

Metabolismus von Rotkleeisoflavonen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
- Abteilung Lebensmittelchemie -
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ronald Maul

aus Detmold

Hamburg 2008

1. Gutachter: Prof Dr. Sabine E. Kulling
2. Gutachter: Prof Dr. Bernwart Bisping

Tag der Disputation: 6.10.2008

Prüfungskommission:

Prof. Dr. Sabine E. Kulling

Prof. Dr. Elisabeth Stahl-Biskup

Dr. Ilka Haase

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2004 und April 2008 im Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie der Universität Hamburg angefertigt.

Frau Prof. Dr. Sabine E. Kulling danke ich für die Überlassung eines spannenden Themas und die weitgehende Freiheit bei der inhaltlichen Ausgestaltung sowie ihre stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeiner Hintergrund.....	1
1.1.1 Rechtliche Einordnung	2
1.2 Vorkommen und Charakterisierung von Isoflavonen.....	5
1.3 Bioverfügbarkeit von Isoflavonen.....	8
1.4 Metabolismuswege der Isoflavone	9
1.4.1 Grundlagen der Biotransformation.....	9
1.4.2 <i>In vitro</i> Modelle zur Untersuchung von metabolischen Umsetzungen	10
1.4.3 Phase-I-Metabolismus	11
1.4.4 Phase-II-Metabolismus	13
1.4.5 Mikrobieller intestinaler Metabolismus.....	17
1.4.6 Inhibition und Induktion	18
1.5 Physiologische Effekte von Isoflavonen.....	22
1.5.1 Menopausale Beschwerden.....	23
1.5.2 Osteoporose.....	23
1.5.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen	25
1.5.4 Mit der Krebsentstehung assoziierte Wirkungen	26
1.5.5 Genotoxische und mutagene Wirkung von Isoflavonen	29
1.5.6 Weitere Einflüsse von Isoflavonen auf den Metabolismus von Estradiol	31
1.5.7 Einfluss auf die Schilddrüse	32
1.6 Resultierende Problemstellung	33
2. Material & Methoden.....	35
2.1 Isoflavongehalt und –verteilungsmuster in Nahrungsergänzungsmitteln	35
2.1.1 Aufarbeitung der Nahrungsergänzungsmittel	35
2.1.2 Chromatographische Bedingungen	37
2.1.3 Quantifizierung	38
2.2 <i>In vitro</i> Phase-I-Metabolismus von Irilon	39
2.2.1 Rattenlebermikrosomenherstellung	39
2.2.1.1 Charakterisierung der hergestellten Lewis-Ratten- lebermikrosomen.....	41
2.2.2 Invitrosomen®	42
2.2.3 <i>In vitro</i> Inkubationen.....	43
2.2.4 Auswertung enzymkinetischer Daten	49
2.2.4.1 Klassische Kinetik.....	50
2.2.4.2 Ermittlung enzymkinetische Parameter	50
2.2.4.3 Atypische Kinetiken	52
2.3 <i>In vitro</i> Phase-II-Metabolismus von Irilon.....	54
2.3.1 Extraktion von Irilon.....	54
2.3.2 Mikrosomen	55
2.3.3 Untersuchungen mit Lebermikrosomen	56
2.3.4 Untersuchungen mit UGT-Supersomen®	58
2.4 Umsetzung von Irilon mit humaner fäkaler Mikroflora	65

2.4.1 Durchführung	65
2.4.2 Analyse mittels HPLC-ESI(+)-MS/MS	66
2.4.3 Analyse mittels GC-EI-MS/MS	67
2.5 Isoflavonmetabolismus nach Aufnahme eines Rotkleepräparates ..	68
2.5.1 Studiendurchführung	68
2.5.2 Aufbereitung des Blutplasmas	69
2.5.3 Aufbereitung des Präparates zur GC/MS-Analyse	71
2.6 Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone	72
2.7 Isolierung von Isoflavonen aus <i>Iris germanica</i>	73
3. Ergebnisse	75
3.1 Isoflavongehalte in kommerziellen Isoflavonpräparaten	75
3.1.1 Sojapräparate	75
3.1.2 Rotkleepräparate	77
3.1.3 Quantifizierung der Isoflavongehalte	80
3.1.4 Quantifizierung der Isoflavone nach enzymatischer Spaltung ..	81
3.2 <i>In vitro</i> Phase-I-Metabolismus der Rotkleeisoflavone	82
3.2.1 Umsetzung von Irimon mit Human- und Rattenlebermikrosomen	85
3.2.2 Umsetzung von Irimon durch rekombinante humane Cytochrom-P450-Enzyme	88
3.2.3 Umsetzung von Biochanin A und Formononetin	91
3.2.3.1 Biochanin A	91
3.2.3.2 Formononetin	93
3.2.4 Beeinflussung des oxidativen Metabolismus von Formononetin durch Irimon	95
3.3 <i>In vitro</i> Phase-II-Metabolismus von Irimon	97
3.3.1 Aktivitätsscreening gegenüber Irimon	97
3.3.2 Untersuchung der kinetischen Parameter k_m und V_{max}	101
3.3.3 Berechnung der intrinsischen Clearance (Cl_{int})	111
3.3.4 Strukturaufklärung	112
3.4 Reduktiver Metabolismus von Irimon	113
3.4.1 HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS	113
3.4.2 GC-EI-MS/MS	116
3.5 <i>In vivo</i> Untersuchung nach Aufnahme eines Rotkleepräparates ..	119
3.5.1 Pilotstudie mit Probanden	119
3.5.2 Analyse des Nahrungsergänzungsmittels	123
3.5.3 Isoflavonverteilungsmusters nach Resorption	126
3.6 Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone	129
3.7 Isolierung von Isoflavonen aus <i>Iris germanica</i>	130
3.7.1. Analyse der Isoflavonkomposition des <i>Iris germanica</i> -Extraktes	130
3.7.2 Säurehydrolytische Spaltung der Glucoside	132
3.8 Strukturuntersuchungen mittels gekoppelter Massenspektrometrie	132
3.8.1 HPLC-ESI(+)-MS	133
3.8.1.1 Retro-Diels-Alder-Fragmentierungen	133
3.8.1.2 „nicht-rDA“-Fragmentierung durch C-Ring-Spaltung	137
3.8.2 GC-EI-MS	138

3.8.3	Strukturanalyse von Isoflavonen und Isoflavon-metaboliten mittels HPLC-ESI(+)-MS/(MS) und GC-EI-MS/(MS)	146
3.9	GC-EI-Quantifizierung von Irilon mit Ionenfallenmassenspektrometer	154
4.	Diskussion	158
4.1	Isoflavongehalte in kommerziellen Präparaten.....	158
4.1.1	Sojapräparate	158
4.1.2	Rotkleepräparate	159
4.2	Phase-I-Metabolismus von Irilon <i>in vitro</i>	161
4.3	<i>In vitro</i> Phase-II-Metabolismus von Irilon.....	171
4.4	Reduktiver Metabolismus von Irilon	176
4.5	<i>In vivo</i> Metabolismus nach Aufnahme eines Rotkleepräparates... ..	178
4.6	Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone	183
4.7	Isolierung von Isoflavonen aus <i>Iris germanica</i> -Extrakt	185
4.8	Strukturuntersuchungen mittels gekoppelter Massenspektrometrie	185
5.	Zusammenfassung	187
6.	Anhang	190
6.1	Formeln	190
6.2	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte	191
6.2.1	Chemikalien	191
6.2.2	Enzyme	192
6.2.3	Puffer und Medien	192
6.2.3.1	Mic-II Puffer	192
6.2.3.2	Puffer und Reagenzien für die Phase-II-Umsetzungen	193
6.2.3.3	ST-Medium	193
6.2.3.4	Enzymatische Behandlung mit β -Glucosidase/ β -Glucuronidase	194
6.2.4	Geräte.....	194
6.3	Tabellen	195
6.4	Ergänzende Abbildungen	202
7.	Literatur	212

Abkürzungen

7-HFC	7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin
7-HFC-GlucA	7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin-Glucuronid
BioA	Biochanin A
CALY	Calycosin
Cl _{int}	intrinsische Clearance
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
DAD	Diodenarray-Detektor
DAI	Daidzein
DHD	Dihydrodaidzein
DiätVO	Verordnung über diätetische Lebensmittel (Diätverordnung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EI	Elektron impact ionisation
ER	endoplasmatisches Retikulum
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
ESI	Elektronensprayionisation
FORM	Formononetin
GC	Gaschromatographie
GEN	Genistein
GLYC	Glycitein
HCl	Salzsäure
HDL	Lipoproteine hoher Dichte
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HFM	Humane fäkale Mikroflora
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IF	Isoflavon(e)
IRI	Irilon
ISTD	interner Standard
k _m	Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MCF-7	humane Brustkrebszelllinie
MDP	Methylendioxyphenyl
MI-Komplex	Metabolit-Intermediat-Komplex
MIKs	Mikrosomen
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie

Abkürzungen

NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NemV	Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel (Nahrungsergänzungsmittelverordnung)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
O-DMA	O-Desmethylangolensin
PBAP	Pseudobaptigenin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PRA	Pratensein
PRUN	Prunetin
RP	Umkehrphase
RPR	Relative Reaction Progress
TEAS	Triethylaminsulfat
TMS	Trimethylsilyl
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UDPGA	aktivierte Glucuronsäure
UGT	Uridin-diphosphoglucuronyltransferasen
V79	Hamsterlungenfibroblasten
V_{max}	maximaler Umsatz pro Zeit und Enzymmenge
XIC	Extracted-Ion-Chromatogramm
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Hintergrund

In der europäischen Ernährung ist seit einigen Jahren ein Trend zu einer „natürlicheren“ Ernährungsweise zu verzeichnen. Dies zeigt sich in einem wachsenden Interesse an Bioprodukten, ebenso wie an einer Tendenz, die Ernährung durch Nahrungsergänzungsmittel (NEM) auf Pflanzenbasis zu supplementieren, um einen vermeintlichen Versorgungsmangel mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu beheben, teilweise sogar um gesundheitliche Beschwerden zu lindern. In diesem Kontext ist auch das stetig steigende Angebot an isoflavonhaltigen NEM zu sehen, die basierend auf Soja und Rotklee vor allem als „natürliche“ Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie vermarktet werden. Isoflavone (IF) werden ganz allgemein zur Gruppe der Phytoestrogene gezählt. Hierbei handelt es sich um Pflanzeninhaltsstoffe, die in ihrer Struktur dem 17 β -Estradiol ähneln und mit den menschlichen Estrogenrezeptoren interagieren. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass in Gebieten mit hoher Sojaaufnahme über die übliche Nahrung die Inzidenz von hormonabhängigen Krebsarten wie Brust- oder Prostatakrebs signifikant geringer ist als in den westlichen Industrienationen. Dies wird vielfach auf die isoflavonreiche Ernährung zurückgeführt, ungeachtet weiterer deutlicher Unterschiede in Ernährung und Lebensumständen, die für diese Regionen zu berücksichtigen sind. Auch andere Erkrankungen wie Osteoporose, klimakterische Beschwerden und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sollen durch die Aufnahme von IF günstig beeinflusst werden. Hierfür fehlen bisher allerdings valide wissenschaftliche Daten und ebenso wenig sind mögliche gesundheitlich nachteilige Wirkungen ausreichend untersucht. Im Abschnitt 1.5 wird näher auf die bislang beschriebenen physiologischen Wirkungen von IF eingegangen.

Neben den bereits weit verbreiteten sojabasierten Präparaten werden zunehmend rotklee-basierte NEM angeboten. Letztere werden seitens der Hersteller zumeist mit Aussagen beworben, die Wirkungen der

enthaltenen IF versprechen, welche völlig analog zu denen der deutlich besser untersuchten sojahaltigen Präparate sind. Es wird dabei nicht berücksichtigt, dass das IF-Spektrum in Rotklee deutlich verschieden von dem ist, welches in Soja vorliegt. Die drei Haupt-IF aus Soja (Daidzein (DAI), Genistein (GEN) und Glycitein (GLYC)) liegen auch in Rotklee vor, dominierend sind aber die zusätzlich methoxylierten IF-Derivate Formononetin (FORM) und BiochaninA (BioA). Ferner liegen die IF in sojabasierten NEM überwiegend glucosiliert vor, wohingegen in Präparaten auf Rotkleebasis die Aglycone überwiegen. Wie sich diese Unterschiede auf die Bioverfügbarkeit und die physiologischen Effekte auswirken, wurde mehrfach untersucht, die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings widersprüchlich. In jüngster Vergangenheit sind verschiedene Übersichtsartikel erschienen, die sich um eine Zusammenführung der mannigfaltigen Einzeluntersuchungen bemühen (Albertazzi, 2006; Coon et al., 2007; Wuttke et al., 2007). Durch diese Artikel wird aber auch deutlich, dass es noch erhebliche Informationsdefizite im Zusammenhang mit rotklee-basierten NEM gibt.

In den folgenden Abschnitten werden die bereits vorhandenen Erkenntnisse zu Vorkommen, Aufnahme, Bioverfügbarkeit, biologischer Aktivität und Metabolismus von IF im Allgemeinen sowie mit Blick auf die Rotklee-IF im Speziellen dargestellt. Begonnen wird jedoch zunächst mit einem Blick auf die rechtliche Einordnung von IF-basierten NEM.

1.1.1 Rechtliche Einordnung

Isoflavonhaltige Präparate sind in Deutschland in fast jeder Drogerie und Apotheke frei erhältlich. Dabei werden sie in der Regel mit Aussagen beworben, die versprechen, dass menopausale Beschwerden bei regelmäßiger Einnahme abgemildert werden. Ferner soll die Gefahr des Auftretens bestimmter Krebsarten reduziert werden. Dabei ist die Darreichungsform in Form von Kapseln oder gepressten Tabletten einem Arzneimittel ähnlich.

Gemäß § 1 Abs. 1 der Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung (NemV) ist ein NEM ein Lebensmittel, das

1. dazu bestimmt ist, die allgemeine Ernährung zu ergänzen,
2. ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellt und
3. in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Pastillen, Tabletten, Pillen und anderen ähnlichen Darreichungsformen, Pulverbeuteln, Flüssigampullen, Flaschen mit Tropfeinsätzen und ähnlichen Darreichungsformen von Flüssigkeiten und Pulvern zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen, in den Verkehr gebracht wird.

Infolge dessen werden IF-Präparate als NEM, in denen die IF den „sonstigen Stoff“ darstellen, der eine physiologische Wirkung ausübt, gesehen. Zunächst setzt die NemV allerdings voraus, dass es sich bei dem Produkt um ein Lebensmittel handelt.

Laut Artikel 2 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 sind „Lebensmittel“ im Sinne dieser Verordnung alle Stoffe oder Erzeugnisse, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden kann, dass sie in verarbeitetem, teilweise verarbeitetem oder unverarbeitetem Zustand von Menschen aufgenommen werden.

Zu „Lebensmitteln“ zählen auch Getränke, Kaugummi sowie alle Stoffe - einschließlich Wasser -, die dem Lebensmittel bei seiner Herstellung oder Ver- oder Bearbeitung absichtlich zugesetzt werden.

Daraus resultiert die Frage, ob ein NEM im Umkehrschluss ebenso wie ein Lebensmittel die Bedingung, *üblicherweise* als Lebensmittel verzehrt zu werden oder eine *charakteristische* Zutat eines Lebensmittels zu sein, erfüllen muss. Dazu gehen die Rechtsauffassungen auseinander und EU-weite Regelungen fehlen bislang.

NEM sollen bestimmungsgemäß einer „allgemeinen“, aber doch spezifischen, zweckorientierten Ernährung dienen, indem sie einen Mangel ausgleichen. Sie sind von Diätmitteln nach der Diätverordnung (DiätVO)

zu unterscheiden, die einen besonderen Ernährungszweck, den Ernährungserfordernissen spezieller Verbrauchergruppen entsprechend, erfüllen. NEM sind ferner abzugrenzen vom Arzneimittel und vom Medizinprodukt. Wie schmal der Grad zum Arzneimittel ist, verdeutlicht ein Urteil des Oberlandesgericht Hamburg vom 31.5.2001, in dem festgestellt wird, dass ein Mittel als NEM statthaft ist, wenn es sich nicht generell auf Wechseljahresbeschwerden bezieht, sondern lediglich einen Ausschnitt der typischen Wechseljahresbeschwerden, nämlich unangenehme Begleiterscheinungen unterhalb der Schwelle der Krankheit (sogenannte Befindlichkeitsstörungen), beeinflussen will.

Gemäß § 5 (1) NemV hat der Hersteller oder Einführer eines NEM die Pflicht, dies spätestens beim ersten Inverkehrbringen dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter Vorlage eines Musters des für das Erzeugnis verwendeten Etiketts anzuzeigen.

Als eine zentrale Anforderung an die Aufmachung eines NEM formuliert die NemV, dass ein Inverkehrbringen nur erlaubt ist, „wenn auf der Fertigpackung zusätzlich die Menge der Nährstoffe oder sonstigen Stoffe mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung im Nahrungsergänzungsmittel, bezogen auf die auf dem Etikett angegebene empfohlene tägliche Verzehrsmenge (...) als Durchschnittswerte, die auf der Analyse des Erzeugnisses durch den Hersteller beruhen, angegeben ist.“ Dem wird bei IF-Präparaten in der Regel nachgekommen, indem der Gesamtgehalt an IF deklariert wird. Eine Differenzierung nach einzelnen IF oder freien und glucosidisch gebundenen IF findet in der Praxis selten statt, so dass suggeriert wird, dass weder die unterschiedliche Substitution noch Konjugation mit Glucose einen Einfluss auf die physiologischen Wirkungen haben. Nicht selten wird bei Rotklee-NEM gar kein genauer IF-Gehalt angegeben, sondern lediglich die Menge an „Rotklee-Extrakt“ deklariert.

