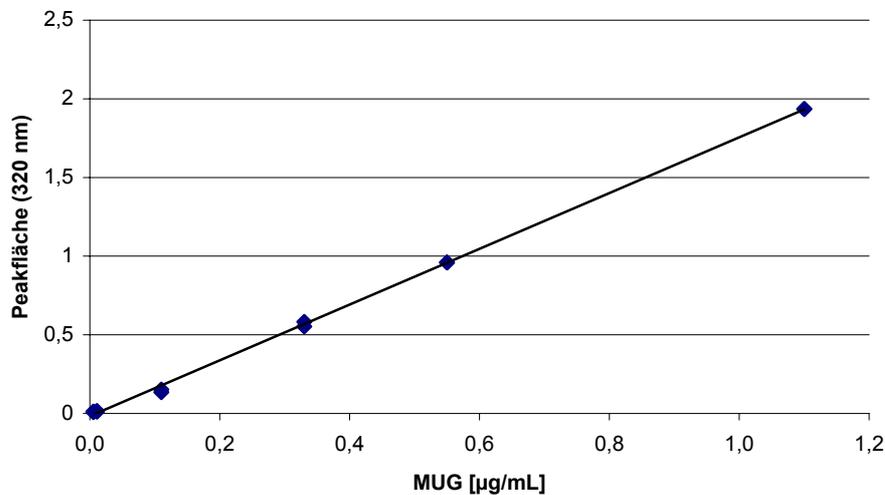
Aus den Daten zur Bestimmung der Linearität wurden die Kalibrierfunktion zu MUB und MUG errechnet. Die Abbildung 77 und Abbildung 78 stellen die Kalibrierfunktionen für die betreffenden Analyte graphisch dar.

Aus den Daten zur Bestimmung der Linearität wurde für MUB die Kalibrierfunktion  $y = 1,9094 x + 0,0124$  errechnet.



**Abbildung 77:** Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferon (MUB) in Zellmedium.

Aus den Daten zur Bestimmung der Linearität wurde für MUG die Kalibrierfunktion  $y = 1,7731 x + 0,0173$  errechnet.



**Abbildung 78:** Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferonglucuronid (MUG) in Zellmedium.

### Nachweisgrenze (LOD, limit of detection)

Als Nachweisgrenze wurde die Stoffkonzentration festgesetzt, an der das Signal des Analyten das Drei- bis Vierfache des Rauschen betrug. Für MUB lag das LOD bei  $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,45 \text{ pmol}$  on column,  $M_r = 176,17$ ), für MUG bei  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,06 \text{ pmol}$  on column,  $M_r = 352,3$ ).

### Präzision und Systemeignungstest

Die Validierungsstrategie bei dieser Versuchsreihe sah die Bestimmung der Wiederholstandardabweichung während jeder Messreihe innerhalb eines Systemeignungstests (SST, system suitability test) vor. Dieser wurde vor einer Proben-Sequenz durchgeführt.

Innerhalb des SST wurde eine Standardlösung mit definierter Einwaage beider Analyte angefertigt und in drei HPLC-Vials überführt. Aus jedem der Vials wurden zwei Proben gezogen und analysiert. Aus den sechs resultierenden Peakflächen wurden die Kenndaten Mittelwert, Stichproben-Standardabweichung (sdv) und Variationskoeffizient (VK) errechnet. Diese Werte repräsentierten direkt die System-Präzision.

Zusätzlich wurde eine zweite Standardlösung mit leicht von Lösung 1 abweichender Einwaage beider Analyten angefertigt, und in zwei HPLC-Vials überführt. Aus jedem der Vials wurde eine Probe gezogen und analysiert. Aus den zwei resultierenden Peakflächen wurde der Mittelwert errechnet (Abbildung 79). Aus den Mittelwerten und Stoffkonzentrationen wurde dann der response factor (RF) errechnet (Formel 6).

**Abbildung 79:** Systemeignungstest mit Präzisionsdaten für MUG an einer HPLC-UV-Anlage bei 320 nm.

STD1	<b>Peakfläche</b>	<b>Mittelwert =</b> <b>0,496</b> <b>Standardabweichung =</b> <b>0,005</b> <b>VK</b> <b>0,9</b>
	0,4969	
	0,5034	
	0,4978	
	0,4927	
	0,4922	
0,4915		
STD2	0,5007	<b>Mittelwert =</b> <b>0,500</b>
	0,4983	
Standard-Signalvergleich =>		99,8%                    (Soll 98-102%)

$$f_r [\%] = \frac{m_{\text{Lösung 1}} \cdot x_{\text{Lösung 2}}}{m_{\text{Lösung 2}} \cdot x_{\text{Lösung 1}}} \cdot 100$$

**Formel 6:** Berechnung des response factor.

Anhand der Kenndaten VK und RF wurde die Eignung des HPLC-UV-Systems für die laufende Analyse festgestellt. Das System galt bei  $VK < 1,5$  und  $98\% > RF < 102\%$  als geeignet.

### Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit der Methode wurden die Peakflächen der Mehrfachinjektion ( $n = 6$ ) aus dem SST (siehe Abbildung 79) genutzt. Der Mittelwert der Peakflächen ( $n = 6$ ) wurde als „Wahrer Wert“ für die Konzentration  $c_{\text{STD}}$  festgelegt. Die Richtigkeit wurde nun als prozentuale Abweichung der aus der Kalibriergeraden errechneten Fläche für  $c_{\text{STD}}$  zum „Wahren Wert“ angegeben (Abbildung 80). Die Methode galt als richtig, wenn die prozentuale Abweichung vom „Wahren Wert“ kleiner 1,5 % war. Die Methode erfüllte dieses Einschlusskriterium.

**Abbildung 80:** Berechnung der Richtigkeit aus Präzisions- und Kalibrierdaten für MUG an einer HPLC-UV-Anlage bei 320 nm.

Konzentration $c_{\text{STD}} = 0,2910 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
<b>Peakflächen (SST)</b>	
0,4969	<b>Mittelwert Peakflächen (SST) =</b> 0,4957
0,5034	<b>Peakfläche für <math>c_{\text{STD}}</math> aus Kalibriergerade =</b> 0,4987
0,4978	
0,4927	Abweichung = 0,003
0,4922	<b>prozentuale Abweichung =</b> <b>0,59%</b>

## 8 Diskussion

### *Validierung von Methoden zur Qualitätskontrolle pflanzlicher Zubereitungen*

Die Anforderungen zur Validierung von analytischen Methoden für die pharmazeutische Qualitätskontrolle sind in den aus den ICH Leitlinien (ICH 1995; ICH 1996) abgeleiteten Vorgaben für den Europäischen Bereich vorgegeben (CPMP and ICH 1994; CPMP and ICH 1996). Besonderheiten für die Qualitätsanalytik pflanzlicher Arzneimittel werden teilweise in Leitlinien angesprochen, die von der "Herbal Medicinal Plants Working Group" der EMEA erarbeitet wurden (CPMP and CVMP 2000) und sich zur Zeit im Anerkennungsverfahren des CPMP befinden. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch ein kürzlich vom Bundesfachverband der Arzneimittelhersteller herausgegebenes Handbuch (Amborn, Anhalt *et al.* 2001), in dem die Umsetzung der ICH-Leitlinien auf die spezifischen Belange der Qualitätsanalytik pflanzlicher Arzneimittel detailliert beschrieben wird. Durch dieses regulatorische Umfeld wird die Qualitätsanalytik für pflanzliche Arzneimittel in Deutschland heute auf einem sehr hohen Standard betrieben. Die diesbezüglichen Grundlagen wurden in den letzten drei Jahrzehnten an Hochschulen und der Industrie erarbeitet. Dabei sind heute noch längst nicht alle Probleme gelöst, die sich aus der Tatsache ergeben, dass die Wirkstoffe in pflanzlichen Arzneimitteln (z.B. Extrakte) komplexe Stoffgemische darstellen, deren singuläre wirksame Prinzipien in den meisten Fällen nicht bekannt sind. Hier setzten die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit an, die auch die Weiterentwicklung von Konventionenmethoden der Analytik pflanzlicher Arzneimittel an ausgewählten Beispielen zum Gegenstand hatten. Die neu entwickelten Methoden sollten dabei entsprechend der geltenden regulatorischen Vorgaben validiert werden.

Beide in dieser Arbeit zur Gehaltsbestimmung von Procyanidinen in Weißdorn-Fertigarzneimitteln verwendete Methoden wurden in Anlehnung zu existierenden Guidelines (ICH 1995; ICH 1996) validiert. Dabei wurden für die kolorimetrische Gesamtprocyanidin-Bestimmung Variationskoeffizienten (VK) von 3,5 – 7 % für die Wiederholstandardabweichung (n = 4) bzw. 8,5 % für die Intra-Laboratoriumsstandardabweichung (n = 8) ermittelt. Ähnliche Werte wurden bei der

Validierung der HPLC-Nachsäulenderivatisierung (NSD)-Methode mit einer Intra-Laboratoriumsstandardabweichungen der einzelnen Procyanidine zwischen VK = 2 - 5 % bestimmt. Der Wert für Catechin lag bei VK = 20%, da die gemessenen Konzentrationen unter dem LOQ lagen. Von einer Aufkonzentrierung der Probe wurde abgesehen, da die in sehr viel größerer Konzentration enthaltenen Hauptkomponenten Epicatechin und Procyanidine B2 dann außerhalb des linearen Bereichs des UV-Signals liegen.

In Vergleich zu allgemein anerkannten Standards bei der Analyse chemisch-definierter Substanzen (VK = 1-2%) sind die ermittelten Präzisionswerte sehr hoch. Der Vergleich ist aber nicht ganz zulässig, da die Analyse pflanzlicher Zubereitungen eher mit der Analytik human- oder tierbiologischer Proben vergleichbar ist. So führt in beiden Bereichen der Analytik die Komplexität der Matrix häufig zu Interferenzen mit dem zu bestimmenden Analyten. Des weiteren können in diesen Stoffgemischen chemische oder enzymatische Reaktionen ablaufen, die ein Analysenergebnis beeinflussen können. Im Gegensatz zur Bioanalytik, bei der neuere Guideline-Entwürfe größere Spannen für Präzision und Richtigkeit zulassen (FDA and CDER 1998), existieren solche sinnvoll aufgeweiteten Richtwerte für die Phytoanalytik bisher nicht.

Dass die Präzisionswerte bei Analyse von Pflanzenextrakten teilweise starken Schwankungen unterliegen können, zeigten vergleichbare Arbeiten zur kolorimetrischen Procyanidinbestimmung von Rehwald *et al.* (Rehwald 1995). Bei diesen liegen die VK-Werte zwischen 5 und 10 % nach Anwendung der Methode des Europäischen Arzneibuches (Ph.Eur. 1999). Unter Anwendung derselben Methode wurde dagegen von Rohr *et al.* ein VK von 0,89 % (n = 3) für die Bestimmung der Reinsubstanz Procyanidin B2 ermittelt (Rohr 1999).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Werte einzelner Validierungsparameter in der Phytoanalytik erheblich schwanken können. Das trifft sowohl für die Analyse strukturverwandter Analyte mit identischen Methoden, als auch für die Bestimmung identischer Strukturen mit unterschiedlichen Methoden zu. Daraus folgt, dass eine Validierung immer streng stoff- und methodenspezifisch

erfolgen muss. Ein Vergleich von, mit unterschiedlichen Methoden erhaltenen, Ergebnissen ist damit kritisch zu betrachten.

Weiterhin zeigt sich, dass es nicht sinnvoll ist, Validierungsparameter der einschlägigen Leitlinien unkritisch abzuarbeiten. So können z.B. zur Erfassung der Varianz einer Methode mehr als die in Leitlinien (ICH 1996) empfohlenen sechs Bestimmungen notwendig sein. Leitlinien können immer nur eine allgemeine Mindestanforderungen darstellen, die vom Analytiker an die Praxis angepasst werden müssen.

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Procyanidinen im Europäischen Arzneibuch wird die saure Hydrolyse von Procyanidinen genutzt. Mit dieser Methode können aber keine monomeren Procyanidine wie Epicatechin und Catechin bestimmt werden. Weiterhin steht der zur Quantifizierung benötigte und in der Monographie Weißdornfrüchte angegebene Wert der spezifischen Absorption von Cyanidinchlorid von  $A_{1cm}^{1\%} = 75$  im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit bestimmten Wert von  $A_{1cm}^{1\%} = 1000$ . Zeitgleich konnten auch andere Autoren den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Wert bestätigen (Rohr and Meier 1997; Leipolz 1999; Rohr 1999).

Der im Europäischen Arzneibuch angegebene Wert ist demnach wahrscheinlich falsch, liefert aber im Vergleich zum Gebrauch des Wertes  $A_{1cm}^{1\%} = 1000$  richtigere Werte. Möglicherweise haben die Autoren des Europäische Arzneibuches die nicht stöchiometrisch verlaufende Hydrolyse-Reaktion (Thompson, Jacques *et al.* 1972; Powell and Clifford 1995) berücksichtigt, und damit einen "fiktiven" Absorptionskoeffizient für Cyanidinchlorid angegeben. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass der in dieser Arbeit mit der Methode des Europäischen Arzneibuches bestimmte spezifische Absorptionskoeffizient von Procyanidin B2 von  $A_{1cm}^{1\%} = 63,2$  ungefähr dem Arzneibuchwert von Cyanidinchlorid  $A_{1cm}^{1\%} = 75$  entspricht.

Des weiteren ergaben die, in der vorliegenden Arbeit nach Vorschrift des Europäischen Arzneibuch durchgeführten Bestimmungen der spezifischen Absorptionen von Cyanidinchlorid, Procyanidin A2 und Procyanidin B2 eine mangelnde Robustheit der Methode. Kleinste Veränderungen in Bezug auf Lösungsmittel, pH-Wert (Thompson, Jacques *et al.* 1972) und Extraktionszeit resultierten in z. T. stark abweichenden Ergebnissen. Demnach ist das Hydrolyse-

Verfahren des Europäischen Arzneibuches aus heutiger Sicht vergleichsweise störanfällig und sollte durch geeignetere Verfahren ersetzt werden.

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Procyanidinen wurde in der vorliegenden Arbeit die Derivatisierung mit DMAZA genutzt. Diese ist weit weniger anfällig gegen Interferenzen durch Pigmente (z.B. Anthocyanidine) und Änderungen der Analysebedingungen (Treutter 1989; Rohr 1999). Im Vergleich zu der im Europäischen Arzneibuch monographierten Bestimmungsmethode, ermöglicht diese Methode eine bessere Abschätzung des tatsächlichen Gehaltes von Weißdornzubereitungen. Denn, im Gegensatz zur Methode des Europäischen Arzneibuches liefert bei Umsetzung mit DMAZA jedes Procyanidin, unabhängig vom Polymerisierungsgrad, nur ein Kondensationsprodukt (Mc Murrough 1978). Die Ergebnisse der Methode werden daher viel weniger von der Oligomerenzusammensetzung der untersuchten Extrakte beeinflusst. Insgesamt werden so auch im Vergleich mit der Methode des Europäischen Arzneibuches deutlich niedrigere Procyanidin-Gehalte bestimmt (Leipolz 1999).

Aber auch bei der Gruppenbestimmung mit DMAZA sind die Absorptionen der gebildeten Derivate für jedes Procyanidin unterschiedlich, was die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Kalibrierdaten von Epicatechin, Procyanidin A2 und Procyanidin B2 zeigen. Dies macht die Wahl eines Kalibrierstandards schwierig.

Daher wurde in dieser Arbeit zur kolorimetrischen Quantifizierung von Procyanidinen ein Kompromiss eingegangen und Procyanidin B2 als Kalibrierstandard verwendet. Denkbar wäre, in Zukunft angereinigte Procyanidin-Fractionen als Kalibrierstandards zu verwenden, da diese ein den Proben vergleichbares Procyanidingemisch enthalten. Dies hätte auch den großen Vorteil, dass in solchen angereinigten Gemischen die Procyanidine viel stabiler sind. Entsprechende Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen früher publizierte Daten (Leipolz 1999) (Rohr 1999).

Nach den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, scheint die kolorimetrische Bestimmung der Procyanidine mit DMAZA in Verbindung mit dem Kalibrierstandard Procyanidin B2, den tatsächlichen Procyanidingehalt von Weißdorn-Zubereitungen am besten zu beschreiben. Zusätzliche Informationen erhält man durch Kombination der Methode mit der HPLC-Nachsäulenderivatisierung.

Die vorliegenden Arbeiten zum Vergleich der Bestimmungsmethoden stellen klar heraus, dass Procyanidingehalte nur vergleichbar sind, wenn sie mit identischen Methoden unter Verwendung identischer Kalibrierstandards generiert wurden. Eine Überarbeitung bzw. ein Ersetzen der im Europäischen Arzneibuch verwendeten Bestimmungsmethode durch geeignetere Verfahren würde einen entscheidenden Beitrag zur besserer Akzeptanz der Arzneibuchmethode und damit zur Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen leisten.

*Qualitätskontrolle Weißdornblätter mit Blüten-Extrakt enthaltender Fertigarzneimittel*

Durch Kombination zweier Verfahren zur Bestimmung des Procyanidingehaltes konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig zur Bestimmung des Procyanidin-Gesamtgehaltes (Gruppenbestimmung mit DMAZA) auch der Anteil an mono- bis trimeren Procyanidinen (HPLC-Nachsäulenderivatisierung) bestimmt werden. Unter Verwendung dieser Methodik wurden neun der in Deutschland marktführenden Weißdornpräparate (sowohl feste als auch flüssige orale Arzneiformen) hinsichtlich ihres Procyanidingehaltes und Procyanidinspektrums vergleichend analysiert (Wittig *et al.* 2001b).

Publizierte Untersuchungen zu Procyanidin- oder Flavonoid-Gehalten in Weißdorn-fertigarzneimitteln fehlen weitgehend. Einzig die Deklaration der Hersteller kann als Bezugswert herangezogen werden. Bis heute ist eine solche Deklaration in Deutschland nur für ein Präparat zugelassen, bei dem 78-90 mg oligomeren Procyanidinen pro Filmpille angegeben werden. Der im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Gehalt für alle untersuchte Präparate lag abhängig von angewandeter kolorimetrischer Bestimmungsmethode mit 68-72 mg (bestimmt nach Europäischen Arzneibuch) und 13-24 mg (bestimmt nach Derivatisierung mit DMAZA) z.T. wesentlich unter dieser Deklaration. Ein kritischer Vergleich der jeweils ermittelten Werte ist allerdings nicht möglich, da von Seiten der Hersteller keine Angaben zur Analytik gemacht werden.

Berechnet auf die mit einer Tagesdosis der jeweiligen Präparate verabreichten Menge Procyanidine, ergaben sich Unterschiede sowohl im Procyanidin-Gesamtgehalt (15 bis 55 mg), als auch im jeweiligen Spektrum an Mono- bis

Trimeren. Vergleichbare Schwankungen zeigten sich auch innerhalb verschiedener Chargen eines Präparates.

Diese Unterschiede scheinen jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die pharmakologische Wirkung der Präparate zu haben, wie die Arbeiten von Vierling *et al.* (Vierling, Brand *et al.* 2000) zeigten. In dieser Publikation wurde *in-vitro* die relaxierende Wirkung von ähnlichen, z.T. sogar identischen Weißdorn-Extrakten auf isolierte, durch Noradrenalin kontrahierte Aortenringe des Meerschweinchens geprüft. Aus den von Vierling *et al.* publizierten Daten kann gefolgert werden, dass die in dieser Arbeit bei Fertigarzneimitteln detektierten Unterschiede in Procyanidingehalt und –spektrum deren pharmakologische Wirkung kaum beeinflussen. Dies könnte sich aus der grossen therapeutische Breite von Weißdornzubereitungen erklären, und daraus, dass die pharmakologische Qualität einer Weißdornzubereitung nicht nur durch Procyanidine, sondern auch durch andere Inhaltsstoffe wie Flavonoide und andere Polyphenole bestimmt wird (Rohr and Meier 1997).

Das die, in dieser Arbeit gezeigten Unterschiede in Procyanidingehalt und an mono- bis trimeren Procyanidinen von Weißdornzubereitungen nur geringen Einfluss auf die pharmakologischen Wirkungen haben, trägt zum besseren Verständnis des Wirkprinzips des Weißdorn an sich bei. Die Bedeutung der ohnehin in pharmakologischem Interesse stehenden oligomeren Procyanidine, wird durch die vorliegenden Ergebnisse weiter betont. Ziel weiterführender Arbeiten sollte die Entwicklung von noch selektiveren Methoden zur Trennung und Analyse oligomerer und polymerer Procyanidine sein. Nur damit könnten mit unterschiedlich zusammengesetzten Extrakten die in pharmakodynamischen Modellen erhaltenen unterschiedlichen Ergebnisse auf eine stoffliche Grundlage zurückgeführt werden. Mit großer Sicherheit wird die pharmazeutische Qualität von Weißdornpräparaten entscheidend durch den Polymerisierungsgrad der enthaltenen Procyanidine bestimmt. Mit der hier vorgestellten HPLC-Methode mit Nachsäulenderivatisierung kann erstmals zumindest einen Teil der Gesamtprocyanidinfraktion als Mono-, Di- oder Trimere identifiziert werden. Sie ist somit, zumindest für die pharmazeutische Qualitätskontrolle, besser geeignet als die bisher verwendeten Methoden. Auch für die den Herstellungsprozess begleitende Analytik bietet diese Methode große

Vorteile, weil durch die mit der Methode erreichbare Diskriminierung Um- und Abbauprozesse der Procyanidine besser verfolgt werden können.

Die in der vorliegenden Arbeit unter verschiedenen Lagerbedingungen durchgeführten Tests auf Stabilität der isolierten Procyanidine A2 und B2 zeigten, dass Licht den Abbau der Procyanidine am stärksten begünstigte. Nach 60 Tagen war bei Tageslicht gelagertes, in wässriger Lösung vorliegendes Procyanidin B2 fast vollständig zerfallen. Positiv auf die Stabilität der Procyanidine wirkte sich die Lagerung unter Inertgas (N<sub>2</sub>), die Lagerung als Feststoff und die Kühlung der Substanzen aus. Bei -80°C gelagerte Proben waren unabhängig davon, ob sie als Lösung oder Feststoff gelagert wurden, über zwei Monate stabil. Procyanidine in Extrakten, die bei -20°C gelagert worden waren, zeigten kaum Instabilität.

Da Procyanidine, besonderes in Lösung, sehr leicht oxidieren, komplexieren bzw. polymerisieren (Stafford and Lester 1980; Putman and Butler 1989; Rohr and Meier 1997; Leipolz 1999), ist eine Stabilitätskontrolle besonders von flüssigen Weißdornzubereitungen unabdingbar. So kann sich das Procyanidin-Spektrum einer solchen Zubereitung, aufgrund der fortschreitenden Polymerisierung von Procyanidinen während der Lagerung, dramatisch verändern. (Spencer *et al.* 1988) (Haslam, Lilley *et al.* 1989). So zeigten Krawczyk *et al.*, dass in Crataegus-Extrakten nach einem Jahr keine Dimere mehr nachzuweisen waren, der Anteil oligomerer Procyanidine sank während der der polymeren Procyanidine zunahm (Krawczyk, Petri *et al.* 1991).

#### *Renale Elimination von Hydrochinon aus Arbutin*

Die postulierte harndesinfizierende Wirksamkeit von Bärentraubenblätter-Extrakten soll auf das im Harntrakt aus konjugierten Vorstufen freigesetzte Hydrochinon zurückgehen (siehe 1.4.1). Die dazu durchgeführten Humanstudien hatten deshalb zum Ziel, freies Hydrochinon im Urin nachzuweisen.

Durch Anwendung einer sehr sensitiven Methode mit coulometrischen Array-Detektion (CAD, LOQ = 12,5 ng on column bzw. LOD = 625 pg on column) (siehe 1.3.2) konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals pharmakokinetische Daten zu freiem Hydrochinon in Urin erhoben werden (Wittig *et al.* 2001c). Nach oraler Gabe

von 210 mg Arbutin in Bärentraubenblätterextrakt-Dragees (945 mg Extrakt) wurde ca. 0,18 % als freies Hydrochinon ausgeschieden. Dabei lag die Phase der maximalen Hydrochinonausscheidung zwischen vier und acht Stunden nach Verumgabe.

Nur eine der bis dato zur Thematik publizierten Arbeiten (Sieggers, Sieggers *et al.* 1997) konnte mit einer ebenfalls sehr sensitiven Methode, der HPLC-Fluoreszenz-Methode (LOD = 6 ng on column), nach oraler Gabe von Bärentraubenblätterextrakt-Dragees (420 mg Arbutin) freies Hydrochinon im Urin eines Probanden-Teilkollektives (6 von n = 12) detektieren. Da die Publikation keinerlei Aussagen zu Probenaufarbeitung macht, ist eine kritische Auseinandersetzung mit der angewendeten Analytik schwer. Unklar ist z.B. ob der gesammelte Urin bis zur Analyse stabilisiert wurde. Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen zeigen, dass Hydrochinon in wässrigen Lösungen selbst bei 15°C nur für ca. 24 Stunden stabil ist. Somit blieb die Aussage der Studie von Sieggers *et al.* zur postulierten Anwesenheit frei im Harn vorkommenden Hydrochinons an sich unklar.

Erst durch die in der hier vorgestellten Arbeit vorgestellten Daten war eine Korrelation von *in-vitro* generierten Daten zur antibakteriellen Wirkung von Hydrochinon und der postulierten harndesinfizierenden Wirkungen von Bärentraubenblätterextrakten möglich. Dabei wird klar, dass zumindest bei gesunden Probanden die aus Konjugaten in den ableitenden Harnwegen freigesetzten Hydrochinonmengen nicht für eine harndesinfizierende Wirkung ausreichen.

Eine Harnalkalisierung als Voraussetzung für die Freisetzung freien Hydrochinons in den unteren Harnwegen ist ein in der Literatur häufig zu findender Erklärungsansatz für die postulierte Wirksamkeit von Bärentraubenblätter-Zubereitungen. So konnte nach Alkalisierung des Harns *in-vitro* (Frohne 1970) bzw. durch Komedikation mit Diuramid *in-vivo* (Kedzia, Wrocinski *et al.* 1975) die bakterizide Wirkung des Probandenurins nachgewiesen werden. In der therapeutischen Praxis ist eine solche Alkalisierung des Harns über vegetarische Diäten bzw. Komedikation aufgrund von Compliance-Problemen nur schwer durchführbar, und deshalb kaum relevant.

Die Freisetzung bakteriziden Hydrochinons durch an der Entzündung beteiligter Mikroorganismen könnte eine Wirkung entsprechender Zubereitung bei Patienten erklären. Eine autozide Wirkung von *E. coli*-Stämmen konnten z.B. Siegers et al. in an Hydrochinonkonjugaten reichen Urin zeigen. Zur Klärung dieser Hypothese bietet die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte, ausreichend sensitive Bestimmungsmethode erstmals die Möglichkeit entsprechende Studien mit Patienten durchzuführen.

### *Systemische verfügbare Metabolite des Quercetins*

Viele der bisher durchgeführten Bioverfügbarkeitsstudien zu Quercetin bzw. Quercetinglykosiden aus verschiedenen Matrices verwendeten analytische Methoden, mit denen nach Hydrolyse in Plasma und Urin nur freies Quercetin bestimmt werden konnte. Das lag einerseits daran, dass ausreichend selektive Methoden nicht zur Verfügung standen, mit denen Phase-II-Konjugate neben Glykosiden und den Aglyka bestimmbar waren. Andererseits machte die für die Plasmanalytik erforderliche Empfindlichkeit den Einsatz fluorimetrischer Methoden erforderlich. Solche Methoden erfassen Quercetin aber grundsätzlich nur als Aglykon, da die Fluoreszenzausbeute bei Substitution der Hydroxylgruppen dramatisch abnimmt. Bei Verwendung solcher Methoden erhält man zu einen keine Information über das tatsächlich vorliegende Phase-II-Metabolitenspektrum, zum anderen lässt sich auch nicht ermitteln, welcher Anteil an freiem Quercetin neben Phase-II-Metaboliten bioverfügbar ist (Graefe, Derendorf *et al.* 1999).

Aus diesem Grund war zu Beginn dieser Arbeit (1997), aufgrund der analytischen und methodischen Defizite unbekannt, inwieweit nach oraler Gabe Quercetin im Menschen als Aglykon (frei) oder Phase-II-Konjugat bioverfügbar war, bzw. wie das Metabolitenspektrum ausah. (Graefe, Derendorf *et al.* 1999).

Hier setzte die vorliegende Arbeit an. Im Rahmen der Promotionsarbeit von GRAEFE (Graefe 2000) wurde zur Vorbereitung einer Humanstudie eine Pilotstudie durchgeführt, in deren Rahmen drei Probanden gedünstete Zwiebeln entsprechend 200 mg Spiraeosid (Quercetin-4'-O-glucosid) oral appliziert wurde. Neben den

Plasmakonzentrations-Zeit-Profilen für eventuell zu detektierende Quercetinglykoside, freies Quercetin und dessen Phase-II-Metabolite, sollte auch deren renale Elimination untersucht werden. Die bis dato publizierten und verfügbaren Methoden sollten dafür weiter entwickelt, validiert und auf ihre Eignung untersucht werden. Die so entwickelte und validierte Methode sollte dann zur Bestimmung der vorstehenden Targetanalyten im Rahmen einer Hauptstudie verwendet werden. Dabei war es von zentralem Interesse zu untersuchen, ob freies Quercetin oder Quercetinglykoside im Plasma nachweisbar waren. Des weiteren sollte untersucht werden, welche Unterschiede die voraussichtlich zu detektierenden Phase-II-Konjugate des Quercetins bezüglich ihrer Kinetik zeigten, und welche Substitutionsmuster sie aufweisen würden. So wäre neben den an den fünf Hydroxylgruppen des Quercetins zu erwartenden Glucuronidierungen oder Sulfatierungen – zumindest theoretisch – auch die Bildung von Diglucuroniden möglich. Um diesen Fragenkomplex zu bearbeiten wurden die Plasmaproben der Pilotstudie nach 2 Stunden, nahe des aus anderen Studien (Hollman, v.d. Gaag *et al.* 1996; Hollman, van Trijp *et al.* 1997a) zu erwartenden  $t_{max}$ , verwendet.

Unter Anwendung der in Kapitel 6 beschriebenen HPLC-MS/MS-Methode wurde die nicht hydrolysierte Plasmaprobe analysiert. So konnten nach oraler Applikation von gebratenen Zwiebeln fünf Quercetinmonoglucuronide und Isorhamnetin im Plasma detektiert werden (Wittig *et al.* 2001a). In den Proben konnte weder freies Quercetin noch Quercetinsulfat oder die in den Zwiebeln enthaltenen Quercetinglykoside nachgewiesen werden. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die elektrochemische Detektion von fünf Quercetinglucuroniden in Plasmaproben nach oraler Gabe eines Trockenextraktgemisches von Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern (Kapitel 3.2.1). Auch in diesen Proben konnte weder freies Quercetin noch Quercetinglykoside nachgewiesen werden.

Die angewendete HPLC-MS/MS-Methode war dabei außerordentlich selektiv. Bislang wurden Glucuronsäure-Konjugate des Quercetins im wesentlichen über deren Spaltbarkeit durch  $\beta$ -Glucuronidasen nachgewiesen (Manach, Morand *et al.* 1998; Morand, Crespy *et al.* 1998; Watson and Pitt 1998; Watson and Oliveira 1999). Beachtet man allerdings, dass Glucuronidasen auch Sulfatase- und Glucosidase-Aktivität besitzen, scheint diese Methode wenig selektiv. Alle bis dato publizierten Arbeiten, die Quercetinderivate als Glucuronide identifizierten, sind unter diesem

Vorbehalt zu betrachten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen die Bildung von Glucuroniden als Phase-II-Konjugate des Quercetins nach der Gabe von Quercetinglykosiden nachzuweisen. Mit diesen Ergebnissen verdichtet sich auch das Erkenntnismaterial, dass darauf hindeutet, dass in einigen Arbeiten fälschlicherweise Quercetinglucuronide im Plasma von Menschen als Glykoside beschrieben wurden (Paganga and Rice-Evans 1997; Aziz, Edwards *et al.* 1998). Diese sind den entsprechenden Glucuroniden in ihrem analytischen Verhalten sehr ähnlich.