1.2 Vorkommen und Charakterisierung von Isoflavonen

IF zählen zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Sie kommen neben den primären Pflanzeninhaltsstoffen Fett, Protein sowie Kohlenhydrat in der Pflanze vor. Während primäre Pflanzeninhaltsstoffe vorwiegend die Energieversorgung der Pflanze sicherstellen und dem Zellaufbau dienen, übernehmen sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe andere Aufgaben, wie zum Beispiel den Schutz vor Insektenbefall. So dienen speziell die IF dem pflanzeigenen Abwehrsystem und der intrazellulären Kommunikation (van Rhijn and Vanderleyden, 1995). Sie besitzen fungiziden, bakteriziden sowie antiviralen Charakter und schützen die Pflanze vor mikrobiellem Befall (Rivera-Vargas et al., 1993; Yu et al., 2000).

Strukturell stellen IF Stellungsisomere der im Pflanzenreich weit verbreiteten Flavonoide dar und unterscheiden sich von diesen durch die Position der Verknüpfung von Chromon- und Phenylring als Strukturelemente. Flavonoide sind in Position C-2 des Chromons phenylsubstituiert, bei IF befindet sich die Verknüpfung an Position C-3 (Abbildung 1). Somit sind beide Substanzklassen auch zu den Polyphenolen zu zählen.

Die Biosynthese in der Pflanze verläuft von der Zimtsäure ausgehend über

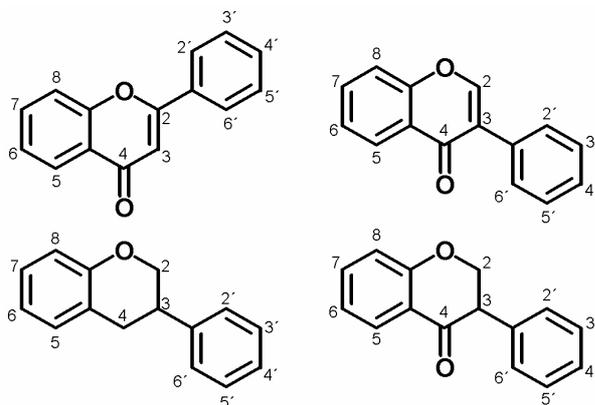


Abbildung 1: Grundstrukturen der Flavonoide. Flavon (oben links), Isoflavon (oben rechts), Isoflavan (unten links) und Isoflavanon (unten rechts)

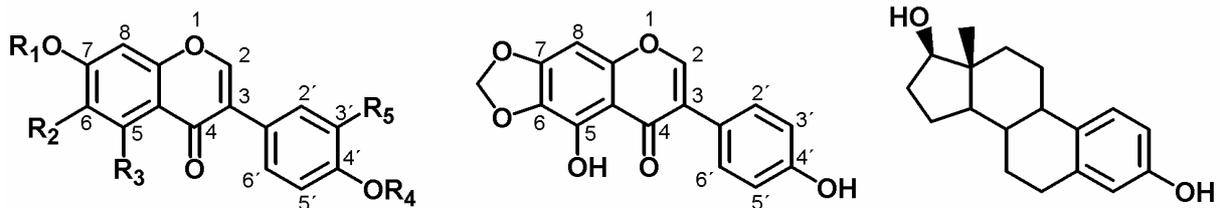
die Phenylpropane, die als Ausgangssubstanzen für die Bildung von Ligninbausteinen, Zimtsäurederivaten und Flavonoiden fungieren. Im Fall der Flavonoide reagiert das Phenylpropan Coumaryl-Coenzym A, mit drei Molekülen Malonyl-Coenzym A zu Chalkonen, die mittels der Chalkon-Flavanon-Isomerase in die Flavanone überführt werden.

Danach findet eine weitere Isomerisierung durch die IF-Synthase zu den IF statt (Heller and Forkmann, 1994; Knaggs, 2001). Da das Enzym IF-Synthase nur in wenigen Pflanzen existiert, ist das Vorkommen von IF im Pflanzenreich verglichen mit den Flavonen deutlich seltener (Coward et al., 1993).

Es gibt eine Vielzahl verschiedener IF, die sich durch ihr Substitutionsmuster, vorwiegend die Anzahl an Hydroxy- und Methoxygruppen, unterscheiden. Wenige der bisher beschriebenen IF weisen ein Methylendioxy-Strukturelement auf, das von anderen sekundären Pflanzenstoffen wie z.B. Sesamol oder Safrol bekannt ist. IF kommen hauptsächlich in Pflanzen vor, die zur Gruppe der Schmetterlingsblütler (*Leguminosae*) vor allem in der Familie der *Fabaceae* (Harbone, 1995) zählen. Soja stellt unter den Nahrungsmitteln die Hauptquelle für die Aufnahme von IF dar. Hauptkomponenten sind DAI, GEN und GLYC. Rotklee, der keine Rolle in der Humanernährung spielt, enthält hauptsächlich die in Position C-4' O-methylierten Derivate von GEN und DAI, BioA und FORM sowie in geringerer Konzentration Irilon (IRI) (Wu et al., 2003). In Abbildung 2 und Tabellen 1 und 2 sind die Strukturen der häufigsten IF sowie Gehaltsangaben in verschiedenen Pflanzenteilen und Lebensmitteln knapp zusammengefasst.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
BiochaninA	H	H	OH	Me	H
Formononetin	H	H	H	Me	H
Daidzein	H	H	H	H	H
Genistein	H	H	OH	H	H
Glycitein	H	OMe	H	H	H
Pratensein	H	H	OH	Me	OH
Pseudobaptigenin	H	H	H	CH ₂ -O -	
Prunetin	Me	H	OH	H	H

Abbildung 2: Substitutionsmuster von verschiedenen Isoflavonen (links), Struktur von Irilon (Mitte) und 17β-Estradiol (rechts).



Über die Exposition des Menschen mit IF gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen mit relativ uneinheitlichen Resultaten. Grundsätzlich lässt

sich festhalten, dass die IF-Aufnahmemengen in Asien bei traditioneller, sojareicher Ernährung sehr viel höher liegen (30-50 mg/Tag) als in Europa oder Amerika (<3 mg/Tag) (Adlercreutz et al., 1993b; Chen et al., 1999; De Kleijn et al., 2001; Clarke and Lloyd, 2004). Über die Aufnahme der typischen Rotklee-IF liegen keine vergleichbaren Daten vor. Da Rotklee nicht als Nahrungsmittel verzehrt wird, findet keine Aufnahme über die normale Nahrung statt.

Tabelle 1: Isoflavongehalte in sojabasierten Lebensmitteln. Gehalte angegeben in mg/kg Lebensmittel (Horn-Ross et al., 2000; USDA, 2002)

	Daidzein	Genistein	Glycitein
Sojabohne	240-600	648-954	79-107
Sojamilch	26-126	52-168	1-16
Tofu	63-106	80-112	12-53
Tempeh	176-405	294-422	21-38

Tabelle 2: Isoflavongehalte in getrockneten Rotkleepflanzenteilen. Formononetin (FORM), BiochaninA (BioA), Irilon (IRI), Daidzein (DAI), Genistein (GEN), Pratensein (PRA), Pseudobaptigenein (PBAP), Prunetin (PRUN). Gehalte angegeben in g/100g Trockenmasse. „G“: Gesamtpflanze; „B“: Blüte; „Bl“: Blatt; „P“: Präparat; „j“: junge Pflanze; „a“: alte Pflanze; „n.b.“: nicht bestimmt; „*“: Gehalt in mg/NEM-Kapsel.

Studie von	Material	FORM	BioA	IRI	DAI	GEN	PRA	PBAP	PRUN
Booth (2006)	G	0,21-0,59	0,07-0,33	n.b.	0,013-0,033	0,014-0,068	n.b.	n.b.	n.b.
	B	0,047-0,12	0,07-0,14	n.b.	0,003-0,008	0,018-0,019	n.b.	n.b.	n.b.
Tsao (2006)	B	0,08	0,09	n.b.	n.b.	0,01	0,02	0,01	0,03
	Bl, j	0,82	0,79	0,002	0,06	0,06	0,08	0,02	0,04
	Bl, a	1,11	1,25	0,01	0,01	0,01	0,08	0,02	0,05
Howes (2002)	P	16,0*	24,5*	n.b.	1,5*	1,5*	n.b.	n.b.	n.b.

IRI, mit seiner toxikologisch interessanten Methylendioxyphenyl-(MDP)-gruppe, hat ein weiteres Hauptvorkommen in Pflanzen der Gattung *Iris*, insbesondere *Iris germanica*. Hier sind neben IRI noch weitere hoch substituierte IF, auch mit MDP-Strukturen, zu finden (Atta Ur et al., 2003; Wollenweber et al., 2003). Das Vorhandensein in diesen Pflanzen hat auch zur Namensgebung von IRI und einigen weiteren IF geführt. Quantitative Angaben zum IF-Gehalt in Pflanzen der Gattung *Iris* fehlen bislang.

In der Pflanze liegen die IF überwiegend als Zuckerkonjugate, zumeist als 6''-O-Malonyl-7-O-β-D-Glucoside oder 7-O-β-D-Glucoside vor (Wiseman et al., 2002). Abhängig von der Verarbeitung findet eine Abspaltung des Zuckerrestes und darüber hinaus eine Verstoffwechslung durch die

Cytochrom-P450-Enzyme der zur Fermentation eingesetzten Mikroorganismen statt (Coward et al., 1993). Im Rotklee kommt es durch noch aktive pflanzeigene Enzyme bereits nach der Ernte schnell zu einer Deglucosilierung (Toebes et al., 2005).

1.3 Bioverfügbarkeit von Isoflavonen

Für eine Beurteilung von bioaktiven Nahrungsbestandteilen ist es von entscheidender Bedeutung, ob und in welchem Ausmaß diese nach Aufnahme vom Körper resorbiert werden. Hierbei müssen die IF aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede einzeln betrachtet werden. Die in NEM auf Sojabasis enthaltenen IF liegen überwiegend in der glucosilierten Form vor. Zur Aufnahme von den Zuckerkonjugaten gibt es bereits vielfältige Daten in der Literatur. Gemäß einer Probandenstudie mit zwölf Teilnehmerinnen von Setchell und Mitarbeitern werden diese Verbindungen nicht unverändert resorbiert. Eine Aufnahme ist nur möglich, wenn zuvor eine Spaltung durch intestinale β -Glucosidasen stattfindet (Setchell et al., 2002b). Rüfer et al. zeigten in einer Humanstudie mit Crossover-Design, dass bei äquimolarer oraler Aufnahme von DAI und DAI-Glucosid in Form der Reinsubstanzen das *O*-Glucosid eine wesentlich höhere Bioverfügbarkeit besitzt (Rüfer et al., 2008). Im Gegensatz dazu haben allerdings Zubik und Meydani in einer amerikanischen Studie keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gesamtaufnahme sowie die Maximalkonzentration im Plasma von 15 Studienteilnehmerinnen zwischen GEN und seinem *O*-Glucosid belegen können (Zubik and Meydani, 2003). Cassidy et. al zeigten in einer Studie im Crossover-Design mit 59 TeilnehmerInnen, dass nach Aufnahme einer einzelnen Portion überwiegend freier IF aus Tempeh ein höherer Plasmaspiegel detektiert wird als nach Aufnahme einer vergleichbaren Menge überwiegend glucosidischem IF aus einer Sojaproteinzubereitung (Cassidy et al., 2006).

Neben diesen Humanstudien existieren Daten zur Verteilung von IF nach oraler Aufnahme bei Ratten. In diesen Tierstudien wurden Konzentrationen an DAI und GEN in verschiedenen Geweben bestimmt, welche die Plasmakonzentrationen um ein Vielfaches übersteigen können (Chang et al., 2000; Coldham and Sauer, 2000; Janning et al., 2000).

Für die Bioverfügbarkeit von Rotklee-IF ist die Datenbasis limitiert. Nur wenige Studien belegen, dass sowohl FORM als auch BioA vom Körper aufgenommen werden und im Urin nachweisbar sind (Heinonen et al., 2004a; Moon et al., 2006). Der bedeutendste Metabolisierungsweg der Rotklee-Haupt-IF verläuft jedoch über die reduktive Demethylierung im Darm (Setchell et al., 2001; Tsunoda et al., 2002). So entstehen DAI aus FORM und GEN aus BioA. Für diese IF liegen aus den Untersuchungen an Soja wie oben dargestellt bereits viele Ergebnisse vor, von einem identischen Verhalten von Soja- und Rotklee-IF kann aber aufgrund des notwendigen vorgeschalteten Demethylierungsschrittes nicht ausgegangen werden. Über die Resorption von IRI sowie den weiteren nur in Rotklee vorkommenden IF gibt es bislang keine Daten.

1.4 Metabolismuswege der Isoflavone

1.4.1 Grundlagen der Biotransformation

Unter dem Begriff Biotransformation sind metabolische Vorgänge zusammengefasst, durch die sowohl vom Körper aufgenommene Fremdstoffe (Xenobiotika) als auch im Körper selbst gebildete Stoffwechselprodukte (Endobiotika) chemisch transformiert werden können. Im Gegensatz zum Katabolismus dient die Biotransformation nicht dem Energiegewinn oder dem Aufbau körpereigener Bausteine (Anabolismus). Vielmehr ist diese Metabolisierung notwendig, da viele der Xeno- und Endobiotika hydrophob sind und somit passiv durch die Zellmembranen diffundieren können. So können sie vom Körper nicht ohne Weiteres eliminiert werden. Erst die Transformation in polarere Produkte ermöglicht eine Ausscheidung über Galle und Urin. Nur so kann

eine Akkumulation von potenziell toxischen Substanzen vermieden werden. Man bezeichnet diesen Vorgang in diesem Zusammenhang auch als Entgiftung. Da die Biotransformation auf Enzymen mit relativ geringer Substratspezifität basiert, kommt es aber auch vor, dass erst durch die Umwandlung aktive bzw. verstärkt aktive Metabolite gebildet werden. Man spricht dann von einer Bioaktivierung.

Hohe Stoffwechselaktivität liegt für den oxidativen Phase-I-Metabolismus vor allem in der Leber vor, für den konjugativen Phase-II-Metabolismus ist daneben in erster Linie auch das Darmgewebe von Bedeutung.

1.4.2 *In vitro* Modelle zur Untersuchung von metabolischen Umsetzungen

Zur *in vitro* Untersuchung des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus sind zwei Modelle etabliert, die gleichermaßen auf der Inkubation von dem zu testenden Substrat mit Zellhomogenat (Mikrosomen) bzw. kompletten Zellverbänden (Präzisionsgewebeschnitte) von Geweben hoher Stoffwechselaktivität beruhen. Mikrosomen (MIKs) sind kleine Vesikel bestehend aus zusammengelagerten Membranfragmenten des endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese Vesikel bilden sich bei der Homogenisierung von Zellen und können durch Ultrazentrifugation gewonnen werden. Im ER und somit in den MIKs sind verschiedene Enzyme des Fremdstoffmetabolismus lokalisiert. Von besonderer Bedeutung sind die im Phase-I-Metabolismus wichtigen Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen (CYPs) sowie ihre Reduktasen. Auch die Glucuronyltransferasen (UGTs) liegen als membrangebundene Enzyme in den MIKs vor. Beide Enzymsysteme sind nur membrangebunden funktionsfähig. Da MIKs nur Zellfragmente sind, müssen die jeweils benötigten Cosubstrate zugegeben werden. CYPs benötigen als Cosubstrat reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Die UGTs sind auf aktivierte Glucuronsäure, Uridindiphospho- β -glucuronsäure (UDPGA), angewiesen.

Zusätzlich finden sogenannte induzierte MIKs in der Untersuchung des Phase-I-Metabolismus Verwendung. Die Tiere, aus deren Gewebe diese MIKs gewonnen werden sollen, werden unterschiedlichen Substanzen ausgesetzt, zumeist durch intraperitoneale Verabreichung, welche die vermehrte Bildung bestimmter CYP-Enzyme im Gewebe induzieren. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten induzierten MIKs wurde durch eine Behandlung mit Aroclor[®] eine erhöhte Bildung vor allem an CYP 1A1 und 2B1 in den Lebern der Ratten bewirkt (Meredith et al., 2003).

Supersomen[®] sind MIKs aus transfizierten Insektenzellen, die jeweils nur eine Isoform der UGTs enthalten. Die Anwendung von Supersomen[®] ermöglicht es, die Aktivität der unterschiedlichen UGTs für ein Substrat im Einzelnen zu bestimmen.

Präzisionsgewebeschnitte sind ein Anfang der 80er Jahre entwickeltes *in vitro* Modell für Toxikologie- und Biotransformationsstudien. Bei den Umsetzungen mit Gewebeschnitten werden die verschiedenartigen Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband belassen, so dass dieses System eine Möglichkeit bietet, der *in vivo*-Situation näher zu kommen.

1.4.3 Phase-I-Metabolismus

Der Phase-I-Metabolismus hat die Hauptaufgabe, hydrophobe Moleküle durch Einführen oder Freilegen von polaren funktionellen Gruppen für den anschließenden konjugativen Phase-II-Metabolismus zugänglich zu machen. Dies geschieht überwiegend durch Hydroxylierungen oder Desalkylierungen sowie z.B. durch Epoxidierung oder Hydrolyse, wobei nur die beiden erstgenannten Reaktionen für IF von Bedeutung sind. Verantwortlich für diese Umsetzungen sind die CYPs, die eine große Familie mit einer Vielzahl von wichtigen Enzymen darstellen. CYPs liegen im ER membrangebunden vor, wobei ihre prosthetische Hämgruppe über das Eisenmolekül an ein Cysteinmolekül des Apoproteins koordiniert ist und in das Cytoplasma ragt. Benachbart dazu findet sich das Flavoprotein Cytochrom-P450-Reduktase, mit dem die CYP-Enzyme einen Multienzymkomplex bilden (Kitteringham et al., 1998). Derzeit sind in

prokaryotischen und eukaryotischen Organismen über 400 verschiedene CYP-Enzyme beschrieben worden, deren Einteilung in Familien aufgrund des Homologiegrades der Aminosäuresequenz erfolgt. Insgesamt setzen sich die Enzyme aus 480 bis 560 Aminosäuren zusammen.