Die von den Autoren zur Analyse verwendeten Detektionsverfahren, die UV/VIS-Spektrometrie bzw. die Fluoreszenz-Detektion, waren nicht geeignet, Glucoside von Glucuroniden zu unterscheiden. Beide Quercetinderivate haben, vorrausgesetzt sie sind an der gleichen Bindungsstelle substituiert, nahezu identische Retentionszeiten und UV/VIS-Spektren.

Nicht zuletzt durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist heute davon auszugehen, dass nach Verabreichung von Quercetinglykosiden – in verschiedenen Matrices – unter Erhalt der intakten Strukturen im Menschen keine genuinen, unveränderten Substanzen systemisch verfügbar sind. Auch die Bildung von Sulfaten ist unter den gewählten Studienbedingungen nicht zu erwarten. Zwar wurde das Schwefelsäure-Konjugat des Quercetin sowohl in Ratten (Yamamoto, Moon *et al.* 1999) als auch im Menschen (Manach, Morand *et al.* 1998) beschrieben. Da sich die Autoren bei der Identifikation der Metabolite aber nur auf die Glucuronidase-/Sulfatase- Hydrolyse stützten und ihre Targetanalyten nicht selektiv nachwiesen, sind diese Daten sehr kritisch zu bewerten.

Inzwischen wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse von anderen Autoren bestätigt und es wird heute davon ausgegangen, dass Quercetin nach oraler Gabe von natürlich vorkommenden Quercetinglykosiden im Menschen ausschließlich in Form seiner Glucuronide als Phase-II-Konjugate bioverfügbar ist.

Die genaue Bestimmung des individuellen Substitutionsmusters der fünf *In-vivo* detektierten Glucuronide war allerdings mit keiner der hier verwendeten Methoden

möglich. Zwar können die CID-Spektren der Quercetinglucuronide einige Anhaltspunkte geben, die genaue Strukturaufklärung kann aber nur über Kernresonanzspektroskopie isolierter bzw. biochemisch synthetisierter Referenzsubstanzen erfolgen. In der Zukunft wäre alternativ auch die Analyse von *ex-vivo* Plasmaproben mittels Stop-flow-NMR möglich. Dieses Verfahren ist derzeit allerdings noch nicht sensitiv genug.

Betrachtet man, das im Rahmen dieser Arbeit im Plasma gefundene Muster an Glucuroniden – wenngleich ohne Kenntnis der genauen Substitutionsstelle der Glucuronsäurereste - so ist bemerkenswert, dass alle fünf möglichen Monoglucuronide detektiert werden konnten. Im Unterschied dazu wurden bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels UTP-Glucuronyltransferase aus Hasenleber *in-vitro* synthetisierter Referenzsubstanzen nur vier unterschiedliche Quercetinmonoglucuronide mittels HPLC-MS/MS detektiert. Dabei waren die Retentionszeiten und Massenspektren der vier *in-vitro* generierten Konjugate mit vier der *In-vivo*-Glucuronide identisch. Die Identifikation von vier Glucuronsäure-Derivaten des Quercetins *in-vitro* gelang zeitgleich mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse auch Manach *et al.* (Manach, Morand *et al.* 1998) unter Verwendung desselben Enzyms sowie Oliveira *et al.* (De-Oliveira, Ribeiro-Pinto *et al.* 1997) nach Inkubation mit UGT-1A9 (isolierte Humanmikrosomen). Unter *In-vivo*-Bedingungen wurde also ein zusätzliches Glucuronid detektiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in *In-vitro*-Experimenten nur bedingt Vorhersagen zur *In-vivo*-Situation gemacht werden können. Morand *et al.* (Morand, Crespy *et al.* 1998) z.B. detektierten in Rattenplasma (*in-vivo*) nur drei Quercetinglucuronide, was belegt, dass es offenbar auch speziesspezifische Unterschiede der Substratspezifität der UTP-Glucuronyltransferasen gibt. Dabei ist sicher auch noch eine Organ- und/oder Gewebespezifität zu beobachten (Cheng, Radominska-Pandya *et al.* 1999). UDP-Glucuronyltransferasen wurden in verschiedenen Isoformen beschrieben, die unterschiedliche Substratspezifität haben können (Ullrich and Bock 1984; van't Klooster, van Woutersen *et al.* 1994; Higashi, Horike *et al.* 1999).

Betrachtet man die Bildung von Glucuroniden im Menschen im Zuge der Resorption und Verteilung von Quercetin(glykosiden) so sind die dabei beteiligten Enzyme noch nicht ausreichend beschrieben worden. Eine genaue Substrat- und Produktabfolge

bei der Bildung von Glucuroniden aus Glykosiden ist unbekannt, und über die Gewebe und Organlokalisierung wurde bisher nur spekuliert (Crespy, Morand *et al.* 1999; Graefe, Derendorf *et al.* 1999; Ader, Blöck *et al.* 2000). Ein Modell, dass zur Zeit am besten mit den verfügbaren Daten in Einklang zu bringen ist, geht von einer luminalen Spaltung der Quercetinglykoside aus. Day *et al.* (Day, Canada *et al.* 2000) konnten zeigen, dass die im Dünndarm membranständige Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) Quercetinglucoside effektiv zum Aglykon hydrolysierte. Das so freigesetzte Quercetin gelangt nach dem Modell passiv in den Enterozyten, wo es glucuronidiert wird und nach Übergang in den systemischen Kreislauf zu geringem Anteil zu Isorhamnetin methyliert wird (Manach, Morand *et al.* 1997; Manach, Morand *et al.* 1998; Morand, Crespy *et al.* 1998; Graefe, Wittig *et al.* 2001). Die letzten Schritte des Modells sind noch sehr hypothetisch und unzureichend durch Daten belegt. Es wurden auch andere Modelle vorgestellt, die von einer Resorption intakter Glykoside und deren Spaltung erst im Enterozyten ausgehen (Graefe 2000). Als Glucuronidierungsorgan kommt prinzipiell auch die Leber in Frage (Herber, Hercelin *et al.* 1995; Graefe 2000).

Wie weiter oben bereits ausgeführt, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein freies Quercetin in Plasma nach oraler Gabe von Zwiebeln bzw. der Trockenextraktmischung (Birkenblättern, Goldrutenkraut, Orthosiphonblätter) nachgewiesen werden; es wurde weder mit der HPLC-MS/MS- (LOD ~ 1 ng on column) noch mit der HPLC-CoulArray- (LOD ~ 25 pg on column) Methode detektiert.

Die systemische Verfügbarkeit von Quercetin wird seit langem kontrovers diskutiert, und beruht, wie die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, sehr wahrscheinlich teilweise auf einer Fehlinterpretation von analytischen Ergebnissen. So wurde freies Quercetin in den entscheidenden Arbeiten, auf die immer wieder Bezug genommen wird (Hollman, v.d. Gaag *et al.* 1996; Hollman, van Trijp *et al.* 1997a; Hollman, van Trijp *et al.* 1997b), ausschließlich nach Hydrolyse der Konjugate bestimmt. Eine Bestimmung des freien Anteils vor Hydrolyse ist in keiner der Arbeiten beschrieben, dennoch konstatieren die Autoren die Bioverfügbarkeit von Quercetin, ohne zwischen Aglykon und Konjugaten zu diskriminieren. Daraus resultierend wurden die vermeintlich bioverfügbaren Mengen an freiem Quercetin unzulässig mit Ergebnissen aus *In-vitro*-Tests korreliert, in denen in der Regel immer nur das freie Quercetin und

nur sehr selten auch Glykoside und Glucuronide getestet wurden (Janssen, Mensink *et al.* 1998).

Erst kürzlich konnten Erlund *et al.* (Erlund, Kosonen *et al.* 2000) nach oraler Gabe von 100 mg Rutin freies Quercetin in nicht hydrolysiertem Plasma detektieren. Die sehr sensitive Methode (LOD = 150 pg on column) konnte Konzentrationen freien Quercetins um  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  detektieren. Die Autoren nutzten zur Freisetzung eventuell vorhandenen Quercetins aus der Plasmaeiweißbindung eine Festphasen-Extraktion. Die in der vorliegenden und anderen Arbeiten verwendete Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln könnte nicht effektiv genug sein, um kleinste Quercetinmengen zu extrahieren. Da aber die Extraktionsmethode von Erlund *et al.* nicht mit Quercetinkonjugaten validiert wurde, könnte Quercetin ebenso durch Wechselwirkungen an der Festphase freigesetzt werden. Es ist also möglich, dass es sich bei dem detektierten freien Quercetin um ein Artefakt der Probenaufarbeitung handelt.

Denkbar wäre auch, dass die verschiedenen Autoren aufgrund differierender Studien-Designs (Studienmedikation, flavonoidfreie run-in-Phase, Einmaldosierung oder steady-state) zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen.

Dass in den meisten Publikation zur Berechnung pharmakokinetischer Kenndaten der Gesamtquercetiningehalt nach Hydrolyse der Konjugate verwendet wurde, spiegelt nicht die physiologischen Realitäten *in-vivo* wider. Wichtige Informationen zu Resorptionsgeschwindigkeit, Verteilung und Eliminationsgeschwindigkeit gehen durch die Hydrolyse der Phase-II-Konjugate verloren.

Ein zentrales Anliegen der hier vorgestellten Untersuchungen war daher, ausreichend selektive und sensitive Methoden zu entwickeln und zu validieren. Mit den erarbeiteten HPLC-MS/MS- und HPLC-CoulArray-Methoden können in zukünftigen Studien erstmals pharmakokinetische Daten zu den systemisch verfügbaren Metaboliten (Phase-II-Konjugaten) des Quercetins erhoben werden. Daneben machen es die entwickelten Methoden auch möglich, die mechanistischen Fragen zur Bildung der Metabolite (Phase-II-Konjugaten) im Detail durch geeignete *Ex-vivo*-Modelle zu untersuchen. Damit ist ein wichtiger Grundstein für ein besseres Verständnis der hier betrachteten Fragestellungen gelegt. Dabei soll die Bedeutung

der Untersuchungen als exemplarische Fragestellung unterstrichen werden. Viele als Wirkstoffe angesehene oder bekannte Naturstoffe liegen als phenolische Glykoside vor. Die erarbeiteten Daten sollten es ganz wesentlich erleichtern, die Vorgänge zur Resorption, Metabolisierung, Verteilung und Elimination auch für andere Vertreter der Substanzgruppe zu untersuchen.

Wichtig in diesem Zusammenhang war auch die Frage zum turn-over der Phase-II-Metaboliten des Quercetins bzw. deren Spaltung im oder am Zielgewebe. Damit eng verknüpft ist die Pharmakodynamik des Quercetins. Die vorhandenen Daten zu Wirkungen dieser Substanz wurden im wesentlichen mit der freien Substanz erhalten; seine Konjugate und andere Metabolite waren immer weniger stark wirksam (Middleton and Kandaswami 1994). Beispielweise verglichen Williamson *et al.* (Williamson, Plumb *et al.* 1996) die antioxidativen Eigenschaften von konjugiertem und nicht konjugiertem Quercetin an Hepa-LCLC 7-Zellen (Maus). Dabei erwies sich das freie Aglykon als das wesentlich stärkere Antioxidans.

Mit solchen Ergebnissen ist eine Spaltung der systemisch verfügbaren Konjugate zum freien Quercetin *in-situ* am Zielgewebe / Wirkort zu postulieren. Zu Beginn dieser Arbeit war es noch völlig unklar, ob eine solche Spaltung stattfinden könnte.

#### *Glucuronidaseaktivität humaner Endothelzellen*

Die systemisch vorliegenden Quercetinglucuronide zeigten *in-vitro* antioxidative Effekte auf die Kupferionen-induzierte LDL-Oxidation (Manach, Morand *et al.* 1998). Allerdings ist der von den Glucuronsäurekonjugaten gezeigte Effekt nur etwa halb so groß wie der des im selben Modell getesteten freien Quercetins (Day, Canada *et al.* 2000).

Eine weitgehend gesicherte Datenlage zur antioxidativen Aktivität *in-vitro* bestand nur für freie Aglyka. Diese erwiesen sich in verschiedenen *In-vitro*-Modellen gegenüber ihren Konjugaten als die potenteren Antioxidantien (Williamson, Plumb *et al.* 1996; da Silva, Piskula *et al.* 1998; Manach, Morand *et al.* 1998; Morand, Crespy *et al.* 1998). Daraus konnte man schließen, dass freies Quercetin auch *in-vivo* das stärkere Antioxidans sein und in den Zellen der Zielgewebe die postulierten pharmakologischen Wirkungen auslösen würde. Solche intrazelluläre Quercetinspiegel konnten dann auch nach *in-vitro* Inkubation mit dem freien Aglykon

in Hep-G2-Zellen (Boulton, Walle *et al.* 1999) bzw. in Maus-Splenocyten (Bugianesi, Serafini *et al.* 2000) gefunden werden. Somit fehlte die physiologische Verbindung zwischen systemisch vorliegenden konjugierten Metaboliten und eventuell auch *in-vivo* in der Zelle vorliegenden freien Aglykonen.

Der „missing link“ zwischen den Quercetinkonjugaten und dem wesentlich stärker antioxidativ wirkenden, aber nicht systemisch verfügbaren freiem Quercetin, könnten Enzyme wie z.B. Sulfatasen oder Glucuronidasen sein, die Quercetin *in-situ* am oder im Zielgewebe freisetzen. Diesen Ansatz verfolgten auch Shimoi *et al.*, die die Freisetzung von Luteolin aus seinen Glucuroniden durch neutrophile Granulozyten an Entzündungsherden untersucht hatten und belegen konnten.

Die dafür notwendige Glucuronidase-Aktivität konnte in verschiedenen Geweben des Hasen (Bogan, Duffy *et al.* 1997) und der Ratte (Ratna, Chiba *et al.* 1993) nachgewiesen werden. Im Menschen wurde glucuronidspaltende Aktivität u.a. an neutrophilen Granulozyten (Shimoi, Saka *et al.* 2000) und im Venengewebe (Haardt 1986) gefunden.

Bei der Suche nach einem geeigneten *In-vitro*-Modell für die hier untersuchte Fragestellung erwies sich Venenendothelgewebe als geeignet, für das bereits Glucuronidase-Aktivität beschrieben worden war (Haardt 1986).

Als *In-vitro*-Modell wurden schließlich HUVEC-Zellkulturen (human umbellical vein cells) gewählt. Dieses Modell war u.a. zur Erforschung der Apoptose in oder der biochemischen Signaltransduktion zwischen Zellverbänden etabliert. Es eignete sich aber auch hervorragend zur *In-vitro*-Simulation des physiologischen Venenendothels (Morgan, Pearson *et al.* 1989). Vorteil dieses Modells gegenüber anderen Endothelgeweben war der weitgehend physiologisch intakte Zustand der Zellen. Im Gegensatz z.B. zu CACO-2-Zellkulturen besitzen HUVEC eine weitgehend intakte Enzym-Ausstattung. So konnten Morgan *et al.* die Anwesenheit von Glucuronidasen in HUVEC-Kulturen feststellen (Morgan, Pearson *et al.* 1989).

Die Glucuronidase-Aktivität in der HUVEC-Kultur wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch die *In-vitro*-Spaltung von Glucuronsäure-Konjugaten zu den korrespondierenden Aglyka gezeigt. Etablierte Testsubstanzen für diese Zwecke waren das 4-Methylumbelliferon (MUB) und sein Glucuronid (MUG) (Jarosch, Madreiter *et al.* 1977; Ratna, Chiba *et al.* 1993). Nach Inkubation von MUG mit

HUVEC-Kulturen wurde MUB in erheblichen Mengen freigesetzt (siehe Kapitel 7.3). Die Menge des dekonjugierten Aglykons stieg mit der Dauer der Inkubationszeit.