Die Nomenklatur beschreibt ein Enzym mit der Bezeichnung CYP und einem anschließenden Code der Struktur *Ziffer-Buchstabe-Ziffer*. Die erste Ziffer beschreibt die Zugehörigkeit zu einer Enzymgroßfamilie, innerhalb derer die Aminosäuresequenzen zu mehr als 40% homolog sind. Der Buchstabe indiziert die Zugehörigkeit zu einer Familie, innerhalb derer die Sequenzhomologie mindestens 55% betragen muss. Die letzte Ziffer dient der Kennzeichnung des einzelnen Enzyms. Xenobiotika werden überwiegend von den Enzymen der Großfamilien 1 bis 3 metabolisiert. Im menschlichen Organismus konnten bislang 58 CYP-Enzyme identifiziert werden, von denen ca. 20 Xenobiotika-metabolisierende Funktionen erfüllen. Die wichtigsten hepatischen Enzyme sind dabei CYP 2A6, CYP 2C9, CYP 2D6, CYP 2E1 und CYP 3A4, extrahepatisch sind CYP 1A1, CYP 2C9, CYP 2E1 und CYP 3A4 von besonderer Bedeutung (Kitteringham et al., 1998). Tabelle 3 zeigt die durchschnittlichen Anteile der Enzyme am Gesamt-CYP-Gehalt in menschlicher Leber und in Rattenleber.

Tabelle 3: Cytochrom-P450-Gehalte in Human- und Rattenleber nach Yan und Caldwell sowie Vermeulen (Vermeulen, 1996; Yan and Caldwell, 2001).

Isoenzym	Anteil am Gesamt-CYP-Gehalt
Leber Mensch	
CYP 1A2	12,7 ± 6,2%
CYP 2A6	4,0 ± 3,2%
CYP 2B6	0,2 ± 0,3%
CYP 2C8, 2C9, 2C18, 2C19	18,2 ± 6,7%
CYP 2D6	1,5 ± 1,3%
CYP 2E1	6,6 ± 2,9%
CYP 3A4, 3A5, 3A7	28,8 ± 10,4%
Leber Ratte	
CYP 1A1, 1A2	1,2%
CYP 2A1, 2A2	5,4%
CYP 2B1, 2B2	1,9%
CYP 2C6, 2C11, 2C12, 2C13	65,0%
CYP 2E1	7,9%
CYP 3A2	14,6%
CYP 4A1, 4A2	3,0%

Hierbei ist zu beachten, dass es teilweise erhebliche interindividuelle Unterschiede gibt, die durch genetischen Polymorphismus determiniert sind. Als Konsequenz können sich stark differierende Metabolisierungsleistungen ergeben (Shimada et al., 1994).

Neben dem häufig notwendigen Einfügen von Ankergruppen in hydrophobe Xenobiotika sind in einigen Fällen die Produkte des Phase-I-Metabolismus in ihrer Toxizität weit problematischer als die Ausgangsverbindungen. Ein gutes Beispiel hierfür sind die chemisch nahezu inerten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die durch Hydroxylierung in weit reaktivere Verbindungen überführt werden. Bei der Hydroxylierung von IF entstehen überwiegend catecholische Metabolite, da CYPs vorzugsweise in ortho- und para-Position zu bereits vorhandenen Hydroxyfunktionen eine weitere einführen. Diese Catechole können über die Oxidation zu Semichinonen sowie Chinonen und anschließendem „Redox-Cycling“ reaktive Sauerstoffspezies bilden (Kulling et al., 2000).

Detaillierte Informationen zu den CYP-Enzymen und ihrer Verwendung in *in vitro* Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gibt Abschnitt 2.2.

1.4.4 Phase-II-Metabolismus

Für Xenobiotika, die im Phase-I-Metabolismus für eine Konjugation zugänglich gemacht wurden sowie für solche Substanzen, die naturgemäß z.B. eine oder mehrere Hydroxy- oder Aminogruppen tragen, stellt der Phase-II-Metabolismus den wichtigsten Eliminierungsweg dar. Überwiegend erfolgt in diesem Metabolisierungsschritt eine Konjugation mit polaren Verbindungen wie aktivierter Glucuronsäure oder Schwefelsäure sowie Glutathion, um die Hydrophilie der Fremdstoffe zu erhöhen. Daneben finden auch Konjugationen mit Acetylgruppen sowie in weit geringerem Maße mit Aminosäuren und Methylgruppen statt. Hauptmetabolisierungsorte sind dabei die Leber sowie das Dünndarmgewebe, in welchem die für die beiden erstgenannten Stoffwechselschritte verantwortlichen Sulfotransferasen und Uridindiphosphoglucuronyltransferasen (UGTs) lokalisiert sind.

Im Phase-II-Metabolismus kann für alle IF eine intensive Glucuronidierung, auch ohne vorangegangene Phase-I-Reaktionen, beobachtet werden. Dabei steht die Bildung von Monoglucuroniden im Vordergrund. So zeigten Untersuchungen mit DAI, dass nach Ausscheidung im Urin über 80% der IF als Monoglucuronide und gut 10% als Sulfoglucuronide vorliegen. Diglucuronide, Mono- und Disulfate sowie die unkonjugierte Form waren mit jeweils weniger als 3% kaum von Bedeutung. Für GEN liegt der Anteil des Diglucuronids mit 10% etwas höher (Adlercreutz et al., 1995b). Jia und Mitarbeiter haben die Verstoffwechslung von FORM und BioA *in vitro* und *in vivo* durch Sprague-Dawley-Ratten untersucht (Jia et al., 2004). Dabei konnte festgestellt werden, dass beide IF nach Resorption schnell glucuronidiert werden, wobei die maximale Umsetzung von FORM im Perfusionsmodell bei alleiniger Gabe noch höher ist. Bei gleichzeitiger Zufuhr von FORM und BioA kehrt sich dieses Bild allerdings um, und die Ausscheidung von BioA Konjugaten überwiegt. In *in vitro* Studien mit Darm- und Leber-MIKs konnte gezeigt werden, dass die Umsetzungsraten im Darmgewebe höher sind als in der Leber. Die höchste Umsatzgeschwindigkeit wurde für MIKs beobachtet, die aus dem Jejunum gewonnen wurden.

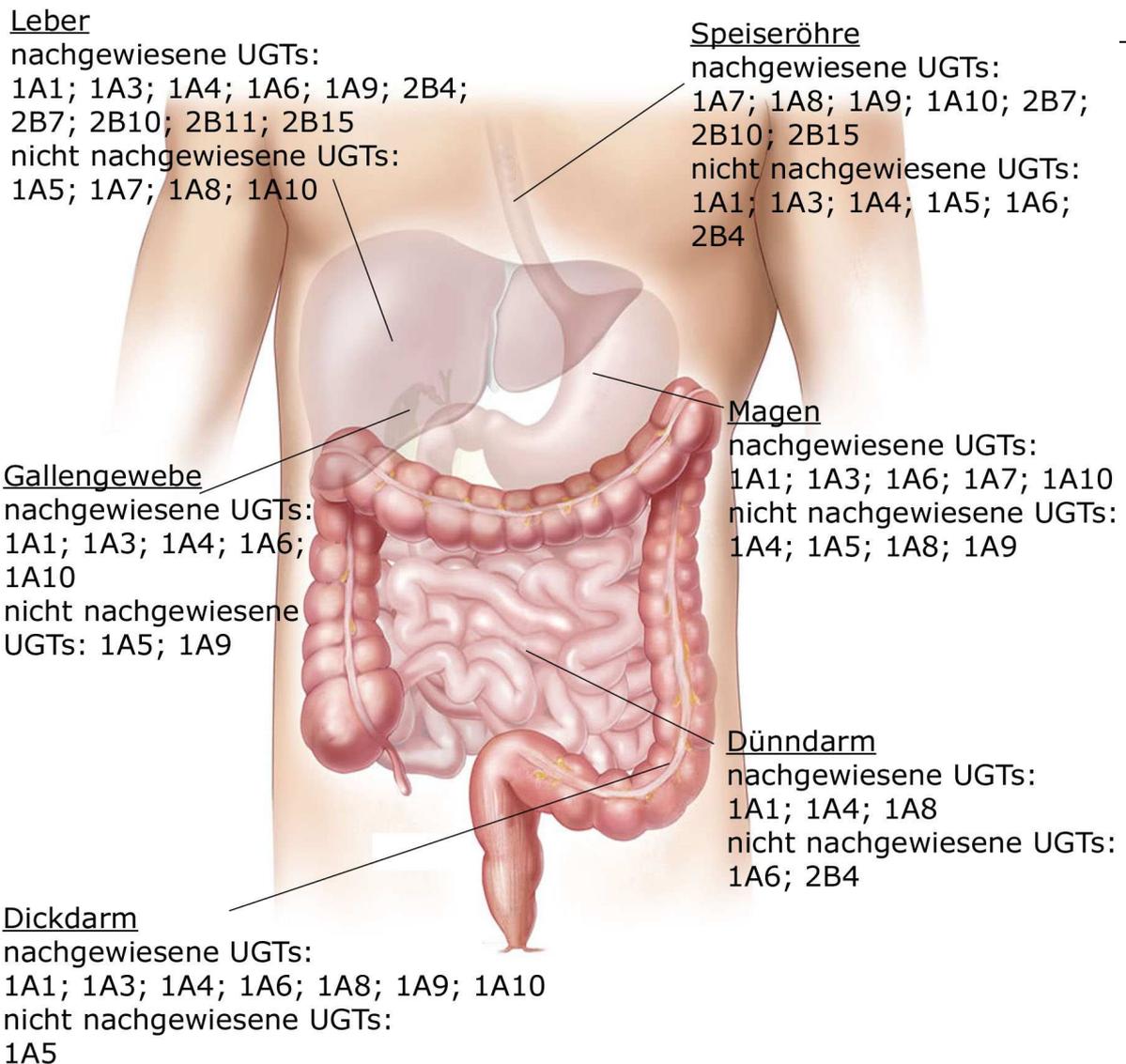


Abbildung 3: Darstellung des Gastrointestinaltraktes und der Gewebe, in denen verschiedene UGTs exprimiert werden. Die Angaben beziehen sich überwiegend auf Daten aus Klonierungsexperimenten der cDNA in den Geweben bzw. Gentranskriptionsraten mittels Real-time-PCR. (Tukey and Strassburg, 2000)

Detaillierte Informationen zu den UGT-Enzymen und ihrer Verwendung in *in vitro* Untersuchungen gibt Kapitel 2.3.

Um Voraussagen über den Ort eines möglichen konjugativen Phase-II-Metabolismus treffen zu können, ist es zunächst notwendig, die an der Umsetzung beteiligten Enzyme zu identifizieren, da die verschiedenen UGTs in Geweben und Organen unterschiedlich stark exprimiert werden. Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die Verteilung der UGT-Expression im menschlichen Körper (Tukey and Strassburg, 2000), die allerdings nur die Ergebnisse vieler Einzeluntersuchungen zusammenfasst und nicht als abschließend zu betrachten ist. Für das IF

GEN ist beispielsweise eine starke Konjugation bereits im Intestinaltrakt nach Infusion im Dünndarm beschrieben, die auf die dort gebildeten UGTs zurückzuführen ist (Sfakianos et al., 1997).

Generell sind die Enzyme der UGT-Familien in der Lage, die Glucuronidierung vieler Substrate unterschiedlichster Verbindungsklassen zu katalysieren. Die UGT 1A-Familie zeigt eine breite Substratspezifität (King et al., 2000). Das Isoenzym UGT 1A1 z.B. katalysiert Glucuronidierungen von Bilirubin, Estrogenen, Cumarin, Flavonoiden und Opioiden. Senafi et al. untersuchten über 100 verschiedene Substrate und fanden heraus, dass neben 17β -Estradiol auch verschiedene Flavone von UGT 1A1 glucuronidiert werden (Senafi et al., 1994). Im Zusammenhang mit dieser *in vitro* Studie sind besonders die Flavone von Interesse. Doerge et al. zeigten, dass IF von verschiedenen Enzymen der UGT 1A-Familie glucuronidiert werden (Doerge et al., 2000). Je nach Struktur der einzelnen Verbindungen, das heißt nach Anzahl der funktionellen Gruppen, können auch mehrere Glucuronide gebildet werden. Das in dieser Arbeit untersuchte IRI enthält zwei Hydroxygruppen (Abbildung 2). Es könnte also in C-4'-Position und/oder in C-5-Position glucuronidiert werden. Für die Beantwortung einer solchen Fragestellung wird in der Regel ein Screening mit den in Frage kommenden UGT-Enzymen durchgeführt (Ghosal et al., 2004a). Für IF sind vor allem die Enzyme der UGT 1A-Familie relevant, die ein breites Substratspektrum haben und der Literatur entsprechend IF gut glucuronidieren sollten (King et al., 2000). Green und Tephly beschreiben, dass hauptsächlich Steroide von der UGT 2B-Familie glucuronidiert werden (Green and Tephly, 1998). UGT 2B15 wird zusätzlich eine hohe Aktivität und Effizienz im Bezug auf die Glucuronidierung von Flavonoiden zugeschrieben und kann für IF ebenso von Bedeutung seien.

Von besonderer Wichtigkeit im Zusammenhang mit dem IF-Metabolismus ist noch die Catechol-O-methyltransferase (COMT), welche für die Konjugation endogener Catechole zuständig sind. Zu finden ist die COMT in fast allen menschlichen Geweben, und liegt dort sowohl z.T.

membrangebunden, aber auch frei, zumeist nahe den sympathischen Nervenenden, vor (Lundstroem et al., 1995).

Im Allgemeinen sind catecholische Verbindungen in der Lage über die Stufe der Semichinone zu ortho-Chinonen zu reagieren. Sie stellen somit Ausgangspunkte bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies dar. Die COMT hat die Funktion, Catechole zu methylieren und so diese Möglichkeit der Bildung von reaktivem Sauerstoff indirekt zu inaktivieren. Für das Flavonoid Quercetin konnte diese Umsetzung mit einer hohen enzymatischen Aktivität von Zhu et al. an Hamstern *in vivo* bei intraperitonealer Gabe gezeigt werden (Zhu et al., 1994).

1.4.5 Mikrobieller intestinaler Metabolismus

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die humane Mikrobiota einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Xenobiotika hat. Für verschiedene glycosilierte Flavonoide wird die schnelle und vollständige Zuckerabspaltung durch die Mikrobiota beschrieben (Bokkenheuser and Winter, 1988; Coldham et al., 2002). Darüber hinaus ist für DAI und GEN aus einer *in vivo* Studie bekannt, dass sie in hohem Maße reaktiv verstoffwechselt werden, da entsprechende Metabolite im Urin gefunden wurden. Im ersten Schritt erfolgt dabei eine Reduktion der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3 zu den entsprechenden Isoflavanonen (Joannou et al., 1995). Die weitere Metabolisierung verläuft für DAI zu *O*-Desmethylangolensin (*O*-DMA) und teilweise zu S-Equol, während GEN vornehmlich über Dihydro-GEN zu 6'-Hydroxy-*O*-DMA und als Endprodukt 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure konvertiert wird (Chang and Nair, 1995; Coldham et al., 2002; Setchell et al., 2005). Dabei sind allerdings große interindividuelle Unterschiede festzustellen. So besitzen etwa 80-90% der Menschen eine intestinale Darmflora, welche die Fähigkeit besitzt, DAI zu *O*-DMA umzuwandeln – zur Metabolisierung zu Equol sind nur 30-50% fähig (Atkinson et al., 2005). Für GLYC als methoxyliertes IF lässt sich eine intensive reduktive Umsetzung zu dem Demethylierungsprodukt (6-Hydroxy-DAI) als Hauptmetabolit feststellen.

Weiterhin sind die 6-Hydroxy-analogen Verbindungen zum DAI-Metabolismus (6-Hydroxy-Dihydrodaidzein, 6-Hydroxy-O-DMA und 6-Hydroxy-Equol) detektierbar (Rüfer et al., 2007). Obwohl diese Umsetzung im Dickdarm erfolgt, findet noch eine Resorption von relevanten Mengen der reduktiven Metabolite statt. So konnten von Heinonen und Mitarbeitern nach Aufnahme von Rotklee-basierten NEM die Dihydroverbindungen der Haupt-IF im Urin von Probanden nachgewiesen werden (Heinonen et al., 2004a). Insgesamt ist die Datenbasis zum reduktiven Metabolismus von Rotklee-IF aber dünn, und Erkenntnisse zur Toxizität der Metabolite fehlen ganz.

Untersuchungen an Dihydrodaidzein (DHD) und Equol haben ergeben, dass das estrogene Potenzial von Equol um ein Vielfaches höher ist als das von DAI (Setchell et al., 2002a; Lehmann et al., 2005; Hwang et al., 2006). Somit ist der reduktive Metabolismus von Bedeutung bei der Bewertung der Bioaktivität von Rotklee-basierten NEM.

1.4.6 Inhibition und Induktion

Für die Bewertung bioaktiver Nahrungsbestandteile sind zusätzlich zu der Identifizierung der entstehenden Metaboliten weitere teils mittelbare Einflüsse auf den Metabolismus zu berücksichtigen. Vor allem Xenobiotika sind nicht selten in der Lage, CYP-Enzyme entweder zu hemmen (Inhibition) oder ihre Expressierung auszulösen (Induktion).

Der Begriff der **Inhibition** beschreibt die Hemmung eines Enzyms durch eine Substanz, wobei zwischen reversibler und irreversibler Hemmung und dementsprechend unterschiedlichen Mechanismen unterschieden werden kann.

Da CYPs eine relativ breite Substratspezifität aufweisen, bewirkt eine Inhibition bei gleichzeitigem Vorhandensein von weiteren Xenobiotika als Substrat eine Verlangsamung der Eliminierung dieser anderen Substanzen (*drug-drug-interaction*), die zu einer Wirkungsverlängerung oder -verstärkung führen kann. Im Falle von Substanzen, die erst durch Biotransformation in aktive Verbindungen umgewandelt werden

(sogenannte *prodrugs*), kommt es dagegen zu einer Verhinderung oder Verzögerung der Wirkung.

Größte Bedeutung besitzt die reversible Hemmung (kompetitiver Antagonismus), bei welcher der Inhibitor die Bindungsstelle des Enzyms besetzt. Ein Substrat mit erhöhter Affinität zum Enzym kann so die Metabolisierung einer anderen Substanz inhibieren. Es handelt sich bei der reversiblen Inhibition somit um eine Konkurrenzreaktion der Substratmoleküle um die freien Bindungsstellen der Enzyme.

Eine andere Form der reversiblen Hemmung von CYP-Enzymen, die nichtkompetitive Inhibition, resultiert, wenn der Inhibitor direkt an das Eisenatom der Häm-Gruppe bindet (Ligandenbindung).

Bei der irreversiblen Hemmung oder „Suizidhemmung“ wird das Enzym dauerhaft inhibiert, indem es mit dem bei der Reaktion entstandenen Metaboliten einen stabilen Komplex, den Metabolit-Intermediat-Komplex (MI-Komplex) bildet, der nach Abschluss der Reaktion nicht in Enzym und Produkt zerfallen kann (Abbildung 4). Demnach stellt der Metabolit den eigentlichen Inhibitor dar. Bei *in vitro* Versuchen kann dieser Komplex gegebenenfalls durch Zugabe einer sehr lipophilen Substanz mit noch höherer Affinität zur Bindungsstelle des Enzyms, einem sogenannten **Displacer**, unter Wiederherstellung der Enzymfunktion gelöst werden (Ullrich and Schnabel, 1973). Das MI soll auf diese Weise vom aktiven Zentrum verdrängt werden. Dickens et al. untersuchten diverse Substrate bzw. Stoffklassen auf ihre Eignung als Displacer, u.a. Carbonsäuren, Alkohole, n-Alkylbenzimidazole und n-Alkylcarbamate in Inkubationen mit MIKs. In den Gruppen der Carbonsäuren, Alkohole und Carbamate zeigten die Vertreter mit zehn Kohlenstoffatomen die beste Displacementwirkung, wobei diese unabhängig von der jeweiligen funktionellen Gruppe auftritt. *In vivo* sind derartige Displacements nicht möglich (Dickins et al., 1979).

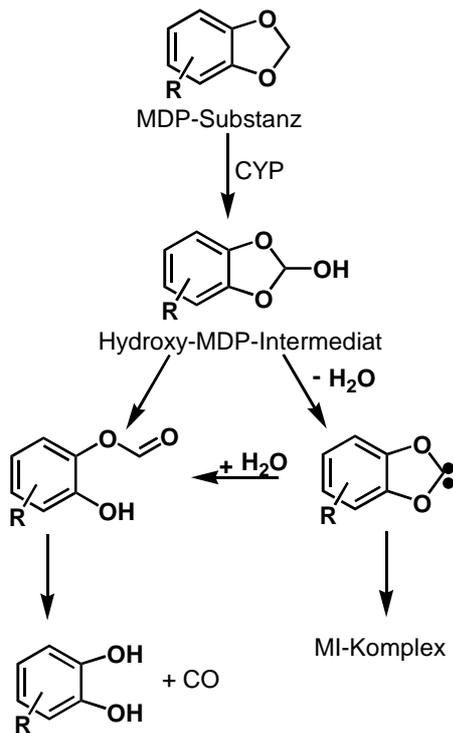


Abbildung 4: Postulierte Bildung von Metabolit-Intermediat (MI)-Komplexen durch Reaktion von Methylenedioxyphenyl (MDP)-Substanzen mit CYPs nach Murray (Murray, 2000).

Es ist von zahlreichen Substanzen, die eine MDP-Struktur aufweisen bekannt, dass sie CYPs irreversibel hemmen können. Es wird dabei angenommen, dass es sich bei dem reaktiven Metaboliten um ein reaktives Carben handelt, das durch Oxidation und anschließende Abspaltung von Wasser entsteht (Murray, 2000) (Abbildung 4). Kommt es nicht zur Abspaltung des Wassers, kann durch Abspaltung von Kohlenstoffmonoxid ein catecholischer Metabolit entstehen (Yu et al., 1980).

Auch für IF ist von inhibierenden Effekten, insbesondere auf die extrahepatischen Enzyme CYP 1A1 und CYP 1B1, berichtet worden (Chan and Leung, 2003; Roberts et al., 2004).

Der Begriff der **Induktion** beschreibt eine vermehrte Neubildung von Enzymen, hervorgerufen durch ein- oder mehrmalige Gabe der induzierenden Substanz. Damit einher geht eine Steigerung der Umsatzleistung dieser Enzyme. Die meisten CYPs können durch mehrere Xenobiotika induziert werden, wobei häufig der Induktor selbst auch ein Substrat des induzierten Enzyms darstellt.

Wegen der geringen Substratspezifität der CYPs kann die Induktion durch eine Substanz die Metabolisierungsrate zahlreicher anderer Substanzen erhöhen und damit die Wirkung dieser Substanzen auf den Organismus verändern. Dadurch kann es beispielsweise bei gleichzeitiger Einnahme von Medikamenten vorkommen, dass die Induktion des CYP-Gehaltes durch ein Medikament die Wirkung anderer Medikamente stark einschränkt oder sogar ganz aufhebt.

Es werden Induktoren vom Phenobarbital-Typ und vom Methylcholanthren-Typ unterschieden, die jeweils ein weitgehend ähnliches Spektrum an CYP-Enzymen induzieren (Oberdisse, 2001).

Der Mechanismus der Induktion durch Substanzen des Methylcholanthren-Typs ist weitestgehend bekannt. Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, ein im Cytosol vorliegendes Protein, kann als Transkriptionsfaktor beispielsweise für CYP 1A1 agieren, indem er die induzierende Substanz als Ligand bindet und daraufhin mit dem Protein „*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*“ heterodimerisiert. Dieses Heterodimer interagiert mit entsprechenden Enhancer-Elementen der Desoxyribonukleinsäure (DNA), wodurch die Transkription des Enzyms verstärkt wird (Denison et al., 1988). Die Induktion kann dabei innerhalb weniger Stunden erfolgen.

Ein weitgehend analoger Mechanismus wird für die Induktion durch Substanzen vom Phenobarbital-Typ vermutet, allerdings unter Beteiligung anderer Rezeptoren. Bei der Induktion der CYP 3A4-Transkription beispielsweise wurde der Pregnan-X-Rezeptor als Transkriptionsfaktor nachgewiesen, bei der Induktion von CYP 2B6 der „*Constitutive androstane receptor*“ (Kliwer, 2003). Die Induktion durch Substanzen des Phenobarbital-Typs läuft relativ langsam ab. In Abhängigkeit der induzierenden Substanz kann es bis zu einer Woche dauern, bis eine Zunahme des Enzymgehaltes zu beobachten ist. Parallel mit dem Anstieg des CYP-Gehaltes ist bei Induktionen vom Phenobarbital-Typ ein Wachstumszuwachs der Leber und des glatten ER zu beobachten (Yan and Caldwell, 2001).

Es ist von mehreren MDP-Substanzen bekannt, dass sie induzierende Wirkung entfalten. Das Spektrum der so induzierten CYPs entspricht dem durch Induktoren des Phenobarbital-Typs hervorgerufenen Muster (Murray, 2006). Insbesondere für CYP 1A1 konnte an Mäusen gezeigt werden, dass dieses Enzym, das verstärkt auf eine spezifische Anregung hin gebildet wird, von MDP-Substanzen wie Safrol, Isosafrol und Piperonylbutoxide induziert wird. Meßgröße war in diesem Falle die mRNA, eine Verstärkung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität als Maß für

die CYP-Aktivität wurde nicht gefunden (Lewandowski et al., 1990; Adams et al., 1993). Für IF wurde bislang noch keine Induktion von CYPs beschrieben – die IF mit MDP-Struktur wurden daraufhin allerdings auch noch nicht untersucht.

Zusammenfassend ist zu den inhibitorischen und induktiven Effekten von Lebensmittelinhaltsstoffen festzustellen, dass diese nie eindeutig als ausschließlich gesundheitsförderlich oder -schädlich einzuordnen sind. Eine verstärkte Bildung der CYPs 1A1 oder 1A2 ist nicht wünschenswert, da sie zur Giftung von beispielsweise Benz[a]pyren führt. Andererseits ist auch eine völlige Inhibition dieser Enzyme nicht positiv, da sie notwendiger Teil des Metabolismus von Xenobiotika sind.

Bei der Untersuchung von metabolischen Umsetzungen werden die erhaltenen Analysendaten im Regelfall abschließend anhand kinetischer Modelle ausgewertet und entsprechend des jeweiligen kinetischen Profils mathematisch angepasst. Bei aktivierten und inhibierten kinetischen Reaktionsverläufen ist eine Anpassung nach dem klassischen Michaelis-Menten-Modell nicht durchführbar bzw. führt zu falsch abgeleiteten enzymkinetischen Parametern und der daraus resultierenden Clearance, welche die katalytische Effizienz wiedergibt. Eine detaillierte methodische Beschreibung der angewendeten Auswerteverfahren ist in Kapitel 2.2.4 zu finden.

1.5 Physiologische Effekte von Isoflavonen

In diesem Abschnitt werden in knapper Form die verschiedenen diskutierten physiologischen Wirkungen von IF dargestellt. Diese Effekte werden überwiegend auf eine schwach estrogenen Wirkung der IF zurückgeführt (Morito et al., 2002; Kinjo et al., 2004). Auslöser für detaillierte Untersuchungen waren epidemiologische Studien, die eine Korrelation zwischen der IF-reichen Ernährung asiatischer Frauen und der verminderten Inzidenz hormonabhängiger Krebsarten und menopausaler Beschwerden zeigen konnten (Adlercreutz et al., 1995a).

1.5.1 Menopausale Beschwerden

Während der Menopause treten bei Frauen aufgrund des sich verändernden Hormonspiegels eine Reihe von charakteristischen gesundheitlichen Beschwerden auf. Dazu zählen insbesondere Hitzewallungen und nächtliche Schweißausbrüche, deren Auftreten traditionell durch eine Hormonersatztherapie gemildert wird. Aufgrund der mit dieser Therapieform in Verbindung stehenden Sorge des Auftretens chronischer Krankheiten, sind pflanzliche Alternativen, wie z.B. die Einnahme von IF-Präparaten, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. In erster Linie wird die Linderung von menopausalen Beschwerden durch IF-haltige NEM auf die Fähigkeit der IF, mit den beiden Estrogenrezeptoren (ER α und ER β) interagieren zu können, zurückgeführt. In Rezeptorbindungsstudien wurde für die meisten IF gezeigt, dass ihre Affinität zum Rezeptor etwa um den Faktor 100 bis 1000 unter der Affinität der 17 β -Estradiols liegt (Kuiper et al., 1998; Morito et al., 2002; Kinjo et al., 2004). Zurückgeführt wird die Affinität darauf, dass die beiden aromatischen Hydroxyfunktionen an C-4' und C-7 voneinander einen fast identischen Abstand aufweisen, wie die beiden Hydroxy-Gruppen von 17 β -Estradiol (Setchell and Cassidy, 1999). Die Wirksamkeit der tatsächlichen Milderung menopausaler Beschwerden ist jedoch fraglich. Lethaby et al. können in einer umfassenden Metaanalyse keine Signifikanz hierfür finden, zumal viele der betrachteten Studien methodische Schwächen zeigen und darüber hinaus ein sehr starker Placeboeffekt zu beobachten ist (Lethaby et al., 2007).

1.5.2 Osteoporose

Der Einfluss von IF auf die Entstehung von Osteoporose, die bei Frauen unter anderem durch das Absinken des Estrogenspiegels nach der Menopause verstärkt wird, wurde *in vitro* von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, allerdings ohne dass sie zu einem gesicherten Ergebnis gelangt sind.

Aus einer von Weaver und Cheong erstellten Übersicht geht hervor, dass die Datenlage vor allem im Bezug auf den Menschen uneindeutig ist (Weaver and Cheong, 2005). In dieser Studie werden sowohl Supplementierungen mit Soja- wie auch Rotklee-IF einbezogen.

Eine aktuelle Metaanalyse von Ma et al. findet anhand von elf betrachteten Studien, die ausschließlich die Effekte von Soja-IF untersuchen, eine signifikante positive Wirkung einer (post)menopausalen IF-Supplementierung (Ma et al., 2008). Sie beziehen sich dabei auf die Knochendichte der Wirbelsäule, die besonders durch hohe IF-Zufuhr von über 90 mg/Tag leicht erhöht werden kann. Unklar bleibt der Einfluss der Dauer der IF-Aufnahme. In den vier Studien, die über 12 oder mehr Monate durchgeführt wurden, sind die Effekte nicht mehr signifikant, während in fünf Studien kürzerer Dauer eine Signifikanz vorliegt. Ma et al. sehen die Aussagekraft der Langzeitstudien zwar als zu gering an, da die vier Studien eine zu geringe Zahl darstellen, allerdings ist die Gesamtzahl der untersuchten einzelnen Individuen hier sogar höher.

Noch aktueller finden Brink et al. in einer Studie mit 237 Frauen in der frühen Postmenopause erneut keinen positiven Effekt auf die Knochendichte der Lendenwirbelsäule sowie die Gesamtknochendichte bei der täglichen Aufnahme von 110 mg IF über einen Zeitraum von einem Jahr (Brink et al., 2008). Anhand dieser beiden Metaanalysen, die zu verschiedenen Ergebnissen kommen, wird deutlich, wie komplex die Fragestellung der Wirksamkeit von IF-Präparaten ist. Sowohl die Auswahl der NEM, mit denen die Studien durchgeführt wurden, als auch das Probandenkollektiv (Lebensphase, Ethnie oder metabolische Prädisposition) haben entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis.

In einer tierexperimentellen Studie mit Ratten, denen die Ovarien entfernt wurden, so dass sie kein endogenes Estradiol mehr bilden können, wurde speziell der Einfluss von Rotklee-IF untersucht. Occhiuto et al. stellten fest, dass eine Supplementierung mit Rotklee-IF zu einer Verbesserung der Knochenhärte und -dichte, verglichen mit den Tieren, die weder Estrogen noch IF erhielten, führt (Occhiuto et al., 2007).

1.5.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Im Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen wurde die Beeinflussung des Cholesterinspiegels durch IF untersucht. Dabei wurde in einigen Fällen die Senkung von LDL-Cholesterin beobachtet (Uesugi et al., 2002; Nestel et al., 2004), andere placebokontrollierte Studien z.B. von Howes et al. oder Cancellieri et al. ergaben keine signifikanten Auswirkungen von IF auf die Lipide im Blutplasma (Howes et al., 2000; Cancellieri et al., 2007). Bei den vier hier herausgegriffenen Studien konnte jeweils sowohl für Soja als auch für Rotklee-IF einmal die positive Wirkung wie auch eine Wirkungslosigkeit für vergleichbare Aufnahmemengen an IF gezeigt werden. Basierend auf der Vielzahl dieser teils widersprüchlichen Studien wurden einige Metaanalysen angefertigt, die diese Daten kritisch bewerten. In einer Analyse von elf Studien kommen Taku et al. ungeachtet deutlicher Schwankungen für die Aufnahme von Soja-IF zusammenfassend zu dem Ergebnis, dass der Plasma-LDL-Spiegel leicht aber signifikant reduziert werden kann und der HDL-Spiegel konstant bleibt (Taku et al., 2007). Bei Individuen mit hohem Cholesterinspiegel ist der LDL-senkende Effekt stärker ausgeprägt als bei Vorliegen eines normalen Cholesterinspiegels. Ferner kann sowohl für Sojaprotein wie auch für IF ein solcher Effekt belegt werden. Insgesamt bewegt sich die Absenkung des Plasma-LDL durch Sojabestandteile aber nur in einem Bereich von etwa 5% verglichen mit der Ausgangskonzentration. In einer weiteren Metaanalyse von Sacks et al. wird differenzierter untersucht, ob Einflüsse der Sojaaufnahme auf Plasma-LDL, HDL- oder Triglycerid-Spiegel zu beobachten sind, und inwiefern sie auf das Sojaprotein oder die Soja-IF zurückzuführen sind (Sacks et al., 2006). Dabei stellen die Autoren heraus, dass lediglich eine schwache aber signifikante Senkung des Plasma-LDL-Spiegel durch Sojaaufnahme vorliegt. Diese ist vorzugsweise durch die Aufnahme von großen Mengen Sojaprotein zu erreichen. Soja-IF haben dem gegenüber keinen signifikanten Effekt. Frühere Untersuchungen der physiologischen Wirkungen einer gesteigerten Sojaproteinaufnahme haben bereits im

Oktober 1999 dazu geführt, dass von der US-amerikanischen Behörde FDA ein „Soy Health Claim“ formuliert wurde. Dieser erlaubt Nahrungsmittelherstellern ihre sojahaltigen Produkte mit dem Verweis darauf zu bewerben, dass eine Ernährung, arm an gesättigtem Fett und Cholesterin, welche die Aufnahme von 25 g Sojaprotein pro Tag beinhaltet, geeignet ist die Gefahr von Herzerkrankungen zu senken. Inzwischen ist die Haltbarkeit dieser Empfehlung aufgrund neuerer Studien, in denen die geringe Signifikanz der beobachteten positiven Effekte gezeigt wird jedoch umstritten (Sacks et al., 2006).

In vitro konnten Feretti und Mitarbeiter zeigen, dass GEN in der Lage ist, die Cu^{2+} induzierte Oxidation von HDL zu verringern (Ferretti et al., 2004). Da dieser Effekt bereits ab einer auch *in vivo* erreichbaren Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ eintritt, vermuten sie auch *in vivo* protektive Effekte. Da *in vivo* aber wie bereits erwähnt nur ein geringer Teil der IF frei vorliegt, ist diese Schlussfolgerung zumindest mit Vorsicht zu bewerten.

1.5.4 Mit der Krebsentstehung assoziierte Wirkungen

Schon vor 15 Jahren zeigten Ziegler et al., dass ein Zusammenhang zwischen der traditionellen asiatischen Ernährung und einem geringeren Brustkrebsrisiko zu bestehen scheint (Ziegler et al., 1993). Sie fanden, dass die Brustkrebsinzidenz von asiatischen Migrantinnen in den USA sich dem deutlich höheren Risiko der dort lebenden Weißen annähert und begründen dies unspezifisch mit der Adaption des westlichen Lebensstils. Seit Mitte der 90er Jahre wird diese Beobachtung von vielen Wissenschaftlern vor allem mit der soja- und somit isoflavonreichen Ernährung in Verbindung gebracht (Adlercreutz et al., 1995a; Hornross, 1995).