Um den Bezug zu den *in-vivo* verfügbaren Quercetingucuroniden herzustellen, wurde auch Quercetin-3-O-glucuronid im HUVEC-Modell inkubiert. Auch das Glucuronsäurekonjugat des Quercetin wurde im HUVEC-Modell dekonjugiert und das freie Aglykon detektiert, dessen Stabilität im überstehenden Inkubationspuffer sich aber als sehr problematisch erwies. Unter Inkubationsbedingungen (37°C) war es weitgehend instabil. Dies bestätigt Untersuchungen von Boulton *et al.* (Boulton, Walle *et al.* 1999). Durch Zusatz von 0,5 % Ascorbinsäure als Antioxidans und 0,5 % bovinen Albumins konnte eine weitgehende Stabilisierung erreicht werden. Der stabilisierende Effekt des Albumins resultiert höchstwahrscheinlich aus der hohen Proteinbindung des Quercetins (Boulton, Walle *et al.* 1998).

Daraus ergibt sich eine andere Fragestellung, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit am HUVEC-Modell untersucht wurde: können freie Aglykone in die Endothelzellen aufgenommen werden und damit für intrazelluläre pharmakodynamische Wechselwirkungen verantwortlich sein. Die Analyse der gewaschenen und lysierten HUVEC-Monlayer zeigten, daß sowohl Methylumbelliferon (MUB) als auch Quercetin intrazellulär vorliegen. Andere Arbeitsgruppen berichten über vergleichbare Beobachtungen, beispielsweise die Aufnahme von freiem Quercetin in HepG2-Kulturen (Boulton, Walle *et al.* 1999).

Nach Inkubation mit freiem Quercetin zeigten die HUVEC-Kulturen schon nach einer Stunde starke Schäden. Sowohl eine zunehmende Desintegrität des Monolayers, als auch die Lyse herausgelöster Zellen wurden als klassische Anzeichen der Apoptose beobachtet (Zoellner, Hofler *et al.* 1996). Die Ursachen für die Wachstumsstörungen bzw. den Tod der Zellen könnte die starke antioxidative Wirkung des Quercetins auf redoxsensitive intrazelluläre Prozesse wie Atmungskette und Proteinsynthese sein (Duthie, Johnson *et al.* 1997). Diese apoptotischen Effekte können durch Zugabe von Albuminen zu den Inkubationslösungen zurückgedrängt werden, wobei sich bovines Albumin als am wirksamsten erwies (Zoellner, Hofler *et al.* 1996). Des Weiteren wurde für Quercetin (Shimoi, Saka *et al.* 2000) und andere Flavonoide (Kimura, Matsushita *et al.* 1997; Shimoi, Saka *et al.* 2000) eine signifikante Hemmung der

Expression des ICAM-1-Proteins (ICAM = intercellular adhesion molecule-1) beschrieben. Dieses Enzym ist im wesentlichen für die Aggregation von Leukocyten an Endothelzellen verantwortlich, hat aber auch Einfluss auf die Integrität des HUVEC-Monolayers.

Der Nachweis der Glucuronidaseaktivität im HUVEC-Modell warf die Frage nach der Lokalisierung des Enzyms auf. Prinzipiell ergaben sich zwei Möglichkeiten. Eine der Arbeitshypothesen bestand in der Annahme, dass die Konjugate intakt in die Zelle eingeschleust, und dort von intrazellulären Glucuronidasen gespalten werden könnten. Alternativ wurde die extrazelluläre Spaltung der konjugierten Metabolite durch extrazelluläre (membranständig oder sezerniert) Glucuronidasen und die anschließende Resorption des freien Aglykons untersucht.

Die hier vorliegenden Ergebnisse am HUVEC-Modell machen eine extrazelluläre Spaltung der Quercetinkonjugate wahrscheinlich. Dies kann vor allem daraus geschlossen werden, dass bei Inkubation von HUVEC-Kulturen mit Glucuroniden keine Resorption der Konjugate beobachtet werden konnte. Bei Inkubation mit Aglyka wurden allerdings erhebliche intrazelluläre Gehalte gemessen. Auch Boulton *et al.* konnten nach Inkubation mit Quercetin intrazelluläre Konzentrationen des Aglykons detektieren (Boulton, Walle *et al.* 1999). Das macht einen Transport des Aglykons durch die Zellmembran wahrscheinlich.

Interessante Parallelen existieren zu Arbeiten von Day *et al.*, die die Resorption von verschiedenen substituierten Quercetinglykosiden aus dem Darm untersuchten (Day, Canada *et al.* 2000). Hier wurde ein membranständiges Enzym (eine Lactase-Phlorizin-Hydrolyse, LPH) gefunden, das zu einer extrazellulären Spaltung der Glucosekonjugate des Quercetins fähig ist. Die Lokalisierung des Enzymproteins an der extrazellulären Seite der Zellmembran wird dadurch unterstützt, dass im LPH-Modell z.B. Quercetin-3-O-glucosid (Day, Canada *et al.* 2000) hydrolysiert wurde, während zellfreie Extrakte von Leber- oder Dünndarm- Gewebe nicht dazu in der Lage waren (Day, DuPont *et al.* 1998).

Eine solche Membranständigkeit des Glucuronidaseproteins wäre auch am Gefäßendothel denkbar. Vergleichende Deglucuronidierungsversuche mit zellmaterialfreien Endothelzelllysaten könnten zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

Insgesamt untermauern die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse die Möglichkeit, dass freies Quercetin das eigentlich wirksame Prinzip am jeweiligen Target sein könnte und nicht seine systemisch verfügbaren Konjugate. Dabei stellt sich die Frage, ob in oder an Geweben nicht nur eine Spaltung, sondern mit erneuter Glucuronidierung sogar ein Kreislauf nachzuweisen ist. Dies liegt sicher nahe, wenn man die Glucuronyltransferase-Aktivitäten betrachtet, die für unterschiedliche Gewebe beschrieben sind (Herber, Hercelin *et al.* 1995; Green, King *et al.* 1998; Cheng, Radominska-Pandya *et al.* 1999). Damit wäre auch ein Abbau, der in freier Form instabilen, aber in konjugierter Form stabilen Substanz eingeschränkt.

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

Eine Korrelation der im HUVEC-Modell generierten *In-Vitro*-Ergebnisse mit *In-vivo*-Daten ist schwer, da keine der derzeit publizierten Bioverfügbarkeitsstudien die eingehende Analyse der Zielgewebe auf frei vorliegende Aglykone einschloss. Dennoch kann, das HUVEC-Modell erstmals bei der Interpretation von *in-vivo* generierten Daten zu diversen Themengebieten helfen.

Die teilweise schlechte antioxidative Kapazität humanen Plasmas nach Applikation flavonoidreicher Speisen (McAnlis, McEneny *et al.* 1998; van het Hof, Kivits *et al.* 1998; McAnlis, McEneny *et al.* 1999; Moon, Nakata *et al.* 2000) kann darauf zurückgeführt werden, dass der Großteil des Quercetins als antioxidativ wenig potente Konjugate vorliegt. Chemisch oder enzymatisch freigesetztes Quercetin könnte sofort vom Gefäßendothel resorbiert bzw. eine starke Plasmaeiweißbindung eingehen (Boulton, Walle *et al.* 1998), und somit dem antioxidativen Potential des Plasma verloren gehen.

Tatsächlich existieren widersprüchliche Daten zur oxidativen Kapazität humanen Plasmas nach Aufnahme flavonoidhaltiger Speisen. In einigen Studien wurde ein Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas (Serafini, Ghiselli *et al.* 1996; McAnlis, McEneny *et al.* 1997; Serafini, Maiani *et al.* 1998; McAnlis, McEneny *et al.* 1999) registriert, in anderen zeigte Plasma (McAnlis, McEneny *et al.* 1998; McAnlis, McEneny *et al.* 1999; van het Hof, Wiseman *et al.* 1999; Moon, Nakata *et al.* 2000) das reich an Quercetinglucuroniden war, entgegen den Erwartungen, keine oder sehr

geringe antioxidative Aktivität. Eine Ursache dafür könnte neben der oben diskutierten Resorption die hohe Plasmaeiweißbindung der Quercetinkonjugate sein, wie sie auch für das freie Quercetin gefunden wurde (Boulton, Walle *et al.* 1998).

Da die systemisch verfügbaren Quercetinglucuronide am Gefäßendothel gespalten werden, könnten trotz schneller Resorption durch die Endothelzellen geringe Mengen an analytisch zugänglichem Aglykon im Plasma vorliegen. Obwohl die Resorptionsmechanismen am Gefäßendothel noch völlig unklar sind, wäre eine Beeinflussung auf Ausmaß und Geschwindigkeit der Aglykonaufnahme *in-vivo* durch verschiedenste physiologische Faktoren (z.B. Blutlipide, Veränderungen der Gefäßintima, Schädigungen des Endothelgewebes) denkbar. Je nach physiologischem Zustand der Gefäße von Probanden, könnten große interindividuelle Unterschiede des Plasmaspiegels an freiem Quercetin vorliegen und für die weiter oben diskutierten widersprüchlichen Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit von freiem Quercetin mit verantwortlich sein.

Aufgrund der unterschiedlichen Glucuronidase-Aktivität am Endothel gesunder oder erkrankter Personen (Haardt 1986), könnten Konjugations- und Dekonjugationsprozesse der an den Studien teilnehmenden Probanden beeinflusst werden. Bei folgenden Bioverfügbarkeitsstudien sollten Erkrankungen des Gefäßendothels, wie beispielsweise der variköse Symptomenkomplexes, in die Ausschlusskriterien aufgenommen werden.

Der variköse Symptomenkomplex der Grade I und II geht mit entzündlichen Prozessen des Venengewebes einher. Zur Behandlung der resultierenden Ödeme werden neben der Kompressions- und Bewegungstherapie oft begleitend Zubereitungen aus Buchweizenkraut, Rutin (Quercetin-3-O-rutosid) oder synthetischen Rutinderivaten appliziert. Ohne die genauen Wirkmechanismen zu kennen, konnte die antiphlogistische und ödemprotektive Wirksamkeit einer oralen Therapie mit Buchweizenkraut / Rutin bereits in klinischen Studien gezeigt werden (Ihme, Kiese Wetter *et al.* 1996; Koscielny, Radtke *et al.* 1996).

Da nach oraler Gabe von rutinhaltigen Zubereitungen Quercetinglucuronide systemischen verfügbar sind, ist auch hier eine *In-situ*-Freisetzung des

antiphlogistisch wirksamen Quercetins am Venengewebe denkbar. Damit könnte durch das hier vorgestellte *In-vitro*-Modell erstmals eine Korrelation zwischen *In-vitro*-Wirkungen (antiphlogistisch, antioxidativ) des freien Quercetins und der gezeigten ödemprotektiven Wirksamkeit von rutinenthaltenden Zubereitungen gezeigt werden.

Auch im Zentrum des pathogenetischen Geschehens der Arteriosklerose steht die Funktion des Gefäßendothels, da es durch Bildung von Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen wesentlich am oxidativen Stress der Gefäße beteiligt ist. Bekannt ist, dass oxidiertes LDL-Cholesterol einer der Hauptursachen für sklerotische Prozesse ist, indem es die Gefäßprotektion schwächt und gleichzeitig an der Entstehung der Schaumzellen maßgeblich beteiligt ist.

Aufgrund der vergleichbaren Enzymausstattung von Venen- und Arterienendothel, ist auch an den Arterien die in dieser Arbeit *in-vitro* gezeigte *In-situ*-Freisetzung von Quercetin aus seinen systemisch verfügbaren Konjugaten denkbar. Das damit frei verfügbare Akykon könnte auf zweierlei Art antiarteriosklerotisch wirksam sein. Zum einen könnte, wie schon *in-vitro* gezeigt (Morand, Crespy *et al.* 1998; McAnlis, McEneny *et al.* 1999), freies Quercetin oxidiertes LDL reduzieren bzw. durch seine radikalfangenden Wirkungen die Bildung oxidierten LDLs einschränken. Zum anderen kann Quercetin nach Resorption in das evtl. schon geschädigte Arterienendothel dortige entzündliche Prozesse, wie *in-vitro* gezeigt, hemmen.

Aufbauend auf diese Überlegungen konnte damit erstmals eine Korrelation der *In-vitro*-Wirkungen des Quercetins mit epidemiologischen Beobachtungen zu arterio- und kardioprotektiven Effekten flavonoidreicher Diäten hergestellt werden (Hertog, Feskens *et al.* 1993; Hertog, Kromhout *et al.* 1995; Knekt, Jarvinen *et al.* 1996; Muldoon and Kritchevsky 1996; Haenen, Paquay *et al.* 1997; Katan 1997; Böhm, Boeing *et al.* 1998).

## 9 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, Optimierung und Validierung von phyto- und bioanalytischen Analysemethoden. Dabei wurden exemplarische Fragestellungen aus dem Themenkreis Phytotherapie bzw. Bioverfügbarkeit und Metabolismus von einfachen und Polyphenolen bearbeitet.

### *Quercetin und seine Derivate*

Zur **qualitativen Analyse der Flavonoide und Flavonoidderivate** in einem Trockenextraktgemisch aus Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern wurde eine HPLC-Methode mit UV/VIS-Detektion entwickelt, die eine nahezu vollständige Auftrennung und Identifizierung der im Extraktgemisch enthaltenen Polyphenole möglich machte.

Nach oraler Applikation dieses Trockenextraktgemisches von Birkenblättern (1,31 g), Goldrutenkraut (1,63 g) und Orthosiphonblättern (1,16 g) als orale Arzneiform wurde die **systemische Verfügbarkeit von Quercetin bzw. Quercetinglykosiden** untersucht. Dazu wurden Plasma- und Urin- Proben eines Teilkollektives (n = 3) aus einer Probandenstudie auf Quercetin-Plasmaspiegel hin analysiert. Die **systemische Verfügbarkeit von Quercetin bzw. Quercetinglykosiden betrug 0 %** (LOD ~ 25 pg Quercetin on column), da Quercetin als Phase-I- bzw. -II- Metabolite vorlag.

Nach Hydrolyse der Phase-II-Konjugate wurden die höchsten Quercetinspiegel nach ca. 4 Stunden ( $t_{\max}$ ) gemessen. Die zu  $t_{\max}$  im Plasma gemessenen Quercetin-Konzentrationen ( $c_{\max}$ ) lagen bei  $101 \pm 107 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Der Zeitpunkt der höchsten renalen Quercetinausscheidung lag im Intervall von 4-8 Stunden nach Verum-Gabe, wobei die über 24 Stunden ausgeschiedene Quercetinmenge  $604 \pm 1037 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  betrug.

Im Rahmen der studienbegleitenden bioanalytischen Methodenentwicklung wurde eine **Extraktionsmethode für Plasma und Urin** entwickelt und validiert. Die einfache Methode ermöglichte die gleichzeitige Extraktion von Phase-I- und Phase-II-Metaboliten des Quercetins.

Durch **Anwendung eines neuartigen Analyseverfahrens, der coulometrischen Array-Detektion**, konnte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die erstmals Quercetin und seine Metabolite selektiv und ausreichend sensitiv in biologischen Matrices detektieren konnte.

Unter Verwendung des analytischen Verfahrens der HPLC-Tandemmassenspektrometrie konnten **fünf Quercetinglucuronide als die Hauptmetabolite des Quercetins** identifiziert werden. Damit konnte die bis dahin sehr kontrovers diskutierte Frage nach der systemischen Verfügbarkeit von Quercetinglucosiden verneint werden.

Zur Gewinnung der Quercetinglucuronid-Referenzsubstanzen wurde ein geeignetes Glucuronyltransferase-Protokoll entwickelt, welches die biochemische Synthese von vier der fünf *in-vivo* gefundenen Quercetinglucuronide ermöglichte.

Um weitere Erkenntnisse über den Metabolismus der systemisch verfügbaren Quercetinglucuronide am Venenendothelgewebe zu gewinnen, wurde ein *In-vitro*-Modell unter Verwendung von HUVEC (human umbilical endothelial cells)-Monolayerkulturen entwickelt und orientierend validiert.