Ganz aktuell haben Wu et al. in einem Übersichtsartikel eine Metaanalyse von insgesamt 28 epidemiologischen Studien vorgenommen (Wu et al., 2008). Acht dieser Studien, die eine verlässliche und vollständige Dokumentation der Sojaaufnahme von Asiatinnen oder asiatischen Amerikanerinnen beinhalten, zeigen mit guter statistischer Sicherheit

einen Zusammenhang zwischen einer hohen Sojaaufnahme und einer verringerten Rate an Brustkrebskrankungen. Dabei wird zwischen der höchsten (mehr als 20 mg IF / Tag) und niedrigsten (weniger als 5 mg IF / Tag) Zufuhr aus den acht Studien statistisch eine Reduktion des Brustkrebsrisikos von 29% ermittelt. Zusätzlich zeigen Wu et al. anhand von zwei der Studien, dass eine hohe Sojaaufnahme während der Adoleszenz für den krebsprotektiven Effekt bedeutsam ist. Dagegen führt eine verstärkte Sojaaufnahme erst im Erwachsenenalter zu keinem signifikanten positiven Effekt. Keine Korrelation ist aus den Daten von elf Studien, durchgeführt in der westlichen Bevölkerung, erkennbar. Hier ist zwischen höchster (0,8 mg IF / Tag) und niedrigster (0,15 mg IF / Tag) Aufnahme weder eine Steigerung noch eine Senkung der Brustkrebsinzidenz zu finden. In einer vergleichbaren Metaanalyse kommen Trock et al. zu ähnlichen Zusammenhängen, allerdings mit einer etwas geringeren statistischen Signifikanz (Trock et al., 2006). Auch die Autoren dieser Studie betonen aber die Relevanz der Sojaaufnahme in der frühen Lebensphase. Weiter wird von Trock et al. angemerkt, dass gerade bei den Studien in der westlichen Bevölkerung eine überdurchschnittliche Sojaaufnahme mit einer bewussten und generellen Vermeidung von Risiken, wie z.B. hohem Alkoholkonsum, gleichzusetzen ist.

Die zentrale Bedeutung der Lebensphase, in der die IF-Zufuhr stattfindet, für eine krebsprotektive Wirkung unterstreichen tierexperimentelle Daten. In einer Studie mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten konnte demonstriert werden, dass eine chemopräventive Wirkung bei GEN-Aufnahme im präpubertären Alter vorhanden ist. Eine GEN-Aufnahme erst in adultem Alter der Ratten zeigte dem gegenüber keinen Effekt (Lamartiniere et al., 2002). Als Begründung für dieses Ergebnis wird von Lamartiniere et al. eine frühere Ausdifferenzierung des Brustdrüsen-gewebes diskutiert.

Eine nicht hormonabhängige Wirkung von IF, analog zu den meisten Flavonoiden, ist eine mehr oder minder starke antioxidative Kapazität, die durch den Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen sowie über die

Komplexierung von Metallionen zustande kommt (Arora et al., 1998; Mitchell et al., 1998). Dadurch kann der Bildung von freien Radikalen entgegen gewirkt werden, die durch das Hervorrufen von DNA-Schäden Tumore auslösen können. Guo und Mitarbeiter konnten in einem zellfreien Modell mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie keine radikal-fangenden Eigenschaften von verschiedenen IF belegen. Sie führen daher die antioxidativen Effekte auf eine Steigerung von intrazellulärem, reduziertem Glutathion zurück (Guo et al., 2002). Insgesamt ist die antioxidative Kapazität von IF nicht außerordentlich hoch und liegt im gleichen Bereich wie die von anderen Flavonoiden, wobei tendenziell mit steigender Anzahl an Hydroxylgruppen im Molekül die antioxidative Wirkung zunimmt (Mitchell et al., 1998).

Generell scheint die Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation fraglich, da es neben Studien, die dies nahe legen (Tikkanen et al., 1998; Wiseman et al., 2000; Chen et al., 2005a), ebenso viele gibt, die keine signifikante Reduktion der Marker für oxidativen Stress beobachten konnten (Hodgson et al., 1999; Pool-Zobel et al., 2000). Letztgenannte Studie kommt zusätzlich zu dem Schluss, dass GEN in höheren Konzentrationen (100 μM) sogar genotoxische Wirkungen hat.

Ebenso konnte *in vitro* und an athymischen Nacktmäusen gezeigt werden, dass GEN in physiologisch relevanter Konzentration von 1-2 μM das Wachstum von Tumorzellen verstärkt (Hsieh et al., 1998; Allred et al., 2001; Ju et al., 2001). Dabei übt GEN auf MCF-7-Tumorzellen (humane Brustkrebszellen) *in vitro* in einer Konzentration von 0,1-1 μM Effekte aus, die mit 1 nM Estradiol vergleichbar sind. Ab einer GEN-Konzentration von etwa 25 μM , die eine *in vivo* kaum zu erreichende Dimension darstellt, ist wiederum eine Proliferationshemmung zu beobachten.

Wie wenig gesichert die Erkenntnisse über die physiologische Wirkung von IF sind, zeigt eine Studie von Allred et al. (Allred et al., 2005), in der belegt werden kann, dass die Wirkung von isoliert applizierten IF nicht mit der Wirkung dieser Verbindungen im komplexen Lebensmittel vergleichbar ist. So wurde die estrogenische Wirkung eines wenig verarbeiteten Sojamehls

im Vergleich zu einem Sojaextrakt und dem isolierten Soja-IF Genistin (Genisteinglucosid) untersucht. Die verschiedenen Soja-Produkte waren dabei auf den gleichen GEN-Gehalt eingestellt. An athymischen, ovariectomierten Nacktmäusen, denen MCF-7-Zellen implantiert wurden, hatte die Verfütterung des Sojamehls keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen. Im Gegensatz dazu wurde sowohl durch den Sojaextrakt als auch durch das isolierte Soja-IF die Proliferation der MCF-7-Zellen gesteigert.

1.5.5 Genotoxische und mutagene Wirkung von Isoflavonen

Neben überwiegend krebsprotektiven Effekten, die für IF gefunden werden konnten, gibt es auch gegenteilige Erkenntnisse, die in erster Linie oxidative Metabolite der IF DAI und GEN betreffen. In verschiedenen *in vitro* Testsystemen und in unterschiedlichen Zellsystemen wurden IF auf Genotoxizität und Mutagenität untersucht. Im Folgenden werden einige zentrale Ergebnisse exemplarisch herausgegriffen.

Im Mikrokerntest in V79-Zellen (Hamsterlungenfibroblasten) wurde für GEN ein DNA-Strang-brechendes (klastogenes) Potential gefunden. Im Gegensatz dazu war dies für DAI und seine monohydroxylierten Metabolite 3',4',7-Trihydroxy-IF und 4',6,7-Trihydroxy-IF nicht der Fall (Kulling, 2001). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass von Snyder und Gillies eine gegenseitige Beeinflussung der IF gezeigt werden konnte. In ihren Experimenten an derselben Zelllinie war eine deutliche Reduktion der Klastogenität von GEN in der Gegenwart von DAI zu beobachten (Snyder and Gillies, 2003).

Dieser Befund wird durch Ergebnisse des Comet-Assays in HeLa-S3-Zellen unterstützt. Hier wurde zusätzlich ein Enzym eingesetzt, das oxidative Basenschäden in Einzelstrangbrüche überführt.

Während GEN und DAI nur in sehr hoher, physiologisch nicht erreichbarer Konzentration DNA-Schäden verursachen, zeigen die monohydroxylierten Metabolite von DAI, 3',4',7- und 4',6,7-Trihydroxy-IF, deutlich stärkere Effekte. Dieser Befund wird auf ihre catecholische Struktur und die damit

verbundene Fähigkeit zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt.

Trotz dieser leicht genotoxischen Wirkung zeigen weder GEN noch DAI sowie die untersuchten Metabolite eine mutagene Wirkung *in vitro* im Ames-Test. Ebenso konnte im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Test in V79-Zellen keine nennenswerte mutationsbedingte Abnahme der Aktivität des HPRT-Enzyms als Indikator für Mutationsereignisse festgestellt werden.

Außerdem konnten Murata und Mitarbeiter für unterschiedliche DAI- und GEN-Metabolite zeigen, dass sie in Gegensatz zu ihren Mutterverbindungen nur schwach in der Lage sind, eine Zellproliferation in MCF-7-Zellen zu induzieren, aber in stärkerem Maße DNA-Schäden durch „Redox-Cycling“ verursachen (Murata et al., 2004). Insbesondere durch 3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF und 3',4',7-Trihydroxy-IF konnte bei Inkubation von radioaktiv markierter DNA mit Cu^{2+} , NADH und den IF eine Bildung von DNA-Fragmenten sowie von 8-oxo-7,8-Dihydro-2'-deoxyguanosin als Marker für oxidative Schädigung gezeigt werden. DAI, GEN und 4',6,7-Trihydroxy-IF zeigen keine derartigen Effekte. Zusätzlich wurde von Kulling, Schmitt und Mitarbeitern sowie Lehmann et al. *in vitro* eine genotoxische Wirkung durch oxidative, catecholische sowie reduktive Metabolite von DAI beobachtet, wohingegen für DAI selbst kein solches Verhalten gefunden wurde (Kulling, 2001; Schmitt et al., 2003; Lehmann et al., 2005).

Interessant ist in dem Kontext vor allem die Tatsache, dass diese meist catecholischen IF einigen Literaturangaben zu Folge bereits als solche im Rotklee vorliegen und so möglicherweise mit einer deutlich höheren Exposition des Körpers durch Rotkleepräparate im Vergleich zu den sojabasierten Mitteln zu rechnen ist.

1.5.6 Weitere Einflüsse von Isoflavonen auf den Metabolismus von Estradiol

Die mögliche Brustkrebspräventive Wirkung der IF wird vor allem auf die antiestrogenen Eigenschaften von IF zurückgeführt. Diese Wirkung ist in einigen Fällen eng mit dem Stoffwechsel des endogenen Estrogens verknüpft. So haben asiatische Frauen, möglicherweise bedingt durch die isoflavonreiche Ernährung, einen längeren Menstruationszyklus und somit eine herabgesetzte lebenslange Exposition gegenüber endogenem Estrogen (Bingham et al., 1998). Es werden aber auch direkte Interaktionen von IF und ihren Metaboliten mit den ER α und ER β diskutiert, die auf einer schwachen Estrogenrezeptoraffinität beruhen. Hwang et al. demonstrieren *in vitro* eine duale Wirkung von Estrogen, bei hohem endogenen Estrogenspiegel wirken IF antagonistisch, während sie bei einem niedrigen Estrogenspiegel agonistisch am Rezeptor wirken (Hwang et al., 2006).

Weiter konnte *in vitro* eine Hemmung der Estrogenbiosynthese durch IF gezeigt werden (Adlercreutz et al., 1993a; Brooks and Thompson, 2005). Ebenso wurde *in vitro* eine Hemmung des Phase-II-Metabolismus durch Sulfokonjugate des DAI gezeigt, die eine Verlangsamung der Konjugation von Estrogen und somit eine längere Verweildauer des freien, aktiven Moleküls im Plasma bedingen könnte (Wong and Keung, 1997).

Im Gegensatz dazu konnten Pfeiffer und Mitarbeiter zeigen, dass durch verschiedene IF wie DAI, FORM und monohydroxylierte Metabolite des DAI die Glucuronidierung von Estradiol in C-3 Position verstärkt wird, so dass die Verweildauer von freiem Estradiol herabgesetzt wird (Pfeiffer et al., 2005).

Für diese beschriebenen *in vitro* Effekte von IF im Zusammenhang mit Estrogen bzw. den Estrogenrezeptoren fehlen eindeutige *in vivo* Daten. Die wenigen bisher dazu durchgeführten Studien sind in ihren Ergebnissen widersprüchlich, so dass ein abschließendes Urteil nicht möglich ist (Duncan et al., 2000; Nettleton et al., 2004; Nettleton et al., 2005; Qin et al., 2006).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass IF das System von 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktasen I und II beeinflussen. Dabei unterscheiden sich die IF in ihrer Wirkung und Spezifität deutlich, zumal Inhibitionen auf beide Oxidoreduktasen gefunden wurden, die sich in ihrer Wirkung antagonistisch verhalten (Le Bail et al., 2000; Kirk et al., 2001).

1.5.7 Einfluss auf die Schilddrüse

Die Thyroid-Peroxidase ist an der Produktion von Schilddrüsenhormonen beteiligt, indem sie die Iodierung von Tyrosin in der Schilddrüse katalysiert. Untersuchungen zeigen, dass IF in der Lage sind, als alternative Substrate zu fungieren und somit die Synthese von Thyroidhormonen zu inhibieren (Divi and Doerge, 1996; Divi et al., 1997). Die entsprechenden iodierten IF konnten sowohl für die Soja-IF wie auch für BioA nachgewiesen werden. Ihre biologische Aktivität ist allerdings unbekannt.

Ebmeier und Anderson zeigten darüber hinaus eine Hemmung der Sulfotransferasen durch IF (Ebmeier and Anderson, 2004). Diese Enzyme sind an der Inaktivierung und Eliminierung der Schilddrüsenhormone sowie der Wiedergewinnung von Jod in der menschlichen Schilddrüse beteiligt. Aus epidemiologischen Studien gibt es bislang aber keine Anhaltspunkte für mögliche negative Effekte der IF auf die Schilddrüsenfunktion. Über mögliche Wirkungen bei Jodmangel oder bei schon bestehenden Jodmangelerkrankungen ist nichts bekannt.

1.6 Resultierende Problemstellung

NEM auf Rotkleebasis, die in Drogerien und Apotheken in Deutschland frei erhältlich sind, haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die enthaltenen Rotklee-IF stellen die relevanten Wirkkomponenten mit schwach estrogener Wirkung dar. Für die strukturell sehr ähnlichen Soja-IF wird, basierend auf epidemiologischen Studien, eine gesundheitsförderliche, vornehmlich krebspräventive und osteoprotektive, Wirkung diskutiert.

Die Vielzahl sowie die Widersprüchlichkeit der für die Soja-IF beschriebenen Effekte zeigen, dass für die Rotklee-IF noch großer Forschungsbedarf existiert. Insbesondere für die Minor-IF mit teilweise toxikologisch bemerkenswerten MDP-Strukturelementen existieren bislang keine Daten. Aus diesem Grund stehen Untersuchungen zu Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologischer Aktivität der beiden Haupt-IF FORM und BioA insbesondere aber von IRI als dem bedeutendsten Minor-IF im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Zunächst ist es notwendig, IRI als Referenzsubstanz aus pflanzlichen Quellen verfügbar zu machen. Zu diesem Zweck wird die Extraktion aus *Iris germanica* nach Säurehydrolyse optimiert.

Ein Hauptziel der Arbeit ist dann die Untersuchung des Phase-I-, Phase-II- und intestinalen Metabolismus von IRI sowie z.T. auch von FORM und BioA. Dabei sollen die entstehenden Metabolite strukturell aufgeklärt und enzymkinetische Daten aufgenommen werden. Abbildung 5 stellt die anhand der Untersuchungen an Soja-IF zu erwartenden IRI-Metabolite der verschiedenen zu untersuchenden Metabolismuspfade graphisch dar.

In einer humanen Pilotstudie mit sieben ProbandInnen soll schließlich die Bioverfügbarkeit der Rotklee-IF untersucht werden. Dazu wird das Blutplasma der StudienteilnehmerInnen nach der Aufnahme der empfohlenen Tagesaufnahmemenge eines NEM auf IF und deren Metabolite hin untersucht.

Für alle Fragestellungen sind die Analytik sehr geringer IF-Konzentrationen sowie eine verlässliche Strukturanalyse mittels gekoppelter Massenspektrometrie notwendig. Entsprechende Methoden für die HPLC-ESI-MS und GC-EI-MS sollen dafür etabliert werden.

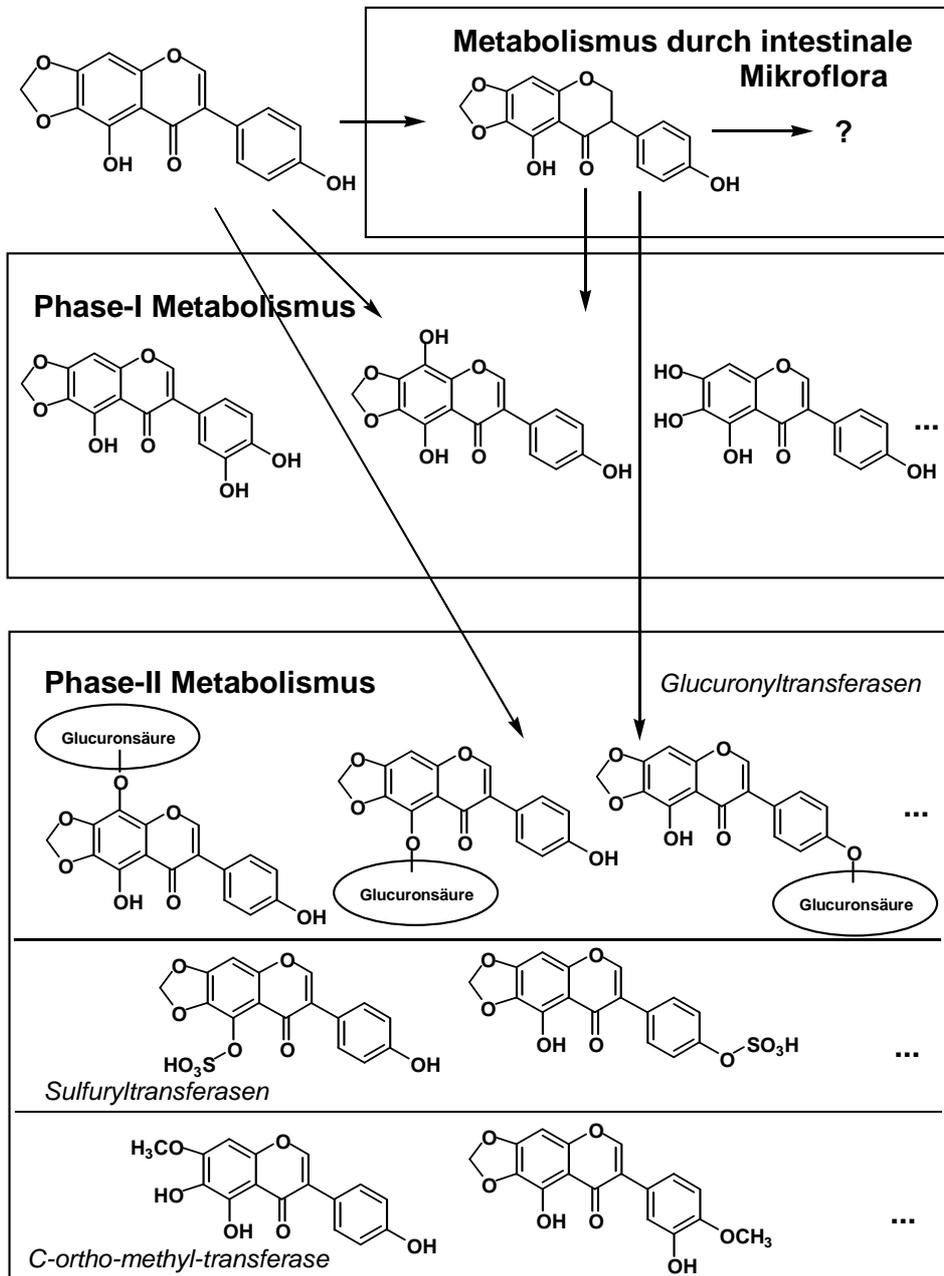


Abbildung 5: Zusammenfassung der für Irilon zu erwartenden Hauptmetabolismuspfade.