Die Experimente zeigten, dass das Venenendothel Glucuronidaseaktivität aufweist und somit Quercetin *in-situ* am oder im Zielgewebe aus systemisch vorliegenden Glucuroniden freisetzen kann. Die somit frei vorliegenden Aglykone konnten dann in das Venenendothelgewebe aufgenommen werden.

Das *In-vitro*-Modell gibt damit erstmals einen **plausiblen Erklärungsansatz für die Wirksamkeit von Quercetinderivat-haltigen Präparaten *in-vivo***, z.B. beim varikösen Symptomen-Komplex. Der „missing link“ im Metabolismus von den systemisch verfügbaren Quercetinkonjugaten zu dem wesentlich stärker antioxidativ und antiphlogistisch wirkenden, aber nicht systemisch verfügbaren freiem Quercetin konnte gezeigt werden.

### *Procyanidine in Weißdorn*

Zur **Gruppenbestimmung der Procyanide** in Weißdornpräparaten wurde ein Analysenprotokoll optimiert und validiert, welches den derzeit üblichen Protokollen bezüglich des Grades an Selektivität überlegen ist. Weiterführend wurde zur selektiven **Analyse der mono- bis trimeren Procyanidine** in Weißdornpräparaten eine HPLC-Methode unter Adaption eines Nachsäulenderivatisierungsverfahrens (NSD) entwickelt und validiert.

Unter Kombination der Gruppenbestimmung und der HPLC-NSD-Methode konnte erstmals das Procyanidinspektrum in handelsüblichen Weißdornpräparaten durch Einbeziehung der mono- bis trimeren Procyanidine, näher beschrieben, und **marktführende Weißdornpräparate vergleichend analysiert** werden. Damit wurde ein entscheidender Fortschritt in der Gewährleistung der pharmazeutischen Qualität Weißdornextrakt-enthaltender Phytopharmaka geleistet.

In Zusammenhang mit publizierten pharmakologischen Arbeiten mit teilweise identischen Extrakten, leisten die in dieser Arbeit erlangten Kenntnisse über Gehalt und Polymerisationsgrad der in den untersuchten Phytopharmaka enthaltenen Procyanidine einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkungen von Weißdorn-Zubereitungen insgesamt.

### *Hydrochinon und seine Derivate*

Die **renale Verfügbarkeit von Hydrochinon** nach oraler Gabe einer flüssigen und einer festen Bärentraubenblätterextrakt-Zubereitung wurde anhand einer Probandenstudie gezeigt. Das mit dem Bärentraubenblätter-Trockenextrakt applizierte Arbutin (210 mg,  $\approx 771,3 \mu\text{mol}$ ) wurde zu ca. 0,18 % als freies Hydrochinon ( $\approx 1,38 \pm 0,79 \mu\text{mol}$ ) ausgeschieden. Der Zeitpunkt der maximalen Hydrochinon-Ausscheidung lag bei beiden Arzneiformen im 4-8 Stunden-Intervall nach Applikation. Die maximale

Ausscheidung von Hydrochinon innerhalb dieses Intervalls lag ebenfalls für beide Applikationsformen bei  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}$ .

Zur Analyse des **Hydrochinons bzw. seiner Konjugate in humanem Urin wurde eine Extraktionsmethode zur simultanen Extraktion entwickelt** und für den Zielanalyten Hydrochinon validiert. Durch Anwendung eines **neuen Detektionsverfahrens, der coulometrischen Array-Detektion**, konnten in Probandenurin erstmals Substanz-Zeit-Kinetiken freien Hydrochinons detektiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen *In-vivo*-Daten erlauben damit eine Korrelation von einerseits *In-vitro*-Daten zur bakteriziden Aktivität von Hydrochinon und andererseits epidemiologischen Daten zur Wirksamkeit von Bärentraubenblätter-Zubereitungen, wie sie bei leichten Infekten der oberen ableitenden Harnwege therapeutisch angewendet werden. Damit konnte erstmals unter therapiekonformen Bedingungen das **für Bärentraubenblätter postulierte Wirkprinzip - das Hydrochinon - *in-vivo* bestätigt** werden.

## 10 Summary

The aim of the investigations presented here was the development, optimisation, and validation of procedures and methods for the analysis of biological and plant samples. It focused on exemplary questions in the main topics “phytotherapy” and “bioavailability and metabolism of phenols and polyphenols”.

### *Quercetin and its derivatives*

In order to analyse the components of a mixture of dry extracts from birch leaves, solidago herb, and orthosiphon leaves qualitatively, a HPLC-method with UV/VIS-detection was developed. A separation profile was created resulting in an almost complete separation of the polyphenolic compounds in the crude extract mixture as well as in a solid drug preparation.

After oral administration of a solid drug preparation containing dry extracts of birch leaves (1.31 g), solidago herb (1.63 g), and orthosiphon leaves (1.61 g) the systemic availability was investigated. Therefore plasma and urine samples were taken from healthy volunteers and analysed for quercetin levels.

The outcome of the study showed a systemic availability of quercetin and quercetin glucoside of zero % (LOD ~ 25 pg quercetin on column) and revealed phase-II-conjugates of quercetin as the main systemic metabolites.

After the hydrolysis of these quercetin conjugates the highest quercetin levels ( $C_{\max} = 101 \pm 107 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in human plasma were determined four hours after medication intake. Maximum renal elimination of quercetin conjugates was determined within the four to eight hours interval, and after 24 hours about  $604 \pm 1037 \text{ } \mu\text{g}$  quercetin was eliminated.

In order to make both phase-I and phase-II metabolites of quercetin accessible for HPLC analysis, a method for simultaneous extraction from human plasma and urine was developed.

By employing a new coulometric array detection method an HPLC-method could be developed, which achieved the selective and sufficiently sensitive detection of quercetin and its metabolites in human body fluids for the first time.

Furthermore five quercetin glucuronides could be detected in human plasma by the means of tandem mass spectrometry as the main systemic metabolites of quercetin in men. No quercetin glucosides could be detected in human plasma (LOD = 200 pg on column), which finally finished a controversial discussion about the bioavailability of quercetin glucosides.

In order to get accesses to authentic quercetin glucuronide reference compounds a biochemical assay was developed resulting in four out of the five quercetin glucuronides detected *in-vivo* .

To increase the knowledge of the metabolism of the systemically available quercetin glucuronides, an *in-vitro* assay was developed and basically validated by using monolayers from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model tissue. In the experiments the HUVEC tissue showed glucuronidase activity. Quercetin glucuronides were deconjugated *in-situ* resulting in the free aglycone which was taken up by the endothelial cells.

This metabolism step represents the "missing link" between systemic available conjugated quercetin and the more antioxidant active aglycone. This knowledge enables the scientific community to draw a correlation between *in-vitro* data and *in-vivo* observation about the efficacy of the treatment of vascular diseases by flavonoid containing preparations.

### *Procyanidines in Hawthorn*

For analysis of total procyanidines occurring in Hawthorn flowers and leaves a determination procedure was developed and validated which, is superior to other

protocols by its degree of selectivity. Furthermore a HPLC method employing post column derivatisation (PCD) and VIS detection was developed and validated for the selective determination of monomere, dimere, and trimere procyanidines in Hawthorn.

Both methods, the procedure for the determination of total procyanidines and the HPLC-PCD method for determination of mono-, di-, and trimere procyanidines were applied to the analysis of herbal medicinal products (HMP) containing hawthorn extracts. This enables to have a closer look on content and polymerisation degree of the procyanidins occurring in leading Hawthorn HMPs of the German market and is a considerable step forward to guarantee the pharmaceutical quality.

Taken together with the pharmacological data published for HMP the knowledge of content and polymerisation degree of procyanidines contributes to a better understanding of the efficacy of Hawthorn containing preparations.

#### *Hydroquinone and its derivatives*

For the analysis of hydroquinone in human urine a method for simultaneous extraction of hydroquinone and its conjugates was developed and validated.

The renal availability of hydroquinone was established in a clinical study by application of a solid and a liquid HMP containing a dry extract of bearberry leaves to healthy volunteers. By using a new detection method, the coulometric array detection, selective and sufficiently sensitive determination of hydroquinone in human urine by HPLC was achieved and the collection of sufficient pharmacokinetic data was possible for the first time.

About 0.18 % ( $\approx 1,38 \pm 0,79 \mu\text{mol}$ ) of the orally given hydroquinone glucoside (arbutin, 210 mg,  $\approx 771,3 \mu\text{mol}$ ) was excreted as free hydroquinone renally. The maximum renal hydroquinone excretion ( $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}$ ) lied within the 4-8 hours interval after application of both the solid and the liquid HMP.

The *in-vivo* data collected in this study allow the correlation of *in-vitro* data of bactericide activity of hydroquinone and epidemiological data about the efficacy of the treatment of uncomplicated inflammation diseases of the lower urinary tract using

HMPs containing dry extracts of bearberry leaves. These results confirm the active principle hydroquinone postulated for bearberry leaves *in-vivo* under therapeutic conditions for the first time.

## 11 Literatur

- Achilli, G., G. P. Cellerione and P. H. Gamache (1993). "Identification and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system." J Chromatogr **632**: 111-7.
- Acworth, I. N. and M. Bowers (1997). An Introduction to HPLC-Based Electrochemical Detection: From Single Electrode to Multi-Electrode Arrays. In: Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC. I. N. Acworth, M. Naoi, H. Parvez and S. Parvez. Utrecht, VSP. **6**: 51-74.
- Ader, P., M. Blöck, S. Pietsch and S. Wolfram (2000). "Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1)." Cancer Lett **162**(2): 175-80.
- Amborn, J., E. Anhalt, U. Braun-Neubrand, I. Glöckl, G. Goßler, P. Hermening, G. Holzkamp, M. Kaltenbach, M. Klein, U. Lotze, S. Lorenzen, D. Pamperin, U. Schiemann, H. M. Schwarm, M. Veit and J. Wittig (2001). Handbuch Validierung analytischer Verfahren. Bonn, Krahe Druck.
- Aziz, A. A., C. A. Edwards, M. E. Lean and A. Crozier (1998). "Absorbtion and Excretion of conjugated Flavonols, including Quercetin-4'-beta-glucoside and Iso-ramnetin-4'-O-beta-glucoside by Human Voluteers after the Consumption of Onions." Free Radic Res **29**: 257-69.
- Bahorun, T., B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J. C. Cazin and M. Pinkas (1996). "Oxygen Species Scavenging Activity of Phenolic Extracts from Hawthorn Fresh Plant Organs and Pharmaceutical Preparations." Arzneim-Forsch (Drug Res) **46**(11): 1086-89.
- Bate-Smith, E. C. (1975). "Phytochemistry of Proanthocyanidines." Phytochemistry **14**: 1107-13.
- Bell, J. R., J. L. Donovan, R. Wong, A. L. Waterhouse, J. B. German, R. L. Walzem and S. E. Kasim-Karakas (2000). "(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine." Am J Clin Nutr **71**(1): 103-8.
- Bianchini, L., L. A. G and J. Pouyssegur (1997). "The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors." J Biol Chem, **272**(1): 271-9.

- Bogan, D. P., C. F. Duffy and R. O. Kennedy (1997). "In vitro glucuronidation of 7-hydroxycoumarin and determination of 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin glucuronide by capillary electrophoresis." J Chromatogr A **772**: 321-26.
- Böhm, H., H. Boeing, J. Hempel, B. Raab and A. Kroke (1998). "Flavonole Flavonole und Anthocyane als natürliche Antioxidantien und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen." Z Ernährungswiss **37**: 147-63.
- Bongartz, D. and A. Hesse (1995). "Selective extraction of quercetin in vegetable drugs and urine by off- line coupling of boronic acid affinity chromatography and high- performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Appl **673**(2): 223-30.
- Boulton, D. W., U. K. Walle and T. Walle (1998). "Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins." J Pharm Pharmacol **50**(2): 243-9.
- Boulton, D. W., U. K. Walle and T. Walle (1999). "Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism." J Pharm Pharmacol **51**(3): 353-9.
- Boyle, S. P., V. L. Dobson, S. J. Duthie, J. A. M. Kyle and A. R. Collins (2000). "Adsorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal." Eur J Nutr **39**: 213-23.
- Brixius, K., K. Frank, G. Munch, J. Muller-Ehmsen and R. H. Schwinger (1998). "WS 1442 (Crataegus-Spezialextrakt) wirkt am insuffizienten menschlichen Myokard Kontraktionskraft-steigernd." Herz Kreislauf **30**(1): 28-33.
- Bugianesi, R., M. Serafini, F. Simone, D. Wu, S. Meydani, A. Ferro-Luzzi, E. Azzini and G. Maiani (2000). "High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrode Array Detector for the Determination of Quercetin Levels in Cells of the Immune System." Anal Biochem **284**(2): 296-300.
- Butler, L. G., M. L. Price and J. E. Brotherton (1982). "Vanillin Assay for Proanthocyanidins (Condensed Tannins): Modification of the Solvent for Estimation of the Degree of Polymerisation." J. Agric. Food Chem. **30**: 1087-89.
- Canalon, P. F. and C. R. Bryan (1993). "Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition." J Chromatogr A **652**(2): 555-61.

- Chang, H. C., M. I. Churchwell, K. B. Delclos, R. R. Newbold and D. R. Doerge (2000). "Mass Spectrometric Determination of Genistein Tissue Distribution in Diet-Exposed Spargue-Dawley Rats." J Nutr **130**(8): 1963-70.
- Cheng, Z., A. Radomska-Pandya and T. R. Tephly (1999). "Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP- glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10." Drug Metab Dispos **27**(10): 1165-70.
- Choudhury, R., S. K. Srail, E. Debnam and C. A. Rice-Evans (1999). "Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration." Free Radical Biol Med **27**(3-4): 278-86.
- CPMP and CVMP (2000). Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products. London.
- CPMP and ICH (1994). Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. London.
- CPMP and ICH (1996). Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95). London.
- Crespy, V., C. Morand, M. C., C. Besson, C. Demigne and C. Remesy (1999). "Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen." Am J Physiol Gastroint Liver Physiol **227**(1): G120-26.
- Cullison, J. K. and P. H. Gamache (1997). Qualitative utility of coulometric array detection: theoretical and applied aspects. Coulometric electrode array detector for HPLC. I. N. Acworth, M. Naoi, H. Parvez and S. Parvez. Utrecht, VSP. **6**.
- da Silva, E. L., M. K. Piskula, N. Yamamoto, J. H. Moon and J. Terao (1998). "Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma." FEBS Lett **430**(3): 405-8.
- Dallenbach-Toelke, K., S. Nyiredy, B. Meier and O. Sticher (1987). "HPLC analysis of the flavonoid glycosides from *Betulae folium*." Planta Med. **53**(2): 189-92.
- Dalluge, J. J., B. C. Nelson, J. B. Thomas, M. J. Welch and L. C. Sander (1997). "Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry for the Separation and Detection of Catechins in Green Tea and Human Plasma." Rapid Commun Mass Spectrom **11**: 1753-56.
- Day, A. J., F. J. Canada, J. C. Diaz, P. A. Kroon, R. McLauchlan, C. B. Faulds, G. W. Plump, M. R. Morgan and G. Williamson (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone

- glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." FEBS Lett **468**: 166-70.
- Day, A. J., M. S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M. J. Rhodes, M. R. Morgan and G. Williamson (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity." FEBS Lett **436**(1): 71-5.
- De, S., J. Chakraborty, R. N. Chakraborty and S. Das (2000). "Chemoprotective activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice." Phytother Res **14**(5): 347-51.
- de Vries, J. H., P. L. Janssen, P. C. Hollman, W. A. van Staveren and M. B. Katan (1997). "Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets." Cancer Lett **114**(1-2): 141-44.
- Deisinger, P. J., T. S. Hill and C. English (1996). "Human Exposure to Naturally Occurring Hydroquinone." J Toxicol Environ Health **47**: 31-46.
- De-Oliveira, A. C., L. F. Ribeiro-Pinto and J. R. Paumgarten (1997). "In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds." Toxicol Lett **92**(1): 39-46.
- Drieu, K., J.-P. Moreau, C.-R. Eck, J. McCabe and S. Skinner (1985). "Animal distribution and preliminary human kinetic studies of the flavonoid fraction of a standardized *Ginkgo biloba* extract (GBE 761)." Flavonoids and Bioflavonoids. L. Farkas, M. Gabor and F. Kallay: 351-59.
- Duthie, S. J., W. Johnson and V. L. Dobson (1997). "The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells." Mutat Res **390**(1-2): 141-51.
- EMA, CPMP and CVMP, Eds. (2000). Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products. London.
- Erlund, I., G. Alfthan, H. Siren, K. Ariniemi and A. Aro (1999). "Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection." J Chromatogr B Biomed Appl **727**: 179-89.
- Erlund, I., T. Kosonen, G. Alfthan, J. Maenpaa, K. Perttunen, J. Kenraali, J. Parantainen and A. Aro (2000). "Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers." Eur J Clin Pharmacol **56**(8): 545-53.

- FDA and CDER (1994). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. Rockville.
- FDA and CDER (1998). Guidance for Industry (Draft): Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Rockville: 13.
- FDA and CDER, Eds. (2000a). Guidance for Industry (Draft) - Botanical Drug Products. Rockville.
- FDA and CDER (2000b). Guidance for Industry (Draft): Analytical Procedures and Methods Validation.
- Foo, L. Y. (1982). "Polymeric Proanthocyanidines of Photinia glabrescens, modification of molecular weight and nature of products from hydrogenolysis." Phytochemistry **21**: 1741-51.
- Freudenberg, K. and K. Weinges (1960). "Systematik und Nomenklatur der Flavonoide." Tetrahedron **8**: 336-39.
- Frohne, D. (1970). "Untersuchungen zur Frage der harndesinfizierenden Wirkungen von Bärentraubenblatt-Extrakten." Planta Med **18**(1): 1-25.
- Frohne, D. (1997). Uvae ursi folium. In: Teedrogen und Phytopharmaka. M. Wichtl. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. **3**: 599-602.
- Gamache, P., E. Ryan and I. N. Acworth (1993). "Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection." J Chromatogr **635**(1): 143-50.
- Glöckl, I. (2001). Analytik von Arzneipflanzenstoffen und deren Metaboliten mittels Kapillarelektrophorese in pharmazeutischer Qualitätskontrolle und Bioanalytik. Dissertation. Münster, Westfälische Wilhelms Universität.
- Gracza, L. and P. Ruff (1984). "Rosmarinsäure in Arzneibuchdrogen und ihre HPLC-Bestimmung." Arch Pharm **317**: 339-45.
- Graefe, E. U. (2000). Relative systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rhamnoglucosid) im Menschen. Dissertation. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität.
- Graefe, E. U., H. Derendorf and M. Veit (1999). "Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans." Int J Clin Pharmacol Ther **37**(5): 219-33.

- Graefe, E. U., J. Wittig, S. Mueller, A. K. Riethling, B. Uehleke, B. Drewelow, H. Pforte, G. Jacobasch, H. Derendorf and M. Veit (2001). "Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans." J Clin Pharmacol **41**(5): 492-9.
- Green, M. D., C. D. King, B. Mojarrabi, P. I. Mackenzie and T. R. Tephly (1998). "Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3." Drug Metab Dispos **26**(6): 507-12.
- Gross, M., M. Pfeiffer, M. Martini, D. Campbell, J. Slavin and J. Potter (1996). "The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **5**(9): 711-20.
- Gugler, R., M. Leschik and H. J. Dengler (1975). "Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses." Eur J Clin Pharmacol **9**(2-3): 229-34.
- Guyot, S., N. Marnet, D. Laraba, P. Sanoner and J. F. Drilleau (1998). "Reversed-Phase HPLC following Thiolyse for Quantitative estimation and Characterisation of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien)." J Agric Food Chem **46**: 1698-705.
- Haardt, B. (1986). "[Histochemical comparison of the enzyme profiles of healthy veins and varicose veins]." Phlebologie **39**(4): 921-31.
- Haenen, G. R. M. M., J. B. G. Paquay, R. E. M. Korthouwer and A. Bast (1997). "Peroxy-nitrite scavenging by flavonoids." Biochem Biophys Res Commun **236**: 591-93.
- Harborne, J. B. (1988). The Flavonoids. New York, Chapman and Hall.
- Haslam, E., T. H. Lilley, Y. Cai, R. Martin and D. Magnolato (1989). "Traditional herbal medicines - the role of polyphenols." Planta Med **55**: 1.
- Herber, R., B. Hercelin, J. Van Cantfort, J. De Graeve, S. Fournel-Gigleux, T. Taguchi and J. Magdalou (1995). "Reduction and glucuronidation of naftazone by human and rat liver microsomes." Drug Metab Dispos **23**(12): 1305-14.
- Hertog, G. L. M., P. C. Hollman and D. P. Venema (1992). "Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits." J Agric Food Chem **40**: 1591-98.
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." Lancet **342**(8878): 1007-11.

- Hertog, M. G., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti and S. Nedeljkovic (1995). "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study [published erratum appears in Arch Intern Med 1995 Jun 12;155(11):1184]." Arch Intern Med **155**(4): 381-6.
- Hertog, M. G., P. M. Sweetnam, A. M. Fehily, P. C. Elwood and D. Kromhout (1997). "Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study." Am J Clin Nutr **65**(5): 1489-94.
- Hiermann, A., T. Kartnig and S. Azzam (1986). "Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Procyanidine in Crataegus." Sci Pharm **54**: 331-37.
- Higashi, T., M. Horike, R. Kikuchi and K. Shimada (1999). "In vitro and in vivo glucuronidation of 24,25-dihydroxyvitamin D3." Steroids **64**: 715-25.
- Hollman, P. C., J. H. de Vries, S. D. van Leeuwen, M. J. Mengelers and M. B. Katan (1995). "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers." Am J Clin Nutr **62**(6): 1276-82.
- Hollman, P. C., M. v.d. Gaag, M. J. Mengelers, J. M. van Trijp, J. H. de Vries and M. B. Katan (1996). "Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man." Free Radic Biol Med **21**(5): 703-7.
- Hollman, P. C., J. M. van Trijp, M. N. Buysman, M. S. van der Gaag, M. J. Mengelers, J. H. de Vries and M. B. Katan (1997a). "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in men." FEBS Lett **418**(1-2): 152-6.
- Hollman, P. C., J. M. van Trijp, M. J. Mengelers, J. H. de Vries and M. B. Katan (1997b). "Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in men." Cancer Lett **114**(1-2): 139-40.
- Holubarsch, C. J., W. S. Colucci, T. Meinertz, W. Gaus and M. Tendera (2000). "Survival and prognosis: investigation of Crataegus extract WS 1442 in congestive heart failure (SPICE)--rationale, study design and study protocol." Eur J Heart Fail **2**(4): 431-7.
- Hou, Y.-C., S.-L. Hsiu, C.-C. Chen and P.-D. L. Chao (2000). "Effect of Honey on Naringenin Absorption from a Decoction of the Pericarps of Citrus grandis." Planta Med **66**: 439-43.
- ICH (1995). Guideline for Industry, Text on Validation of Analytical Procedures (Q2A).

ICH (1996). Guideline for Industry, Validation of Analytical Procedures (Q2B).

Ihme, N., H. Kiesewetter, F. Jung, K. H. Hoffmann, A. Birk, A. Muller and K. I.

Grutzner (1996). "Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial." Eur J Clin Pharmacol **50**(6): 443-47.

Ishikawa, Y. and M. Kitamura (2000). "Bioflavonoid Quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 629-34.

Janssen, P. L. T. M. K., R. P. Mensink, F. J. J. Cox, J. L. Harryvan, R. Hovenier, P. C. H. Hollman and M. B. Katan (1998). "Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on the hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study." Am J Clin Nutr **67**(2): 255-62.

Jarosch, E., H. Madreiter, H. Richter and H. Berger (1977). "[Experiments on the biosynthesis of UDP-Glucuronyltransferase and UDP-Glucosyltransferase under the influence of eucalyptol (author's transl)]. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Eucalyptol auf die Biosynthese der UDP-Glucuronyltransferase und UDP-Glucosyltransferase." Pädiatrie und Patologie **12**(1): 19-24.

Jones, D. J., C. K. Lim, D. R. Ferry and A. Gescher (1998). "Determination of quercetin in human plasma by HPLC with spectrophotometric or electrochemical detection." Biomed Chromatogr **12**(4): 232-5.

Katan, M. B. (1997). "Flavonoids and heart disease [editorial; comment]." Am J Clin Nutr **65**(5): 1542-3.

Kedzia, B., T. Wrocinski, K. Mrugasiewicz, P. Gorecki and H. Grzewinska (1975). "Antibacterial action of urine containing arbutin metabolic products." Med Dosw Microbiol **27**: 305-14.

Keinänen, M. and R. Julkunen-Tiitto (1996). "Effect of Sample Preparation Method on Birch ( *Betula pendula* Roth) Leaf Phenolics." J Agric Food Chem **44**(9): 2231-34.

Keinänen, M. and R. Julkunen-Tiitto (1998). "High- performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves." J Chromatogr A **793**: 370-7.

- Keli, S. O., M. G. Hertog, E. J. Feskens and D. Kromhout (1996). "Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study." Arch Intern Med **156**(6): 637-42.
- Kenndler, E. and C. Schwer (1990). "Determination of arbutin in uvae-ursi folium (bearberry leaves) by capillary zone electrophoresis." J. Chromatogr. **514**: 383-88.
- Killard, A. J., R. O'Kennedy and D. P. Bogan (1996). "Analysis of the glucuronidation of 7-hydroxycoumarin by HPLC." J Pharm Biomed Anal **14**: 1585-90.
- Kimura, Y., N. Matsushita and H. Okuda (1997). "Effects of baicalein isolated from *Scutellaria baicalensis* on interleukin 1 beta- and tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in cultured human umbilical vein endothelial cells." J Ethnopharmacol **57**(1): 63-7.
- Knekt, P., R. Jarvinen, A. Reunanen and J. Maatela (1996). "Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study [see comments]." Brit Med J **312**(7029): 478-81.
- Koscielny, J., H. Radtke, K. H. Hoffmann, F. Jung, A. Muller, K. I. Grutzner and H. Kiesewetter (1996). "Fagorutin-Tee bei chronisch venöser Insuffizienz (CVI)." Z Phytother **17**: 147-59.
- Krawczyk, U., G. Petri and A. Kery (1991). "HPLC analysis of procyanidins in *Crataegus* extracts." Arch Pharm **324**: 97-9.
- Lang, F. (1996). "Quantitative Bestimmung von Proanthocyanidinen in Ginkgo-biloba-Spezialextrakten." Pharmazie **51**(10): 735-7.
- Lee, M.-J., Z.-Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine and C. S. Yang (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**: 393-9.
- Leipolz, I. (1999). Quantifizierung von Procyanidinen und Flavonoiden in Weißdorn-Präparaten. Diploma Thesis. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität.
- Leuchtgens, H. (1993). "[Crataegus Special Extract WS 1442 in NYHA II heart failure. A placebo controlled randomized double-blind study]." Fortschr Med **111**(20-21): 352-4.
- Li, Q. M., H. Van den Heuvel and M. Claeys (1995). Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta (Georgia).
- Liu, B., D. Anderson, D. R. Ferry, L. W. Seymour, P. G. de Takats and D. J. Kerr (1995). "Determination of quercetin in human plasma using reversed-phase high-

- performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Appl **666**(1): 149-55.
- Lyckander, I. M. and K. E. Malterud (1992). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase." Acta Pharm. Nord. **4**(3): 159-66.
- Manach, C., C. Morand, V. Crespy, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat and C. Remesy (1998). "Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties." FEBS Lett **426**(3): 331-6.
- Manach, C., C. Morand, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat and C. Remesy (1997). "Bioavailability of rutin and quercetin in rats." FEBS Lett **409**(1): 12-6.
- Mayr, U. (1995 a). Einfluß des Phenolstoffwechsels beim Apfel (*Malus domestica*) auf das Resistenzpotential gegen Apfelschorf (*Venturia inaequalis*). Dissertation München, Universität Weihenstephan.
- Mayr, U., D. Treutter, C. Santos-Buelga, H. Bauer and W. Feucht (1995). "Developmental changes in the phenol concentrations of 'golden delicious' apple fruits and leaves." Phytochemistry **38**(5): 1151-5.
- Mc Murrough, I. (1978). "Chromatographic separation and automated analysis of flavanols." Anal Biochem **91**: 92.
- McAnlis, G. T., J. McEneny, J. Pearce and I. S. Young (1997). "The effect of various dietary flavonoids on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro using both metallic and non-metallic oxidising agents." Biochem Soc Trans **25**(1): 5124-7.
- McAnlis, G. T., J. McEneny, J. Pearce and I. S. Young (1998). "Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification." Eur J Clin Nutr **52**(3): 202-6.
- McAnlis, G. T., J. McEneny, J. Pearce and I. S. Young (1999). "Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man." European Journal Of Clinical Nutrition **53**(2): 92-6.
- McMurrough, I. (1981). "High-Performance Liquid Chromatography of flavonoids in barley and hops." J Chromatogr. **218**: 683-93.
- Meier, B. and N. Linnenbrink (1996). "Status und Vergleichbarkeit pflanzlicher Arzneimittel." Dtsch. Apoth. Ztg. **136**: 4205-20.

- Michels, S. (2000). Bestimmung des Arzneistoffes Carvediol und seiner Metaboliten aus Körperflüssigkeiten durch Kapillarelektrophorese mit Laser-Induzierter Fluoreszenzdetektion. Dissertation. Münster, Westfälische Wilhelms-Universität.
- Middleton, E. and C. Kandaswami (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: The Flavonoids: Advances in Research since 1986. J. B. Harborne. London, Chapman & Hall: 619-52.
- Middleton, E. J. and K. Chitan (1992). "Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions." Biochem Pharmacol **43**: 1167-79.
- Miyake, Y., K. Shimoi, S. Kumazawa, Y. Kanefumi, N. Kinase and T. Osawa (2000). "Identification and Antioxidant Activity of Flavonoid Metabolites in Plasma and Urine Eriocitrin-Treated Rats." J Agric Food Chem **48**(8): 3217-24.
- Moon, J. H., R. Nakata, S. Oshima, T. Inakuma and J. Terao (2000). "Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after short time ingestion of onion by woman." Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol **279**: R461-7.
- Morand, C., V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Demigne and C. Remesy (1998). "Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties." Am J Physiol **275**(1 Pt 2): R212-9.
- Morgan, D. M., J. D. Pearson and J. L. Gordon (1989). "Lysosomal hydrolases of human vascular cells: response to agonists of endothelial function." Biochim Biophys Acta **1010**(2): 184-90.
- Muldoon, M. F. and S. B. Kritchevsky (1996). "Flavonoids and heart disease." BMJ **312**(7029): 458-9.
- Murgu, L., D. Dobrescu, S. Andronescu and S. Iacobas (1978). "Study of the bioavailability in man of rutoside from some pharmaceutical products." Farmacia Bucharest **26**(Jul-Sep): 149-54.
- Nieder, M. (1991). "Pharmakokinetik der Gingko-Flavonoide im Plasma." Münch Med Wochenschr **133**: S61-S62.
- Nielsen, S. E., R. Freese, C. Cornett and L. O. Dragsted (2000). "Identification and quantification of flavonoids in human urine samples by column-switching liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." Anal Chem **72**(7): 1503-9.