2. Material & Methoden

2.1 Isoflavongehalt und –verteilungsmuster in Nahrungsergänzungsmitteln

Über die in Deutschland auf dem Markt befindlichen Phytoestrogenpräparate gibt es bis dato relativ wenige Untersuchungen bezüglich des IF-Gehaltes und der IF-Zusammensetzung. Dies gilt insbesondere für die NEM, die auf der Basis von Rotklee(extrakten) hergestellt werden. Inwiefern die Deklaration des IF-Gehaltes der Hersteller verlässlich ist und welche IF-Muster in den Präparaten vorliegen, soll anhand von acht ausgewählten, in Deutschland frei erhältlichen Rotklee-Präparaten überprüft werden. Ferner werden vier weitere sojabasierte NEM zum Vergleich analysiert. Die Identität der IF und ihrer Konjugate wird, sofern erhältlich, über Cochromatographie mit authentischen Referenzsubstanzen durchgeführt. Für die weiteren zu erwartenden IF wird sowohl die Analyse ihrer MS-Spektren als auch ihr Retentionsverhalten in der HPLC auf einer RP 18-Phase im Vergleich zu Literaturdaten herangezogen.

2.1.1 Aufarbeitung der Nahrungsergänzungsmittel

Die auf dem Markt befindlichen Präparate weisen große Unterschiede in ihrer Grundzusammensetzung auf. Für die Durchführung der enzymatischen Hydrolyse in rein wässrigem Medium resultiert daraus die Notwendigkeit, in der Aufarbeitung lipophile Substanzen gegebenenfalls abzutrennen. Darüber hinaus wird neben dem im NEM vorhandenen IF-Muster noch der Gesamtgehalt an IF-Aglyconen nach Hydrolyse der Zuckerkonjugate bestimmt.

Fettfreie Präparate

Gepresste Tabletten werden im Mörser fein verrieben bzw. die Füllung der in Form von Pulverkapseln vorliegenden NEM wird nach Entfernen der Kapsel homogenisiert. Je 50 mg des Pulvers und 100 µL des internen

Standards (4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon, 4,8 mg/mL in DMSO) werden in 10 mL Acetonitril für 30 min bei 50 °C im Ultraschall suspendiert und die IF dabei gelöst. Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert, filtriert und das Filtrat auf 20 mL mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung kann direkt zur chromatographischen Analyse eingesetzt werden. Die Analyse der NEM erfolgt jeweils in drei separaten Ansätzen. Zur abschließenden Berechnung des IF-Gehaltes pro Kapsel/Tablette wird das durchschnittliche Gewicht der jeweiligen Tabletten bzw. des Kapselinhaltes bestimmt.

Fetthaltige Präparate

Die zwei untersuchten fetthaltigen Kapseln werden jeweils längs aufgeschnitten und komplett weiter aufgearbeitet, da eine Trennung von Kapsel und dem fettreichem Inhalt nicht durchführbar ist. Die Kapsel samt Inhalt wird mit 100 µL des internen Standards (4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon, 4,8 mg/mL in DMSO) und analog den fettfreien NEM in 10 mL Acetonitril für 30 min bei 50 °C im Ultraschall suspendiert. Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert, filtriert und das Filtrat auf 20 mL mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Lösung kann direkt zur chromatographischen Analyse eingesetzt werden. Die Analyse der NEM erfolgt jeweils in drei separaten Ansätzen. Eine abschließende Berechnung des IF-Gehaltes pro Kapsel ergibt sich direkt. Eine Angabe der IF-Menge pro mg Kapselinhalt wird nicht vorgenommen.

Enzymatische Hydrolyse

Zur Bestimmung des IF Gehaltes nach Spaltung der Zuckerkonjugate werden 50-100 mg der bereits pulverförmigen Probe oder der fein vermahlenden Probe mit 20 mL Methanol (80%ig) versetzt und ca. 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird das Methanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Es werden 10 mL Natriumacetatpuffer mit 4000 U β -Glucosidase/Sulfatase aus *Helix pomatia* zugegeben (siehe Kapitel 6.2.3.4). Es wird 16 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösungen auf Raumtemperatur wird dreimal mit

je 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, und der Rückstand wird in 20 mL Methanol (80%) gelöst, gegebenenfalls über einen Membranfilter filtriert, verdünnt und zur Analyse eingesetzt. Die beiden fettreichen NEM werden zunächst aufgeschnitten und komplett im Rundkolben mit 10 mL Hexan versetzt. Diese Suspension wird 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend werden 20 mL Methanol (80%) hinzugegeben und mehrfach geschüttelt, die Hexanphase wird abpipettiert. Es wird noch zweimal mit jeweils 10 mL Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen werden verworfen. Die so entfettete Probe wird dann wie oben beschrieben mit Natriumacetatpuffer versetzt und enzymatisch gespalten.

2.1.2 Chromatographische Bedingungen

stationäre Phase	Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 10*3,0 mm, 3,0 µm (Bischoff, Leonberg) Trennsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 150*3,0 mm, 3,0 µm (Bischoff, Leonberg)	
mobile Phase	A: Trifluoressigsäure (0,05%) B: Acetonitril	
Gradient	t (min)	%B
	0	15
	50	35
	60	40
	75	50
	77	90
	80	15
	84	15
Flußrate	0,6 mL/min	
Aufgabevolumen	25 µL	
Detektion	UV (260 nm), Agilent 1100 series DAD, (Agilent Technologies, Böblingen)	
	MS-ESI(pos), Agilent MSD G1946A, (Agilent Technologies, Böblingen)	
	Kapillarspannung: 3500 V	
	Fragmentorspannung: 90 V	
	Zerstäuberdruck: 60 psi	
	Trockengasfluss: 12,5 L/min	
	Trocknungsgastemperatur: 350 °C	
	Messmodus: scan (50-650 amu)	

2.1.3 Quantifizierung

Mittels internem Standards (4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavone)

Für die kommerziell erhältlichen IF wird über externe Standards jeweils ein spezifischer Korrekturfaktor (KF) bestimmt, welcher die relative Absorptionsintensität im Vergleich zum internen Standard (ISTD) bei der gewählten Wellenlänge von 260 nm abbildet. Die Berechnung des KF erfolgt nach Formel (1), Anhang 6.1. Für die Quantifizierung der IF, die nicht als Referenzsubstanz verfügbar sind, wird aus den vorhandenen Substanzen jeweils innerhalb der Substanzgruppe (Aglycone, Glucoside bzw. Acetylglucoside) ein Mittelwert gebildet und als bestmögliche Näherung verwendet. Die über die ermittelten Flächenverhältnisse der IF in Standardchromatogrammen berechneten KF sind im Anhang (Tabelle A1) aufgelistet.

Zur Angabe des tatsächlichen IF-Gehaltes werden die als Glucoside, Acetyl- oder Malonylglucoside konjugiert vorliegenden IF in den nicht hydrolysierten Proben über ihre Molmassen auf den Aglycongehalt umgerechnet.

Im Falle von IRI war nach Beendigung der Studie die Referenzsubstanz käuflich erhältlich. Zur Überprüfung der ursprünglichen Näherung wird nachträglich ein KF analytisch ermittelt. Dieser liegt mit einem Wert von 0,66 um etwa 30% über dem für die Quantifizierung angesetzten KF.

Mittels externer Kalibrierung

Für die Aufarbeitung mit enzymatischer Spaltung der Glucoside kann der ISTD 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavone nicht zur Quantifizierung herangezogen werden, da er in erheblichem Maße bei der Aufarbeitung verloren geht. Für eine Standardmischung an IF und IF-Glucosiden ist dies nicht der Fall, sodass anstelle des ISTD über die Erstellung einer externen Kalibriergeraden quantifiziert wird. Da die Konjugate quantitativ zu den freien Aglyconen umgesetzt werden, wird auch nur für diese jeweils die Kalibrierfunktion aufgenommen. Für die nicht kommerziell erhältlichen Analyten wird eine mittlere Kalibrierfunktion angenommen.

Es wird für alle IF ein R^2 von mehr als 0,99 erreicht, eine gute Linearität im gewählten Konzentrationsbereich von 0,5-55 $\mu\text{g/mL}$ ist damit gegeben. Der Arbeitsbereich beginnt damit bei etwa 10 ng IF pro Injektion.

Die Parameter der Geradengleichungen für die untersuchten IF entsprechend der Form: $\text{area} = A * c [\mu\text{g/mL}] - B$ lauten wie folgt:

	Empfindlichkeit (A)	Präzision (B)
Daidzein	184,6	50,0
Glycitein	216,1	53,4
Genistein	322,2	85,2
Formononetin	237,2	27,3
Prunetin	300,2	71,7
Biochanin A	311,0	77,0
Gemittelt	261,9	60,8

2.2 *In vitro* Phase-I-Metabolismus von Irimon

2.2.1 Rattenlebermikrosomenherstellung

Die zur Untersuchung des Phase-I-Metabolismus verwendeten Rattenlebermikrosomen (RLM) werden aus Lebern adulter, männlicher, nicht induzierter Lewis-Ratten, bereitgestellt vom Universitätsklinikum in Eppendorf, hergestellt. Je fünf Rattenlebern werden zu einem Pool vermischt. Aus den insgesamt zehn verfügbaren Lebern wurden somit zwei RLM-Pools erhalten.

Die MIK-Präparation aus Rattenlebern erfolgte in modifizierter Art nach der Beschreibung von Kulling (Kulling, 1996), welche auf dem Vorgehen nach Lake (Lake, 1987) basiert. Die Lebern werden direkt nach Entnahme mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um Denaturierungsprozesse zu verhindern erfolgen sämtliche Verarbeitungsschritte unter Eiskühlung bei maximal $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die verwendete physiologische Kochsalzlösung (0,9 %; m/v; NaCl), Behältnisse und Geräte werden soweit möglich vor Einsatz bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Der Mic-II-Puffer (Anhang 6.2.3.1) zur abschließenden Resuspendierung wird erst direkt zur Verwendung aufgetaut und auf Eis gelagert. Zur Herstellung der RLM wurden die Lebern zunächst gewogen,

in vorgekühlter NaCl-Lösung mit einem Skalpell grob zerkleinert und die Stücke in die Homogenisiergefäße überführt. Nachdem diese bis zu einem Füllstand von 5 mL mit NaCl-Lösung versetzt wurden, erfolgt die Bereitung des Gewebehomogenisates durch 13 Hübe bei 550 U/min am Potter nach Elvehjem. Die Homogenisate werden 15 min bei 9000 x g zentrifugiert, wobei Zellkerne, Mitochondrien und Lysosomen pelletieren. Die im Überstand (sogenannte S9-Fraktion) als MIKs verbleibenden Membranen des ER werden anschließend 60 min bei 105000 x g bei 4 °C ultrazentrifugiert und damit sedimentiert. Der cytosolhaltige Überstand sowie die überstehende Lipidphase werden entfernt. Das so erhaltene MIK-Pellet wird durch kurzes Vortexen, unter Zurückbleiben eines glasigen Glykogenfleckes an der Wandung des Zentrifugenröhrchens, in NaCl-Lösung resuspendiert und erneut 60 min bei 105000 x g ultrazentrifugiert. Abschließend wird das mikrosomale Pellet in 0,5 mL Mic-II-Puffer (Anhang 6.2.3.1) resuspendiert. Die aus jeweils einer Leber erhaltenen Suspensionen werden vereinigt, mit Mic-II-Puffer auf ein Gesamtvolumen von ca. 5 mL aufgefüllt (entspricht ca. 1,5 mL/g Leber) und in 1 mL-Portionen mit Flüssigstickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei -84 °C. Die erhaltenen RLM von je fünf Ratten werden nach Überprüfung ihrer Funktion unter Zurückhalten von je einer 1 mL-Portion als Rückstellprobe gepoolt, entsprechend der Herstellung erneut zu 1 mL-Portionen aliquotiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -84 °C gelagert. Die Charakterisierung der gepoolten RLM erfolgt anhand Proteinbestimmung nach *Bradford* und Bestimmung des CYP-Gehaltes mittels Differenzspektroskopie.

2.2.1.1 Charakterisierung der hergestellten Lewis-Ratten-lebermikrosomen

Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration dient der Charakterisierung der aufgearbeiteten RLM und erfolgt mittels Photometrie nach Reaktion mit *Bradford*-Reagenz (Bradford, 1976). Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Proteine in saurer Lösung unspezifisch mit Coomassie Serva Blue G einen Farbkomplex bilden und sich dabei das Absorptionsmaximum von 465 auf etwa 590 nm verschiebt.

Die Messung erfolgt gegen eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin (50-505 µg/mL) im Mikrotitermaßstab. Je 50 µL der Proben- bzw. Standardlösungen und bidestilliertem Wasser als Blindwert werden in je ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µL *Bradford*-Reagenz versetzt. Nach kurzem Schütteln im Mikrotiterplattenreader werden die Lösungen bei 590 nm gegen den Blindwert vermessen. Die Kenntnis des Proteingehaltes bildet die Grundlage für die CYP-Bestimmung. Der Proteingehalt der Lewis-RLM liegt bei 18,5 mg/mL.

Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes

Zur Charakterisierung der gewonnenen RLM wird der CYP-Gehalt in Anlehnung an das Verfahren der CO-Differenzspektroskopie von Omura und Sato (Omura and Sato, 1964) bestimmt. Die Methode beruht auf der Absorption des Häm-Eisen der Porphyrin-Gruppen cytochromhaltiger Proteine nach irreversibler Bindung von Kohlenmonoxid bei 450 nm. Dieses für Häm-haltige Proteine spezifische Absorptionsverhalten wird durch Aufnahme der Spektren des freien CYP und des CYP-CO-Komplexes zwischen 400–500 nm und anschließender Ermittlung des resultierenden Differenzspektrums ausgenutzt. Aus der Differenz der Absorptionswerte dieses Spektrums bei 450 nm und 490 nm kann unter Verwendung des von Omura und Sato (Omura and Sato, 1964) empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten ($91 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) der CYP-Gehalt berechnet werden. Man erhält die Konzentration an CYP in nmol/mL Messlösung.

Zunächst werden die RLM mit Kaliumphosphatpuffer auf einen Gehalt von 1 mg Protein/mL verdünnt, um anschließend durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit die Reduktion des Häm-Eisens des CYP zu erreichen. Nach 5 min Reaktionszeit, Homogenisieren der Lösung und Überführen in eine Glasküvette wird das erste Spektrum (400-500 nm) aufgezeichnet. Im Folgenden wird in die Lösung in der Küvette 1 min lang Kohlenmonoxid (kontinuierlicher Blasenstrom von ca. 3-4 Bläschen/sec) eingeleitet. Nach erfolgter Begasung wird das Spektrum des gebildeten CO-Komplexes aufgenommen. Aus der Extinktionszunahme bei 450 nm wird die Konzentration an CYP nach Formel (2) in Anhang 6.1 berechnet. Die Gehalte werden in Doppelbestimmung ermittelt.

Durchführung

Die RLM Suspension wird auf eine finale Konzentration von etwa 1 mg Protein pro mL Meßlösung verdünnt. Über die Aufnahme des Differenzspektrums bei 450 nm vor und nach Begasen mit Kohlenmonoxid wird für die verwendeten RLM ein durchschnittlicher CYP Gehalt von 9,1 nmol/mL Suspension in Doppelbestimmung ermittelt.

2.2.2 Invitrosomen[®]

Neben Leber-MIKs werden sogenannte Invitrosomen[®] (InVitro Technologies, Leipzig) zur Durchführung der Untersuchungen eingesetzt. Bei den Invitrosomen[®] handelt es sich um MIKs aus *Saccharomyces cerevisiae* welche jeweils nur ein spezifisches CYP-Enzym exprimieren. Damit ist es möglich, die Aktivität der einzelnen CYP-Enzyme gegenüber Substraten zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Auswahl an CYPs auf ihre Fähigkeit getestet, Rotklee IF oxidativ zu verstoffwechseln. Tabelle 4 listet die verwendeten CYPs und die wichtigsten zugehörigen Kenndaten auf.

Tabelle 4: Spezifikationen der verwendeten Cytochrom-P450-Enzym-Suspensionen (Herstellerangaben).