- Nolte, C., M. Eigenthaler, P. Schanzenbacher and U. Walter (1991). "Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors." J Biol Chem **266**: 14808-12.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman and M. B. Katan (1998). Absorption and excretion of quercetin glucosides in man. XIXth International Conference on Polyphenols, Lille (France).
- Ossipov, V., K. Nurmi, J. Loponen, E. Haukioja and K. Pihlaja (1996). "High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*." J Chromatogr A **721**(1): 59-68.
- Paganga, G. and C. A. Rice-Evans (1997). "The Identification of Flavonoids as Glycosides in Human Plasma." FEBS Lett **401**: 78-82.
- Paper, D. H., J. Koehler and G. Franz (1993). "Bioavailability of drug preparations containing a leaf extract of *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Sprengl. (*Uvae ursi folium*)." Pharm Pharmacol Lett **3**: 63-66.
- Pauli, G. F. (2001). "qNMR - A Versatile Concept for the Validation of Natural Product Reference Compounds." Phytochem Anal **12**: 28.
- Ph.Eur. (1999). Monographie Weißdornfrüchte. Europäisches Arzneibuch. B. f. Gesundheit. Eschborn, Deutscher Apotheker Verlag/Govi Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH. **Nachtrag 2000**: 1507.
- Ph.Eur. (2000). Monographie Bärentraubenblätter. Europäisches Arzneibuch. B. f. Gesundheit. Eschborn, Deutscher Apotheker Verlag/Govi Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH. **Nachtrag 2000**: 523-24.
- Pietta, P. G. and C. Gardana (1991). "High-performance liquid chromatographic analysis of flavonol glycosides of *Solidago virgaurea*." J Chromatogr **558**: 296-301.
- Pietta, P. G., P. L. Mauri, E. Manera and P. L. Ceva (1989). "HPLC determination of the flavonoid glycosides from *Betula folium* Extracts." Chromatographia **28**(5-6): 311-2.
- Porter, L. J. (1989a). Condensed Tannins. Natural Products of Woody Plants I. J. W. Rowe. Berlin, Springer Verlag: 651-90.
- Porter, L. J. (1989b). Tannins. Methods in Plant Biochemistry. P. M. Dey and J. B. Harborne. London, Academic Press. **1**: 389-420.

- Porter, L. J., L. N. Hrstich and B. G. Chan (1986). "The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin." Phytochemistry **25**(1): 223-30.
- Powell, C. and M. N. Clifford (1995). "Use of Porter's Reagents for the Characterisation of Thearubigins and Other Non-proanthocyanidins." J Agric Food Chem **68**: 33-8.
- Prior, R. L. and G. Cao (1999). "Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status." Proc Soc Exp Biol Med **220**(4): 255-61.
- Putman, L. J. and L. G. Butler (1989). "Separation of High Molecular Weight Sorghum Procyanidins by High-Performance Liquid Chromatography." J Agric Food Chem **37**: 943-6.
- Ratna, S., M. Chiba, L. Bandyopadhyay and K. S. Pang (1993). "Futile cycling between 4-methylumbelliferone and its conjugates in perfused rat liver." Hepatology **17**: 838-53.
- Rehwald, A. (1995). Analytical Investigation of Crataegus Species and Passiflora incamata L. by High Performance Liquid Chromatography. Zürich, ETH.
- Rein, D., S. Lotito, R. R. Holt, C. L. Keen, H. H. Schmitz and C. G. Fraga (2000). "Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status." J Nutr **130**(8S Suppl): 2109S-14.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." Trends in Plant Science **2**(4): 152-9.
- Rimm, E. R., M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer and W. C. Willett (1996). "Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals." Arch Intern Med **125**: 384-9.
- Rohr, G. and B. Meier (1997). "Crataegus - Pharmazeutische Qualität und Wirksamkeit." Dtsch Apoth Ztg **137**(42): 3740-52.
- Rohr, G. E. (1999). Analytical Investigation on and Isolation of Procyanidines from Crataegus Leaves and Flowers. Zürich, ETH.
- Rohr, G. E., B. Meier and O. Sticher (1999 a). "Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of procyanidines in Crataegus leaves and flowers." J Chromatogr A **835**: 59.
- Sarkar, S. K. and E. R. Howarth (1976). "Specificity of the Vanillin Test for Flavonols." J. Agric. Food Chem. **24**(2): 317-20.

- Schilcher, H. (1984). "Pflanzliche Urologica." Dtsch Apoth Ztg **124**: 2429.
- Schneider, G. (1990). Arzneidrogen - Ein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker. Mannheim, Wien, Zürich, B.I. Wissenschaftsverlag.
- Serafini, M., A. Ghiselli and A. Ferro-Luzzi (1996). "In vivo antioxidant effect of green and black tea in man." Eur J Clin Nutr **50**(1): 28-32.
- Serafini, M., G. Maiani and A. Ferro-Luzzi (1998). "Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans." J Nutr **128**(6): 1003-7.
- Shimoi, K., N. Saka, K. Kaji, R. Nozawa and N. Kinane (2000). "Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site." Biofactors **12**(1-4): 181-6.
- Siegers, C. P., J. P. Siegers, R. Pentz, C. Bodinet and J. Freudenstein (1997). "Metabolism of Arbutin from Uvae Ursi-extracts in humans." Pharm Pharmacol Lett **7**(2/3): 90-2.
- Spencer, C. M. and e. al. (1988). "Specificity of the vanillin-test for flavonols." Phytochemistry **27**: 2397.
- Spencer, J. P. E., G. Chowrimootoo, R. Choudhury, E. S. Debnam, S. K. S. Srai and C. Rice-Evans (1999). "The small intestine can absorb and glucuronidate flavonoids." FEBS Lett **458**: 224-30.
- Stafford, H. A. and H. H. Lester (1980). "Procyanidins condensed tannins in green cell suspension cultures of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) compared with those in strawberry (*Fragaria chiloensis* var. *ananassa*) and avocado (*Persea gratissima*) leaves by means of C18 reversed phase chromatography." Plant Physiol **66**: 1085-91.
- Stammwitz, U. (1998). "Pflanzliche Harnwegsdesinfizienzen - heute noch aktuell?" Z Phytother **19**: 90-5.
- Stumpf, C., W. Andlauer and P. Fürst (2001). "Absorption von Rutin im isoliert perfundierten Rattendünndarm." **55**: 9-10.
- Sumaryono, W., P. Proksch, V. Wray, L. Witte and T. Hartmann (1991). "Qualitative and Quantitative Analysis of the Phenolic Constituents from *Orthosiphon aristatus*." Planta Med **57**: 176-80.
- Teissedre, P. L., E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, H. Peleg and J. B. German (1996). "Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines." J Sci Food Agric **70**: 55-61.

- Terao, J. (1999). "Dietary flavonoids as antioxidants in vivo: conjugated metabolites of (-)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma." J Med Invest **46**(3-4): 159-68.
- Thompson, R. S., D. Jacques and E. Haslam (1972). "Plant Proanthocyanidines. Part I. Introduction: The Isolation, Structure and Distribution in Nature on Plant Procyanidines." J Chem Soc Perkin I **2496**(1): 1387.
- Treutter, D. (1989). "Chemical reaction detection of catechin and proanthocyanidines with 4-dimethylamino cinnamaldehyde." J Chromatogr **467**: 185.
- Treutter, D., C. Santos-Buelga, M. Gutmann and H. Kolodziej (1994). "Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection." J Chromatogr A **667**: 290-7.
- Ullrich, D. and K. W. Bock (1984). "Glucuronide formation of various drugs in liver microsomes and in isolated hepatocytes from phenobarbital- and 3-methylcholanthrene-treated rats." Biochem Pharmacol **33**(1): 97-101.
- van het Hof, K. H., G. A. Kivits, J. A. Weststrate and L. B. Tijburg (1998). "Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk." Eur J Clin Nutr **52**(5): 356-9.
- van het Hof, K. H., S. A. Wiseman, C. S. Yang and L. B. Tijburg (1999). "Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption." Proc Soc Exp Biol Med **220**(4): 203-9.
- van't Klooster, G. A., N. F. N. van Woutersen, B. J. Blaauboer, J. Noordhoek and A. S. van Miert (1994). "Application of cultured hepatocytes derived from goat, sheep, and cattle in comparative drug metabolism studies." Xenobiotica **24**(5): 17-28.
- Veit, M., C. Beckert, C. Hohne, K. Bauer, B. Kast and H. Geiger (1995). "Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*." Phytochemistry **38**: 881-91.
- Vierling, W., N. Brand, F. Gaedcke, K. H. Sensch, E. Schneider and M. Scholz (2000). "Crataegus-Extrakte." Dtsch Apoth Ztg **140**(46): 5301-6.
- Wagner, H., G. Tittel and S. Bladt (1983). "Analysis and standardization of medicinal drugs and phytopreparations by HPLC and other chromatographic methods. 1. Communication: Flavonoid drugs." Dtsch Apoth Ztg **123**(11): 515-21.
- Watson, D. G. and E. J. Oliveira (1999). "Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in

- human urine after consumption of Ginkgo biloba tablets." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **723**(1-2): 203-10.
- Watson, D. G. and A. R. Pitt (1998). "Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **12**(4): 153-6.
- Weikl, A., K. D. Assmus, A. Neukum-Schmidt, J. Schmitz, G. Zapfe, H. S. Noh and J. Siegrist (1996). "[Crataegus Special Extract WS 1442. Assessment of objective effectiveness in patients with heart failure (NYHA II)]." Fortschr Med **114**(24): 291-6.
- Williamson, G., G. W. Plumb, Y. Uda, K. R. Price and M. J. Rhodes (1996). "Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells." Carcinogenesis **17**(11): 2385-7.
- Wittig, J. and M. Veit (1999). "Analysis of Flavonol Glycosides from *Solidago* Species in a Complex Plant Extract." Drogenreport **12**(21): 18-20.
- Wittig, J., M. Herderich, E.U. Graefe and M. Veit (2001a). "Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **753**(2): 237-43
- Wittig, J., I. Leipolz, E.U. Gräfe, B. Jaki, D. Treutter and M. Veit (2001b). "Quantification of Procyanidines in Oral Herbal Medicinal Products Containing Extracts of *Crataegus spec.*" Drug Res (Arzneimittelforsch), in print.
- Wittig, J., S. Wittemer and M. Veit (2001c). "Validated method for the determination of hydroquinone in human urine by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **761**(1): 125-32.
- Yamamoto, N., J. H. Moon, T. Tsushida, A. Nagao and J. Terao (1999). Arch Biochem Biophys **372**: 347.
- Yang, C. S., L. Chen, M. J. Lee, D. Balentine, M. C. Kuo and S. P. Schantz (1998). "Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(4): 351-4.
- Zoellner, H., M. Hofler, R. Beckmann, P. Hufnagl, E. Vanyek, E. Bielek, J. Wojta, A. Fabry, S. Lockie and B. R. Binder (1996). "Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells." J Cell Sci **109**(Pt 10): 2571-80.

---

## 12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von O-( $\beta$ -D-Glucosyl)-hydrochinon (Arbutin).....	2
Abbildung 2: Struktur ausgewählter Flavon- (R2 = H) und Flavonol-Aglykone (R2 = OH): Quercetin (R1 = OH, R2 = OH), Kämpferol (R1 = H, R2 = OH), Isorhamnetin (R1 = OCH <sub>3</sub> , R2 = OH), Luteolin (R1 = OH, R2 = H).....	2
Abbildung 3: Struktur der Diastereomeren Catechin und Epicatechin.....	3
Abbildung 4: Struktur des PC A2 (A-Reihe), PC B2 (B-Reihe) und des Anthocyanidins Cyanidin.....	4
Abbildung 5: Herstellung von RP-Trägermaterialen und deren „endcapping“ (schematisch).....	9
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Messanordnung zur Detektion von Procyanidinen bei 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA.....	10
Abbildung 7: Umwandlung eines Procyanidins zum roten Anthocyanidin im sauren Medium (links) sowie Kondensationsreaktion von Epicatechin mit Vanillin (mitte) und 4-Dimethylaminozimtaldehyd (rechts).....	13
Abbildung 8: Schematische Darstellung coulometrischen Messzellen (modifiziert nach (Acworth and Bowers 1997)).....	20
Abbildung 9: schematische Darstellung eines Quadrupol-Analysators.....	23
Abbildung 10: Einfluss der Säulentemperatur auf das chromatographische Verhalten verschiedener Quercetinglykoside.....	42
Abbildung 11: Chromatogramm einer fixen Kombination aus Birkenblätter, Goldrutenkraut und Orthosiphonblätter enthaltenden oralen festen Arzneiform (350 nm).....	44
Abbildung 12 Chromatogramm des Extraktgemisches einer fixen Kombination der Extrakte von Birkenblättern, Goldrutenkraut und Orthosiphonblättern bei 330 nm (unten) und 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung (oben) mit DMAZA (drei Minuten Retentionszeitdifferenz resultieren aus dem Versuchsaufbau).....	46
Abbildung 13 Produktions Spektrum von Rutin (Quercetin 3-O-rhamnoglucosid).....	46
Abbildung 14: Kinetik von Quercetin (RT = 36,8) und anderen Substanzen von Glucuronidase behandelten Plasmaproben eines Probanden nach Verumgabe.....	51

---

Abbildung 15: Kinetik von Quercetin (RT = 36,8) und anderen Substanzen von Glucuronidase behandelten Plasmaproben eines Probanden nach Placebo-Gabe.....	51
Abbildung 16: Kinetik ausgewählter Peaks in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate bei oraler Gabe von Verum. ....	52
Abbildung 17: Kinetik ausgewählter Peaks in Humanurin nach Hydrolyse der Konjugate bei oraler Gabe von Placebo. ....	52
Abbildung 18: Chromatogramme von Urin- bzw. Plasma-Blanks und einer mit 65 pg on column (LOQ) gespikten Plasma-Probe. ....	53
Abbildung 19: Residuen-Plot der Quercetin-Kalibriergerade. ....	54
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Quercetin in Humanplasma. ....	54
Abbildung 21: Durchschnittliche Quercetin-Plasmaspiegel (n = 3, Mittelwert ± größte Abweichung) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten). ....	58
Abbildung 22: Quercetin-Plasmaspiegel der Probanden 01 (a) und 08 (b) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).....	59
Abbildung 23: Durchschnittliche (n=3, Mittelwert ± größte Abweichung) kumulative renale Quercetinausscheidung nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten). ....	59
Abbildung 24: Kumulative renale Quercetinausscheidung der Probanden 01 (a) und 08 (b) nach Hydrolyse der Konjugate (Verum – oben, Placebo – unten).....	60
Abbildung 25: Gesamt-PC-Gehalt (m/m) und Gehalt (m/m) an mono- bis trimeren PC bezogen auf den im Fertigarzneimittel verarbeiteten Extrakt.....	65
Abbildung 26: PC-Gesamtgehalt bzw. Anteil an monomeren, dimeren und trimeren Procyanidinen in einer vom Hersteller empfohlenen Tagesdosis. ....	66
Abbildung 27: Residuenplot der PC B2-Kalibriergerade (DMAZA-Methode).....	67
Abbildung 28: Kalibriergerade für PC B2 (DMAZA-Methode).....	67
Abbildung 29: Trennung eines Crataegus-Extraktes mit Detektion bei 330 nm (UV) und 640 nm (HPLC-NSD, 1 = Catechin, 2 = PC B2, 3 = Epicatechin, 4 = PC C1, 5 = PC B5).....	69
Abbildung 30: Residuenplots der Kalibriergeraden für Epicatechin, Catechin und PC B2.....	70

---

Abbildung 31: Kalibriergerade von Catechin (HPLC-NSD).....	71
Abbildung 32: Stabilität (Mittelwert $\pm$ größte Abweichung, n = 2) von PC B2 unter verschiedenen Lagerbedingungen. ....	72
Abbildung 33: Retentionszeiten von Epicatechin (oben, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und Procyanidin B2 (mitte, ca. $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) gelöst in 50 % wässrigem Methanol. Signalvergleich im RIC (recombined ions chromatogramm, unten).....	73
Abbildung 34: Epicatechin (oben, $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und PC B2 (mitte, $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in Humanplasma. Signalvergleich im RIC (recombined ions chromatogramm, unten). ....	74
Abbildung 35: Massenspuren relevanter Massen für PC verschiedenen Polymerisationsgrades in Plasma zwei Stunden nach Gabe von vier Tabletten Crataegutt® novo 450. ....	75
Abbildung 36: Massenspuren der SRM-Experimente auf Epicatechin (oben) und PC B2 (mitte) in Humanplasma (RIC = recombined ions chromatogram). ....	76
Abbildung 37: Ausgewählte Massenspuren relevanter Massen für PC verschiedenen Polymerisationsgrades in einem Extrakt von Crataegutt® novo 450. ....	77
Abbildung 38: Chromatogramme des Rattenleber-Mikrosomen Assays vor (a @ 225 mV, b @ 675 mV) und nach (c @ 225 mV, d @ 675 mV) $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung bei 7 % Anteil organischer Phase.....	79
Abbildung 39: Voltammogramm der Referenzsubstanz Hydrochinonglucuronid (75-900 mV, 75 mV Schritte). ....	80
Abbildung 40 (a-d): Voltammogramme der Referenzsubstanz-Lösungen ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) von Arbutin (a), Hydrochinonsulfat (c), Benzochinon (d) und Hydrochinon (b, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (75-900 mV, 75 mV Schritte).....	81
Abbildung 41: Konzentrationsabhängige Veränderung des Peak-Klusters von Hydrochinon im (untere drei Kurven) und außerhalb (obere Kurve, Sättigung) des Arbeitsbereiches. ....	82
Abbildung 42 (a-d): Voltammogramme (12 Potentiale 75-900 mV) von wässrig-methanolischer Hydrochinon-Lösungen verschiedener Konzentrationen (a = $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , b = $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , c = $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und d = $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).....	83
Abbildung 43: DryLab®-Graphik zur „kritischen Auflösung“ (Ordinate) der isokratischen Trennung des Rattenleber-Microsomen-Ansatzes (RMA) bei	

---

variablen organischen Fließmittel-Anteil und daraus resultierender Verkürzung der Laufzeit (Abszisse).....	85
Abbildung 44: Simuliertes (a) und reales (b) Chromatogramm des Rattenleber-Microsomen-Ansatzes (RMA) mit Hydrochinonglucuronid (1), Arbutin (2), Hydrochinonsulfat (3) und Hydrochinon (4) (@ 10 % organische Phase, isokratisch; simultane elektrochemische Detektion bei 675 mV (1, 2, 3) und 225 mV (4)). .....	86
Abbildung 45: Chromatogramme von 10 Urin- Blank- Proben und einer mit 500 ng mL <sup>-1</sup> Hydrochinon gespikten Urin- Matrix- Probe.....	87
Abbildung 46: Residuen-Plot der Hydrochinon-Kalibriergerade.....	88
Abbildung 47: Graphische Darstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung von Hydrochinon in Humanurin.....	88
Abbildung 48: Graphische Darstellung (Mittelwert ± größte Abweichung, n=3) der Gefrier- und Auftaustabilität (-80/25°C) von Hydrochinon in Urinmatrix (0,5 µg Hydrochinon mL <sup>-1</sup> ) über 4 Gefrier- und Auftauzyklen (Mittelwert, n=2).....	91
Abbildung 49: Graphische Darstellung (Mittelwert ± größte Abweichung, n=3) der Stabilität von Hydrochinon (0,5 µg·mL <sup>-1</sup> ) gelöst in Urinmatrix (◆) bzw. Reinstwasser (●) und gelagert im Autosampler bei 15°C. ....	92
Abbildung 50: Mittlere Kinetik der renalen Elimination von Hydrochinon nach Applikation von 945 mg Bärentraubenblätter-Trockenextrakt als Filmtablette (◆) und als wässrige Lösung (■) (n = 16, LOQ bei 2,27 nmol·mL <sup>-1</sup> ). ....	93
Abbildung 51: Mittlere (n = 16) kumulative Elimination von Hydrochinon nach Applikation von 945 mg Bärentraubenblätter-Trockenextrakt als Filmtablette (◆) und als wässrige Lösung (■). .....	94
Abbildung 52: Produkt-Ionenspektren (ESI pos.) von Quercetin (a; Prekursorion m/z 303), Quercetin-3-O-glucosid (b; Prekursorion m/z = 465) und Isorhamnetin (c; Prekursorion m/z = 317). .....	97
Abbildung 53: HPLC- Chromatogramme (UV 254 nm) des Glucuronyltransferase-Assays vor (A) und nach (B) β-Glucuronidase Behandlung. ....	98
Abbildung 54: Produktionspektrum eines Quercetinglucuronides im UGT-Assay (Prekursorion m/z 479; [M+H] <sup>+</sup> , R <sub>t</sub> = 13,6). .....	99
Abbildung 55: Fragmentierungsschema von Quercetin (modifiziert nach (Li, Van den Heuvel <i>et al.</i> 1995)). .....	100

Abbildung 56: HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 1 und 2) mit vier synthetisierten Quercetinglucuroniden in einer Probe des UGT-Assays. ..	101
Abbildung 57: HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 3 und 4) mit nicht umgesetzten Quercetin in einer Probe des UGT-Assays.....	102
Abbildung 58: HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 1 und 2) mit Humanplasma-Proben nach oraler Gabe von Zwiebelmus. ....	103
Abbildung 59: Vergleich der SRM 1-Experimente von Proben des UGT-Assays und des Humanplasmas nach Gabe von Zwiebeln. ....	103
Abbildung 60: HPLC-UV (254 nm) und -MS/MS SRM-Experimente (SRM 4-7) mit Humanplasma-Proben nach oraler Gabe von Zwiebelmus (nach $R_t = 20$ – Peaks der Spülphase). ....	104
Abbildung 61: Modellsubstanzen zur Überprüfung der $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität. ..	106
Abbildung 62: Wiederfindung (Mittelwert $\pm$ größte Abweichung, $n = 2$ ) von Quercetin und Quercetinglucuronid nach Mehrfach-Filtration durch einen Filter verschiedener Filtermaterialien. ....	107
Abbildung 63: Stabilität von MUG, Quercetin (mit und ohne Zusatz von Vitamin C - VC) in powered Medium 199 bei Raumtemperatur (RT) und unter Assay-Bedingungen (37°C, 5%ige CO <sub>2</sub> -Atmosphäre).....	108
Abbildung 64: Schematische Darstellung einer Zellkulturflasche mit HUVEC-Assay. ....	109
Abbildung 65: Vergleich der Zellgrößen Fraktionen (gemessen mittels CASY 1 <sup>®</sup> ) eines geschädigten (links) und eines vitalen (rechts) HUVEC-Monolayers (unterschiedliche Ordinaten-Skala beachten, Ordinate = Counts, Abszisse = Zellvolumen [fL]).....	110
Abbildung 66: Gehalt an MUB im Medium nach Inkubation (4h) von HUVEC-Assays verschiedener Zellpassagen (Passage 3 mit MUG in Medium => starke Zellschädigung). ....	111
Abbildung 67: Einfluss der Wachstumsfaktoren RDGF und fKS auf die Glucuronid-Spaltung im HUVEC- und Stabilitäts- Assay (Mittelwert $\pm$ größte Abweichung, $n=4$ ). ....	112
Abbildung 68: Gehalt an Quercetin in Zellmedium nach vierstündiger Inkubation einer Quercetin-3-O-glucuronid-Lösung mit und ohne HUVEC-Zellen (Mittelwert $\pm$ größte Abweichung, $n = 2$ ). ....	113

Abbildung 69: Gehalt an MUG und MUB im Zelllysate verschiedener HUVEC-Assays nach vier bzw. 24 Stunden Inkubation.....	114
Abbildung 70: Mögliche Lokalisierung des Glucuronidase-Proteins und resultierende Resorptionsmechanismen von Quercetin in Endothelzellen.....	115
Abbildung 71: Quercetiningehalt in HUVEC-Zelllysaten nach Inkubation mit Quercetin bzw. Quercetin-3-O-glucuronid.....	117
Abbildung 72: Gehalt an MUB (Mittelwert $\pm$ größte Abweichung, $n = 4$ ) in verschiedenen Waschlösungen und Zelllysaten (unterschiedliche Ordinatoreinteilung beachten; Assay 1 und Assay 2 sind Experimente identischen Versuchsablauf). .....	118
Abbildung 73: Daten zur Präzision des HUVEC-Assays. ....	119
Abbildung 74: Chromatogramm eines mit MUG (ca. $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \approx 4 \times \text{LOD}$ ) gespickten HUVEC-Zelllysates.....	120
Abbildung 75: Residuen-Plot der Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferon (MUB) in Medium 199.....	120
Abbildung 76: Residuen-Plot der Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferonglucuronid (MUG) in Medium 199. ....	121
Abbildung 77: Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferon (MUB) in Zellmedium.....	121
Abbildung 78: Kalibriergerade für 4-Methylumbelliferonglucuronid (MUG) in Zellmedium.....	122
Abbildung 79: Systemeignungstest mit Präzisionsdaten für MUG an einer HPLC-UV-Anlage bei 320 nm. ....	123
Abbildung 80: Berechnung der Richtigkeit aus Präzisions- und Kalibrierdaten für MUG an einer HPLC-UV-Anlage bei 320 nm. ....	124

## 13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkung und Wirksamkeit ausgewählter Stoffe und Stoffgruppen .....	5
Tabelle 2: Validierungsanforderungen nach ICH (Q2A) und *FDA (Guidance for Industry (Draft) – Analytical Procedures and Methods Validation). .....	7
Tabelle 3: Spezifische Absorptionskoeffizienten von Procyanidinen und Cyanidinen nach Umwandlung zu Anthocyanidin im sauren Medium. ....	14
Tabelle 4: Übersicht über etablierte HPLC-Methoden zur Bestimmung von einfachen und Polyphenolen in Arzneipflanzen-Extrakten (n.a. = nicht angegeben). ....	15
Tabelle 5: Überblick zu Quercetin-Bioverfügbarkeitsstudien der letzten Jahre mit angewendeter Analytik (ECD – elektrochemische Detektion (NSD = Nachsäulen-derivatisierung, FD = Fluoreszenz-Detektion, ECD = elektrochemische Detektion, PDA = Photodioden-Array, CAD = coulometrische Array-Detektion).....	16
Tabelle 6: Trenn- und Detektions- Systeme zur Bestimmung phenolischer Komponenten in Flüssigkeiten und Geweben biologischen Ursprungs (n.a. = nicht angegeben) .....	25
Tabelle 7 berechnete Auflösung des untersuchten Canephron <sup>®</sup> novo-Extraktes bei 350 nm (RT= Retentionszeit, $w_{(0,5)}$ = Peakhalbwertsbreite, $R_s$ = Auflösung). ....	43
Tabelle 8: Peaks aus Abbildung 11 mit Spektren-Qualität und Absorptionsmaxima.	47
Tabelle 9: Wiederholstandardabweichung der Auflösung des kritischen Peakpaares Quercetin-3-O-arabinofuranosid (37) und Quercetin-3-O-rhamnosid (38).....	49
Tabelle 10: Daten zur Wiederholstandardabweichung der Methode. ....	55
Tabelle 11: Präzisionsdaten der Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS)....	56
Tabelle 12: Daten zur Richtigkeit der Methode.....	56
Tabelle 13: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte <i>Crataegus</i> -Präparate des deutschen Arzneimittelmarktes (* wie auf Umverpackung oder Beipackzettel deklariert; n.d. – nicht deklariert). ....	62
Tabelle 14: Validierungsdaten zur Wiederholstandardabweichung. ....	68
Tabelle 15: Kalibrierdaten für die Referenzsubstanzen der einzelnen Stoffgruppen.	70
Tabelle 16: Validierungsdaten zur Inter-day-precision.....	72
Tabelle 17: SRM-Experimente zur Bestimmung von Quercetin, PC B2 und Epicatechin.....	75

Tabelle 18: Peakhöhen-Ratio-Vergleich (Cullison and Gamache 1997) der Peak-Kluster der Hydrochinon-Referenzsubstanz in wässrigem 20 %-igem Methanol mit <i>in vivo</i> freigesetztem Hydrochinon in Humanurin.....	82
Tabelle 19: Daten zur Wiederholstandardabweichung der Methode. ....	89
Tabelle 20: Präzisionsdaten der Intra-Laboratoriums-Standardabweichung (ILS)....	90
Tabelle 21: Daten zur Richtigkeit der Methode.....	90
Tabelle 22: Gefrier- und Auftaustabilität von Hydrochinon in Humanurin .....	91
Tabelle 23: Autosamplerstabilität von Hydrochinon in wässriger Lösung bzw. Urin-Matrix.....	92
Tabelle 24: SRM-Experimente zur selektiven Analyse von Quercetin und Quercetin-kojugaten.....	101

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

# Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

---

Name:	Jörg Wittig
Geburtsdatum	12. Oktober 1970
Geburtsort	Schleiz
Familienstand	verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Ausbildung

---

seit Juli 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH in Sinzig am Rhein
<b>Jan 1998 – Jun 2000</b>	<b>Promotion</b> Bei Privatdozent Dr. Markus Veit „Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden - analytische und biochemische Untersuchungen“ Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH in Sinzig am Rhein
Apr 1999 – Jun 2000 Jan 1998 – März 1999	Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie Als Wissenschaftlicher Mitarbeiter Betreuung von drei Diplomarbeiten und mehrerer Kurse im Rahmen der Ausbildung zum Apotheker
<b>Mai 1992 – Okt 1997</b>	<b>Pharmaziestudium</b> Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Nov 1997 Mai 1997 – Okt 1997	Approbation als Apotheker Praktikum in der „Wolfs alte privilegierte Apotheke“ Bredstedt
<b>Nov 1996 – April 1997</b>	<b>Industriepraktikum</b> Pfizer-Central-Research-Centre, Sandwich, Großbritannien
<b>Sep 1990 – Apr 1992</b>	<b>Praktische Ausbildung</b> Teilnahme an der Ausbildung zum Pharmazeutisch-Kaufmännischen Assistenten, Medizinische Fachschule Gera
Sep 1990 – Aug 1991 Mai 1990 – Aug 1990	Unsteriler Pfleger im Operationssaal des Kreiskrankenhauses, Schleiz Zivildienst als unsteriler Pfleger im Operationssaal des Kreis- krankenhauses, Schleiz
Mai 1990 – Aug 1990	Wehrdienst bei der Nationalen Volksarmee
<b>1987-1989</b> Aug 1989	<b>Hans Beimler Oberschule</b> Abitur
<b>1981-1987</b>	<b>Polytechnische Oberschule Geschwister-Scholl, Saalburg</b>
<b>1977-1980</b>	<b>Goethe Oberschule Schleiz</b>

## Publikationsliste

### PAPER

---

Wittig, J. and M. Veit (1999). "Analysis of Flavonol Glycosides from *Solidago* Species in a Complex Plant Extract." Drogenreport **12**(21): 18-20.

Wittig, J., M. Herderich, E.U. Graefe and M. Veit (2001). "Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **753**(2): 237-43.

Wittig, J., I. Leipolz, E.U. Gräfe, B. Jaki, D. Treutter and M. Veit (2001b). "Quantification of Procyanidines in Oral Herbal Medicinal Products Containing Extracts of *Crataegus spec.*" Drug Res (Arzneimittelforsch): in print.

Wittig, J., S. Wittemer and M. Veit (2001). "Validated method for the determination of hydroquinone in human urine by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **761**(1): 125-32.

### MITARBEIT AN BÜCHERN

---

Amborn, J., E. Anhalt, U. Braun-Neubrand, I. Glöckl, G. Goßler, P. Hermening, G. Holzkamp, M. Kaltenbach, M. Klein, U. Lotze, S. Lorenzen, D. Pamperin, U. Schiemann, H. M. Schwarm, M. Veit, J. Wittig (2001). Handbuch Validierung analytischer Verfahren. Bonn, Krahe Druck.

### POSTERBEITRÄGE

---

Wittig, J., Veit, M. and M. Herderich (1999) "Identification and Quantification of Plant Phenolic Compounds in Human Plasma by HPLC-MS/MS." In: Luijenik, T., de Graaf, P., Remmelzwaal, A., Verpoorte, R. (eds) 2000 Years of Natural Products Research – Past, Present and Future, Amsterdam Centre for Drug Research, Leiden.

Wittig, J., Veit, M. and M. Herderich (1999) "Determination of Quercetin Glucuronides in Human Plasma by HPLC-MS/MS." Arch Pharm Pharm Med Chem **332**(S2): 50.

Wittig, J., Veit, M. and M. Herderich (1999) "Quantification of Quercetin and Isorhamnetin in Human Plasma and Urine by HPLC-MS/MS." Arch Pharm Pharm Med Chem **332**(S1): 54.

Wittig, J., Smolenski, A., Thalheimer, P. and M. Veit (2000) Beta-glucuronidase activity of human endothelial tissues in in-vitro model using primary monolayer cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), Polyphenols Communications 2000, Freising-Weihenstephan: 459.