Enzym	Gesamtprotein-konzentration	CYP-Konzentration	Spezifische Aktivität
CYP 1A1	4,2 mg/mL	1 nmol/mL	234,4 pmol/mg Protein
CYP 2C9	4,6 mg/mL	1 nmol/mL	217,6 pmol/mg Protein
CYP 2D6	64,2 mg/mL	1 nmol/mL	15,6 pmol/mg Protein
CYP 2E1	4,5 mg/mL	1 nmol/mL	221,4 pmol/mg Protein
CYP 3A4	9,3 mg/mL	1 nmol/mL	107,5 pmol/mg Protein

2.2.3 *In vitro* Inkubationen

RLM werden für Metabolisierungsstudien eingesetzt, da diese in relativ großen Mengen gewonnen werden können. Durch standardisierte Haltungsbedingungen sowie die weitreichenden Erbguthomogenität innerhalb eines Rattenstammes unterliegt die Enzymausstattung nur geringen Schwankungen, wodurch die Ergebnisse reproduzierbar und vergleichbar sind. Die unterschiedliche Enzymausstattung von Tieren verschiedener Stämme sowie Geschlechter muss allerdings beachtet werden. Die MIKs divergieren hier nicht nur im Enzymgehalt, sondern auch in der Verteilung der vertretenen CYP-Enzyme und ihrer Aktivität.

Um diesen Unterschieden Rechnung zu tragen, wurden Inkubationen mit MIKs von Ratten unterschiedlicher Stämme durchgeführt. Neben den hergestellten RLM männlicher Lewis-Ratten wurden RLM weiblicher und männlicher Sprague-Dawley-Ratten sowie weiblicher und männlicher Wistar-Ratten verwendet. Die Sprague-Dawley- und Wistar-RLM wurden von der Firma InVitroTech bezogen.

Tabelle 5: Standardprotokoll zur Durchführung der oxidativen mikrosomalen Umsetzungen im Normalmaßstab am Beispiel der Inkubation von Irilon mit Lewis-RLM.

Zugabe von	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer	1801 µL	100 mM
RLM	150 µL	2,0 mg Protein/mL
Irilon	20 µL	10 µM
5 min Vorinkubation bei 37 °C		
MgCl ₂	8,56 µL	0,43 mM
NADPH	20µL	1,3 mM
120 min Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad		

Tabelle 6: Standardprotokoll zur Durchführung der oxidativen mikrosomalen Umsetzungen im Mikromaßstab am Beispiel der Inkubation von Irilon mit Lewis-RLM.

Zugabe von	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer	160 µL	100 mM
MgCl ₂ (im Puffer)	-	1 mM
RLM	25 µL	2,3 mg Protein/mL
Irilon	5 µL	18,5 µM
5 min Vorinkubation bei 37 °C		
NADPH	10µL	1,2 mM
120 min Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad		

Die Umsetzung von IF mit RLM wird nach Kulling (Kulling, 1996) mit geringen Modifikationen durchgeführt. Dabei wird das von Kulling verwendete NADPH generierende System durch die direkte Verwendung von NADPH ersetzt. Die Inkubationen der IF wird zunächst in einem Gesamtvolumen von 2,0 mL durchgeführt. Dazu werden alle zur Umsetzung benötigten Lösungen mit Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) zu 2,0 mL Gesamtvolumen ergänzt (Tabelle 5). Die Menge an mikrosomalem Protein entspricht in jedem Ansatz ca. 2 mg/mL. NADPH wird als Cofaktor in einer Absolutmenge von 2 mg pro Ansatz zugesetzt. Zur Sicherstellung der CYP Aktivität wird Magnesiumchloridlösung in einer Endkonzentration von 0,43 µM zugesetzt. Die Konzentration an IRI im Ansatz beträgt 10 nmol/mL (20 nmol absolut). Ein Standardpipettierschema ist in Tabelle 5 dargestellt. Bei Abweichungen vom Standardprotokoll wird die Menge des Kaliumphosphatpuffers entsprechend angepasst und das Gesamtvolumen bei konstant 2,0 mL gehalten. Bei der Kontrollwertumsetzung wird der Cofaktor nicht zugegeben und durch 20 µL Puffer ersetzt. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 2 mL eisgekühltem Ethylacetat werden die IF und ihre Metabolite mit dreimal 2 mL eisgekühltem Ethylacetat aus dem Inkubationsansatz extrahiert. Zur Phasentrennung erfolgt zwischen den einzelnen Extraktionsschritten ein Zentrifugationsschritt (2 min bei 3783 x g). Eine weitgehend vollständige Extraktion der IF und ihrer Metabolite ist durch Vorversuche verifiziert worden. Nach erfolgter

Extraktion mit Ethylacetat sind in der extrahierten, wässrigen Phase keine Reste von IF mehr nachweisbar.

Die vereinigten Ethylacetatphasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, der Rückstand mit 200 µL Methanol in ein Vial überführt, in dem 40 µL bidestilliertes Wasser vorgelegt sind. Diese Lösung wird direkt zur HPLC-Analyse verwendet. Die chromatographischen Bedingungen zur HPLC-ESI(+)-MS/DAD-Analyse entsprechend denen aus Kapitel 2.1.2. Alle Inkubationen werden als Doppel- oder Dreifachbestimmung ausgeführt, wobei zu jeder Inkubationsserie ein Kontrollwert ohne NADPH-Zugabe in Doppelbestimmung mitgeführt wird.

Zur Umsetzung mit den kommerziell bezogenen RLM und HLM sowie mit den rekombinanten CYPs wird ein miniaturisierter Ansatz gewählt, der eine ökonomischere Arbeitsweise ermöglicht. Wie in dem Protokoll in Tabelle 6 dargestellt, wird die Ansatzgröße auf ein Zehntel reduziert, die Konzentrationsverhältnisse werden jedoch beibehalten. Für die CYPs werden 10 µL je Ansatz entsprechend 0,05 nmol/mL Inkubationsansatz verwendet. Das Puffervolumen wird entsprechend angepaßt. Tabelle 7 fasst die in diesem Mikromaßstab eingesetzten Enzym bzw. Protein- und CYP-Konzentrationen der MIKs zusammen.

Tabelle 7: Verwendete Protein- und CYP-Konzentrationen bei der Umsetzung der Isoflavone mit den Mikrosomen (MIK) (sofern in der Durchführung nicht abweichend angegeben). „SD“: Sprague-Dawley; „WIS“: Wistar; „LEW“: Lewis; „k.A.“: eine Angabe war nicht verfügbar.

MIK-Suspension	Protein im Ansatz	CYP im Ansatz
SD-RLM weiblich	2,75 mg/mL	0,77 nmol/mL
SD-RLM männlich	3,00 mg/mL	1,47 nmol/mL
WIS-RLM weiblich	3,25 mg/mL	2,34 nmol/mL
WIS-RLM männlich	2,40 mg/mL	1,97 nmol/mL
LEW-RLM männlich	2,31 mg/mL	1,14 nmol/mL
Aroclor ind. RLM	0,21 mg/mL	k.A.
HLM	4,80 mg/mL	k.A.

Einsatz von induzierten RLM

Aufgrund des sehr viel höheren Gehaltes einzelner CYP-Enzyme in induzierten MIKs, wird eine geringere Menge (15 µL im 2,0 mL Ansatz) der MIK-Suspension zur Umsetzung von IF eingesetzt. Die Differenz im Gesamtvolumen wird durch zusätzliche 85 µL Puffer ausgeglichen

(Tabelle 8). Zusätzlich wird die Inkubationszeit aufgrund der höheren Aktivität der MIKs auf 30 min reduziert und die Substratkonzentration auf das Dreifache erhöht. Als Referenz wird GLYC unter ansonsten gleichen Bedingungen mitgeführt.

Tabelle 8: Protokoll zur Durchführung der oxidativen mikrosomalen Umsetzungen mit induzierten RLM.

Zugabe von	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer	1941 µL	100 mM
RLM	15 µL	2,0 mg Protein/mL
Irilon	20 µL	30 µM
5 min Vorinkubation bei 37 °C		
MgCl ₂	8,56 µL	0,43 mM
NADPH	10µL	1,2 mM
30 min Inkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad		

Überprüfung der Isoflavonmetabolisierung durch verschiedene CYPs

Mit den in Tabelle 4 angegebenen CYPs, die den Hauptteil der in der Leber vorkommenden Enzyme repräsentieren sowie dem auch extrahepatisch vorkommenden CYP 1A1, werden im ersten Schritt orientierende Inkubationen durchgeführt und die Umsatzraten und das Spektrum der erhaltenen Metabolite verglichen. Da mit diesen Untersuchungen lediglich qualitativ bestimmt werden soll, welche Enzyme eine Umsetzung katalysieren, werden statt Dreifach- nur Doppelbestimmungen mit einfach analysierten Kontrollinkubationen durchgeführt. Die Inkubations-, Extraktions- und Chromatographiebedingungen werden analog derer für die Inkubationen mit RLM und HLM gewählt und sind in Tabelle 6 dargestellt, wobei das Volumen der zugesetzten Enzymsuspension auf 10 µL reduziert wird. Es werden für die IF IRI und BioA Inkubationen mit allen betrachteten CYP-Enzymen durchgeführt. Aus der Erfahrung, dass sich BioA und FORM sehr ähnlich verhalten, wurde auf Vorversuche mit FORM für CYP 1A1 und CYP 2E1 an dieser Stelle verzichtet, nachdem die Aktivität der Enzyme für die Metabolisierung von BioA bestätigt wurde.

Inkubation von IRI, FORM und BioA mit CYP 1A1 und CYP 2E1

Für die im Vorversuch in der Umsetzung von IRI und BioA aktiven UGTs 1A1 und 2E1 wird zur verbesserten Auswertbarkeit die eingesetzte Enzymmenge verdoppelt. Diese Inkubationen mit 20 µL der Enzymsuspensionen (entsprechend 0,1 nmol CYP/mL Ansatz) werden in Dreifachbestimmungen mit IRI, BioA und zusätzlich FORM als Substrat durchgeführt.

Berechnung des Umsatzes

Bei allen Bestimmungen wird der prozentuale Anteil der gebildeten Menge an den Metaboliten bzw. nicht umgesetzten IF zu dem mitgeführten Kontrollwert ermittelt. Da keine Standardsubstanzen zur Verfügung standen, werden die Anteile direkt aus den Peakflächen in der UV-Detektion ermittelt. Dies ist legitim, da alle Umsetzungsprodukte ein sehr ähnliches UV-Absorptionsspektrum zeigen (Abbildung A1 im Anhang), und somit von einer fast identischen molaren Extinktion der betrachteten IF und ihrer Metabolite ausgegangen werden kann. Lediglich für das 3'-Hydroxy-IRI liegt die Absorption etwa 20% unter jener der anderen Derivate.

Bestimmung der kinetischen Parameter der Umsetzung von Irilon durch CYP 1A1

Steigende Konzentrationen (1,9 µM bis 18,5 µM) IRI werden unter den oben beschriebenen Bedingungen (Tabelle 6) mit CYP 1A1 zur Aufnahme enzymkinetischer Daten inkubiert. Dabei wird für jede Konzentration eine Dreifachbestimmung sowie Doppelbestimmungen der Kontrollwerte durchgeführt. Die Ergebnisse werden als prozentualer Anteil, bezogen auf den jeweiligen Mittelwert der Kontrollwertbestimmungen, berechnet. Da mehrere Produkte gebildet werden, wird die Abnahme des Substrates (IRI) gemessen. Die Aktivität des Enzyms wird nach Formel (3) in Anhang 6.1 berechnet, wobei die Stoffmenge des Produktes sich aus der

eingesetzten Ausgangsstoffmenge an Substrat abzüglich der nach Inkubation verbliebenen Substratmenge ergibt.

Die Auswertung der enzymkinetischen Daten erfolgt nach Michaelis-Menten durch Auftragung der errechneten Aktivitäten gegen die IRI-Konzentration. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter k_m und V_{max} erfolgt nach Anwendung der Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee. Diese Verfahren werden in Abschnitt 2.2.4 ausführlich vorgestellt.

Coinkubation von Irilon und Formononetin mit CYP 1A1

Zur Untersuchung inwieweit die mögliche Bildung eines MI-Komplexes zwischen CYP 1A1 und IRI die metabolische Aktivität von CYP 1A1 beeinflusst, werden parallel eine Coinkubation von IRI und FORM sowie eine Inkubation von FORM allein jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Anteile der gebildeten FORM-Metabolite verglichen. Um konstante DMSO-Konzentrationen aufrecht zu erhalten, wird den Ansätzen ohne IRI-zusatz ein entsprechendes Volumen reinen DMSO zugegeben. Alle weiteren Inkubations-, Extraktions- und Chromatographiebedingungen werden analog den für die Inkubationen von CYP 1A1 mit IRI, FORM und BioA (Tabelle 6) allein beschriebenen Bedingungen gewählt. Die CYP-Konzentration beträgt also 0,1 nmol CYP/mL Ansatz bei einer IRI-Konzentration von 18,5 μ M bzw. einer FORM-Konzentration mit 21,5 μ M. Entsprechende Ansätze werden mit Vorinkubation des IRI zur Bildung des MI-Komplex durchgeführt. Hierzu wird das Enzym 30 min unter Standardbedingungen mit IRI vorinkubiert und dann das zu untersuchende Substrat FORM zugegeben. Die Substrat- und Enzymmengen sowie Extraktion und Analyse werden nicht verändert.

Einsatz von Decanol als Displacer

Displacer können an Enzyme gebundene Substrate bzw. ihre Metaboliten verdrängen (Dickins et al., 1979). Um eine mögliche Bindung von IRI an

die MIKs mit Hilfe eines solchen Verdrängungsvorganges zu untersuchen, wird der Einfluss von Decanol auf die Wiederfindung von IRI und seinen Metaboliten bei Inkubation mit RLM analysiert. Decanol wird von Dickins et al. als eine der effektivsten Displacer-Substanzen beschrieben.

Es werden Inkubationen mit IRI durchgeführt, die nach einer 60 minütigen Inkubation mit einer definierten Menge Decanol (2 μmol /Ansatz entsprechend einer Konzentration von 1 mM) versetzt werden. Nach der Zugabe des Displacers wird weitere 30 min im Schüttelbad inkubiert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC-DAD analysiert. Die gefundenen Gehalte mit und ohne Einsatz von Decanol werden verglichen. Die Vergleichswerte entstammen einer Umsetzung ohne Displacer-Zusatz, die nach 60 min abgestoppt und wie üblich extrahiert wird. Ferner wird überprüft, ob die Dauer der Einwirkung von Decanol auf den postulierten MI-Komplex einen Einfluss auf die Extrahierbarkeit von IRI und seinen Metaboliten hat. Dazu wird jeweils 15, 30, 45 und 60 min nach Displacerzugabe weiterinkubiert, dann abgestoppt und extrahiert.

Chromatographische Bedingungen

Die HPLC-DAD Analyse erfolgt entsprechend Kapitel 2.1.2.

2.2.4 Auswertung enzymkinetischer Daten

Die Bestimmung der Enzymaktivität und der ihr zugrunde liegenden spezifischen Kinetik einer *in vitro* Umsetzung ermöglicht ein systematisches Verständnis einzelner metabolischer Reaktionen. Durch die Aufnahme und Auswertung enzymkinetischer Daten aus *in vitro* Untersuchungen kann die Biotransformation von Xenobiotika in verschiedenen Geweben beschrieben und Rückschlüsse auf den *in vivo* Ablauf gezogen werden. Die Affinität eines Enzyms zum Substrat kann so als Michaelis-Menten-Konstante k_m (Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit) und die Leistungsfähigkeit eines Enzyms als V_{max} (maximaler Umsatz pro Zeit und Enzymmenge) ausgedrückt werden. Hieraus lassen sich toxikologische Parameter wie die

metabolische Inaktivierung, ausgedrückt als intrinsische Clearance (Cl_{int}), *in vitro* als Quotient von V_{max}/k_m ableiten. Der Situation *in vivo* wird Cl_{int} nur bedingt gerecht, da sowohl die Adsorption an Bestandteile des Blutes wie auch die Tatsache, dass durch den Fluss des Blutes kein statisches System vorliegt, nicht einbezogen werden (Venkatakrisnan et al., 2001). Ebenso kann die Berechnung für Cl_{int} nicht für alle atypischen Kinetiken angewendet werden (siehe Kapitel 2.2.4.3).

2.2.4.1 Klassische Kinetik

Das klassische kinetische Modell beschreibt den Reaktionsverlauf von einem Substrat über einen Enzym-Substratkomplex zur Umsetzung zum Produkt durch katalytische Einwirkung des Enzyms. Die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion ergibt sich aus den drei bestimmenden Einflussgrößen a) Bildung des Komplex, b) Zerfall des Komplex in Enzym und Substrat sowie c) Umsetzung zu Produkt und Enzym. Unter der Annahme einer vollständig ablaufenden Reaktion kann die Michaelis-Menten-Gleichung (Kapitel 6.1, Formel (4)) abgeleitet werden. Bei graphischer Auftragung von Substratkonzentration S gegen Reaktionsgeschwindigkeit v entsteht für eine enzymatische Umsetzung, die diesem kinetischen Modell entspricht, eine hyperbelförmige Kurve.

2.2.4.2 Ermittlung enzymkinetische Parameter

Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter kann aus der graphischen Darstellung von S gegen v durchgeführt werden, indem V_{max} als maximale Geschwindigkeit und k_m aus der daraus folgenden Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit abliest. Gängigere Verfahren zur Ermittlung sind aber Linearisierungsverfahren, bei denen die experimentellen Daten in eine andere Darstellungsform transformiert werden. Im Zuge dieser Arbeit sind drei Verfahren von Bedeutung, die hier knapp eingeführt werden.

Lineweaver-Burk

Durch die doppelt reziproke Auftragung von $1/S$ gegen $1/v$ resultiert aus Umsetzungen, welche der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgen eine Gerade, deren Achsenabschnitte den enzymkinetischen Parameter k_m und V_{max} entsprechen. Problematisch bei diesem Verfahren ist die ungleichmäßige Verteilung der Datenpunkte und damit die Stauchung zum Koordinatenursprung hin sowie die Tatsache, dass umgekehrt die Wertepaare bei geringer Substratkonzentration einen sehr großen Einfluss bekommen. Kleine Fehler bei der Bestimmung von v ergeben bei kleinen Werten für $[S]$ eine große Abweichung in $1/v$, bei großen Werten für $[S]$ sind diese eher zu vernachlässigen. Dies ist im vorliegenden Fall besonders problematisch, da diese Wertepaare in der Nähe der apparativ bedingten Bestimmungsgrenze liegen und somit zwangsläufig mit einer größeren Unsicherheit behaftet sind. Im Falle des Vorliegens von atypischen Kinetiken (siehe Kapitel 2.2.4.3) ergibt sich deutlich erkennbar keine Gerade zur Auswertung.

Eadie-Hofstee

Beim Auftragen von v gegen v/S erhält man bei nicht gehemmter oder induzierter Kinetik eine lineare Funktion, wobei V_{max} dem Ordinaten-schnittpunkt und $-k_m$ der Steigung der Geraden entspricht. Für die häufigsten atypischen Kinetiken ergeben sich in dieser Darstellungsform charakteristische Kurvenverläufe, die eine Identifikation erleichtern. Der zentrale Nachteil der Eadie-Hofstee-Linearisierung besteht in der fehlenden Variablen-trennung, da v in beide Koordinaten eingeht sowie einer Verzerrung der Fehlergrenzen durch den Einfluss des reziproken Wertes der Substratkonzentration. Die Fehlergrenzen weiten sich von der Mitte des Diagramms hin zu niederen und zu hohen Substratkonzentrationen auf (Bisswanger, 2000).

Hanes

Bei der Linearisierung nach Hanes wird S/v gegen S aufgetragen, und die Werte für k_m und V_{max} lassen sich aus dem negativen Ordinatenabschnitt sowie dem reziproken Wert der Steigung ablesen. Zwar findet auch hier keine Variablentrennung statt, da S in beide Koordinaten eingeht, im Vergleich zum Verfahren nach Eadie-Hofstee stellt die Substratkonzentration aber die wesentlich weniger fehlerbehaftete Größe dar als die errechnete Reaktionsgeschwindigkeit v . Ungenauigkeiten in einzelnen Messungen werden weiterhin entlang der S -Achse unverzerrt wiedergegeben. Eine charakteristische Indikation von atypischen Kinetiken findet in dieser Darstellung nicht statt.

2.2.4.3 Atypische Kinetiken

Wenn ein Enzym nicht den Annahmen der Michaelis-Menten-Gleichung (s.o.) gerecht wird, indem es zum Beispiel mehr als eine Substratbindungsstelle aufweist oder durch hohe Substrat- bzw. Produktkonzentrationen gehemmt wird, kommt es zu einer deutlich abweichenden Kinetik. Für die vorliegende Fragestellung der Ermittlung eines enzymkinetischen Profils für die metabolische Umsetzung von IRI sind nur zwei mögliche atypische kinetische Modelle von größerer Bedeutung, auf die kurz eingegangen wird (Houston and Kenworthy, 2000).

(Substrat- oder Produkt-) Hemmung

Eine Hemmung tritt auf, wenn entweder die durch enzymatische Umsetzung erzeugten Produkte (Produkthemmung) oder das Substrat selbst (Substrathemmung) ab einer gewissen Schwellenkonzentration inhibitorisch auf die Enzymreaktion einwirken. In der Darstellung nach Michaelis-Menten lässt sich in diesen Fällen beobachten, dass die Geschwindigkeit ein Maximum durchläuft, bei weiter steigender Substratmenge aber wieder abfällt. Wird eine solche atypische Kinetik nicht erkannt und die Daten nach Lineweaver-Burk ausgewertet, werden

falsche Ergebnisse für die enzymkinetischen Parameter erhalten, da V_{\max} zu niedrig kalkuliert wird. Infolge dessen wird auch die Cl_{int} als zu gering berechnet. In Konzentrationsbereichen, die noch nicht im gehemmten Bereich liegen, oder für sehr schwach gehemmte Kinetiken ergibt jedoch eine Auswertung im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik gemäß Kapitel 2.2.4.2 nahezu identische Werte, da die Parameter k_m und V_{\max} in gleicher Weise als zu gering berechnet werden. Cl_{int} als Quotient dieser Parameter bleibt folglich konstant (Houston and Kenworthy, 2000). Zur Erkennung einer gehemmten Kinetik ist die Auswertung nach Eadie-Hofstee besonders geeignet. Bei Vorliegen einer solchen Kinetik beschreibt die graphische Darstellung eine deutliche nach unten geöffnete Kurve anstelle einer Geraden (Houston and Kenworthy, 2000).

Autoaktivierung

Bei einer autoaktivierten Kinetik fungiert das Substrat selbst als eine für das Enzym aktivitätssteigernd wirkende Substanz. Dies hat einen sigmoiden Verlauf der Kurve in der Auftragung von S gegen v zur Folge. Nach einem sehr schwachen Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei niedrigen Substratkonzentrationen bewirken steigende Substratkonzentrationen eine zusätzliche Aktivierung der Enzymaktivität. Wie schon von der Kinetik nach Michaelis-Menten bekannt, strebt auch eine autoaktivierte Kinetik einer maximalen Aktivität entgegen. Je nach Ausprägung der Autoaktivierung kann dieser kinetische Typ mehr oder weniger leicht erkannt werden. Für den Fall einer schlechten Detektierbarkeit der Umsetzung bei geringen Substanzmengen ist erneut die Darstellung nach Eadie-Hofstee hilfreich, da sie für eine sigmoide Kinetik eine typische zur y -Achse hin geöffnete Ellipse an Stelle einer Geraden beschreibt. Eine Auswertung entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik führt dementsprechend zu falschen Resultaten. Insbesondere ist die katalytische Effizienz Cl_{int} hier anders zu berechnen, da es keinen echten k_m -Wert gibt. Cl_{int} berechnet sich hier nach Formel (5) (Kapitel 6.1).

2.3 *In vitro* Phase-II-Metabolismus von Irilon

2.3.1 Extraktion von Irilon

Für qualitative Vorversuche wird IRI, das zu Beginn dieser Arbeit nicht kommerziell verfügbar war, semipräparativ aus dem Rhizom von *Iris germanica* isoliert. Ein ethanolischer Extrakt dieser Pflanze (Fa. Weleda) enthält, wie auch die Pflanze selbst, in ganz überwiegendem Maße glucosidisch gebundenes IRI (Atta Ur et al., 2002), welches zunächst hydrolysiert und anschließend mittels semipräparativer HPLC abgetrennt werden muss.

Im Kleinmaßstab wird dazu ein Aliquot der ethanolischen Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Nach Zugabe von 0,15 M Natriumacetatpuffer wird der pH-Wert mit Eisessig auf 5 eingestellt. Die enzymatische Hydrolyse durch β -Glucosidase und β -Glucuronidase (aus *Helix pomatia*) erfolgt bei 37 °C für ca. 16 h auf dem Schüttelwasserbad. Nach Beendigung der Inkubation wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert und durch Destillation das organische Lösungsmittel abgetrennt. Nachdem der Rückstand in Methanol/bidestilliertem Wasser aufgenommen wurde, erfolgt die Abtrennung von IRI von den anderen Bestandteilen des Extraktes mittels semipräparativer HPLC. IRI wird fraktioniert aufgefangen, und das Eluat im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Methanol (80%) gelöst und die erhaltene Fraktion zur Überprüfung auf Reinheit mittels HPLC-UV-MS vermessen. Im UV-Chromatogramm sind vernachlässigbar geringe Verunreinigungen zu erkennen. Es wird davon ausgegangen, dass keine weiteren Verunreinigungen auftreten, die nicht mit UV oder MS detektiert werden können.

Geräteparameter und chromatographische Bedingungen:

stationäre Phase	Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 10*3,0 mm, 3,0 µm (Bischoff, Leonberg) Trennsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 150*3,0 mm, 3,0 µm (Bischoff, Leonberg)	
mobile Phase	A: Ameisensäure (0,1%) B: Acetonitril	
Gradient	t (min)	%B
	0	15
	50	35
	60	40
	63	90
	64	90
	67	15
Flussrate	0,6 mL/min	
Aufgabevolumen	40 µL	
Detektion	UV (270 nm), Agilent 1100 series DAD, (Agilent Technologies, Böblingen)	
	MS-ESI(neg), Agilent MSD G1946A, (Agilent Technologies, Böblingen)	
	Kapillarspannung: 3500 V	
	Fragmentorspannung: 80 V	
	Zerstäuberdruck: 60 psi	
	Trockengasfluss: 12,5 L/min	
	Trocknungsgastemperatur: 350 °C	
	Messmodus: scan (50-650 amu)	

2.3.2 Mikrosomen

Die zur Untersuchung des Phase-II-Metabolismus verwendeten Leber-MIKs wurden entweder käuflich erworben oder von anderen Institutionen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Humanlebermikrosomen (HLM) sind gepoolt von fünf weiblichen und fünf männlichen Individuen. Tabelle 9 gibt einen Überblick über den Proteingehalt der verwendeten Leber-MIKs verschiedener Spezies.

Tabelle 9: Proteingehalte und Bezugsquellen der in der Phase-II-Umsetzung verwendeten Lebermikrosomen verschiedener Spezies.

Spezies	Bezugsquelle	Proteingehalt mg/mL
Mensch (HLM)	Advancell (Barcelona, Spanien)	38,4
Ratte (RLM)	BfE (Karlsruhe)	17,5
Schwein (SLM)	AK Metzler (Karlsruhe)	7,0

2.3.3 Untersuchungen mit Lebermikrosomen

Mikrosomale Inkubationen

In den MIKs liegen die katalysierenden Enzyme membrangebunden vor. Im Gegensatz zu den CYPs liegen die UGTs auf der luminalen Seite des ER. Die ER-Membran stellt in diesem Fall eine Barriere für Substrate, Produkte und Cofaktoren dar (Meech and Mackenzie, 1997). He et al. zeigten (He et al., 1996), dass Alamethicin, ein aus *Trichoderma viride* isoliertes Peptidantibiotikum, in diese Membran eindringt und Poren bildet. Bei Glucuronidierungsreaktionen, in denen die MIKs vorher mit Alamethicin behandelt werden, ist die Bildung der Glucuronide um das zwei- bis dreifache erhöht (Fisher et al., 2000). Die Aktivität der Glucuronidierung kann durch die Zugabe von Magnesiumchlorid in Konzentrationen bis 10 mM zusätzlich verstärkt werden. Der Einfluss verschiedener Metallionen auf die Bildung der Glucuronide wurde von Matern et al. (1994) untersucht (Matern et al., 1994). Die maximale enzymatische Aktivität wird in Gegenwart von Magnesiumionen erreicht. Eine wichtige Rolle spielt auch der Inkubationspuffer. Bei dem Vergleich zwischen Phosphat- und TRIS/Malat-Puffer zeigten Soars et al. (2003), dass bei der Verwendung von Phosphatpuffer (pH 7,1) die Bildung des Estradiol-3-Glucuronids um das 2,5-fache erhöht ist (Soars et al., 2003). Im menschlichen Organismus können die gebildeten Glucuronide durch β -Glucuronidasen, die in der intakten Zelle in Lysosomen vorliegen, wieder hydrolysiert werden. Bei der MIK-Herstellung können diese Enzyme freigesetzt werden und zur verstärkten Spaltung von Glucuroniden führen. Dieser Effekt ist *in vitro* unerwünscht und wird durch Zugabe von D-Saccharsäure-1,4-Lacton gehemmt (Matern et al., 1994). Andere inhibitorische Effekte werden durch organische Lösungsmittel wie DMSO, Acetonitril und verschiedene Arzneimittel, zum Beispiel Diclofenac und Probenecid, beschrieben (Uchaipichat et al., 2004). DMSO reduziert ab einer Konzentration von über 1% die enzymatische Aktivität der Enzyme messbar. Die Substrate werden in den meisten Protokollen in DMSO gelöst und aufbewahrt. Bei den Glucuronidierungsansätzen ist deshalb darauf zu

achten, dass die DMSO-Konzentration in allen Ansätzen einheitlich ist und 1% nicht übersteigt. Die UGT-Enzyme benötigen als Cosubstrat aktivierte Glucuronsäure (UDPGA). Dieses muss den Inkubationsansätzen hinzugefügt werden (King et al., 2000). Eigene Vorversuche haben ergeben, dass für eine optimale Glucuronidierung eine Konzentration von 4 mM UDPGA im Ansatz erforderlich ist.

Aufarbeitung der Inkubationsansätze

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, um Substrat und Produkte aus dem Inkubationsansatz zu extrahieren (Fisher et al., 2000; Uchaipichat et al., 2004). Vorversuche haben bei IRI als Substrat die besten Ergebnisse für die Methode nach Matern et al. mit leichten Modifikationen geliefert (Matern et al., 1994). Dabei wird die Reaktion durch die Zugabe von Glycin-HCl-Puffer gestoppt, und die Glucuronide werden mit Ethylacetat aus dem Inkubationsansatz extrahiert. Die organische Phase wird unter Stickstoffstrom getrocknet, in 80%igem Methanol aufgenommen und zur chromatographischen Trennung (siehe Kapitel 2.3.1) eingesetzt. Zusätzlich wird ein reiner IRI-Standard in gleicher Konzentration, jedoch ohne Ethylacetat-Extraktion mittels HPLC-DAD analysiert. Anhand der Flächensumme von Glucuroniden und unkonjugiertem Substrat aus der Umsetzung und diesem Standard, lässt sich ableiten, dass die Extraktion nahezu quantitativ erfolgt, da die erhaltenen Flächen fast identisch sind. Das folgende Protokoll dient als Basis für die gesamten in dieser Arbeit durchgeführten Glucuronidierungsansätzen mit MIKs und Supersomen. Lediglich die Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten werden variiert.

Tabelle 10: Standardprotokoll zur Durchführung der Glucuronidierungen am Beispiel der Inkubation von Irilon mit Rattenlebermikrosomen (RLM).

Zugabe von	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Phosphatpuffer	93 µL	100 mM
MgCl ₂	20 µL	10 mM
Alamethicin	50 µL	25 µg/mL
RLM	3 µL	0,25 mg/mL
10 min Vorinkubation auf Eis		
Irilon	2 µL	100 µM
Saccharo-Lacton	10 µL	5 mM
5 min Vorinkubation bei 37 °C		
UDPGA	20 µL	4 mM
90 min Inkubation bei 37 °C		

2.3.4 Untersuchungen mit UGT-Supersomen[®]

Die eingesetzten Supersomen[®] sind Enzympräparationen, die aus mit der DNA einzelner humaner metabolischer Enzyme transfizierten Insektenzellen hergestellt werden. Diese enthalten somit jeweils nur eine definierte Isoform der humanen UGTs. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich UGTs aus humaner DNA verwendet werden, wird auf die Bezeichnung „human“ im Weiteren verzichtet. Die Supersomen[®] wurden von verschiedenen Firmen bezogen und weisen unterschiedliche Enzymkonzentrationen auf (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Enzymkonzentrationen und Bezugsquellen der verschiedenen Isoformen der Supersomen.

Isoform	Bezugsquelle	Proteingehalt mg/mL (Herstellerangaben)
UGT 1A1	BD Biosciences (Heidelberg)	5,0
UGT 1A4	BD Biosciences (Heidelberg)	5,0
UGT 1A7	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)	10,8
UGT 1A8	BD Biosciences (Heidelberg)	5,0
UGT 1A9	BD Biosciences (Heidelberg)	5,0
UGT 1A10	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)	10,7
UGT 2B15	BD Biosciences (Heidelberg)	5,0

Bestimmung der UGT-Enzymaktivität

Bevor die Supersomen und die MIKs für enzymkinetische Umsetzungen verwendet werden, muss deren Aktivität festgestellt werden. Dafür werden Inkubationsversuche mit einem Substrat durchgeführt, von dem bekannt ist, dass es von den zu untersuchenden UGTs glucuronidiert wird. Das verwendete Substrat ist 7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (7-HFC). Es wird auch als 4-(Trifluoromethyl)umbelliferon bezeichnet.

In dieser Arbeit wird im Folgenden 7-HFC als Bezeichnung für das Substrat und 7-HFC-GlucA für das Glucuronid (7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin-Glucuronid; $M = 338 \text{ g/mol}$), welches bei den Umsetzungen entsteht, verwendet.

Bei den Enzymaktivitätsbestimmungen für die UGTs werden laut Anweisungen der Firma BD Gentest verschiedene Enzymkonzentrationen für die einzelnen Enzyme eingesetzt. Für das Isoenzym UGT 1A7 wird eine mittlere Enzymkonzentration gewählt, da kein Datenblatt der Firma PANVERA verfügbar ist. Die Aktivität der MIKs wird in der Regel nicht bestimmt. MIK-Präparationen enthalten eine große Anzahl verschiedener Enzyme (Venkatakrishnan et al., 2001), eine Aktivitätsbestimmung gibt keinen Aufschluss über einzelne aktive oder nicht aktive Enzyme, sondern lediglich über eine summarische Aktivität. Da die zur Verfügung stehenden MIKs von verschiedenen Quellen bezogen und unterschiedlich lange bei -84 °C gelagert wurden, wird ihre Aktivität zur Sicherheit überprüft. Ein unspezifischer Vergleich der Aktivität in Bezug auf 7-HFC innerhalb der verschiedenen MIKs ist dann möglich (Ghosal et al., 2004a).

Verwendete Lösungen

Die Lösungen für den Inkubationsansatz sind detailliert in Kapitel 6.2.3.2 aufgeführt.

- 7-HFC, 2,5 mM gelöst in DMSO/Phosphatpuffer (pH 7,4) (v/v, 50/50)
- 7-HFC-GlucA, 4,47 mM gelöst in Methanol.

Durchführung

Die Aktivitätsbestimmung der Enzyme wird in einem Gesamtvolumen von 200 μL durchgeführt. Die zu pipettierenden Mengenangaben werden dem Pipettierschema (Tabelle 12) entnommen.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Umsetzung von 7-HFC zur Aktivitätsbestimmung der eingesetzten Enzyme.

UGTs/	Enzym	Phosphat-puffer	MgCl ₂ (10 mM)	Alamethicin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Lacton (5 mM)	7-HFC (50 μM)	UDPGA (4 mM)
Mikrosomen	[μL]	[μL]	[μL]	[μL]	[μL]	[μL]	[μL]
UGT 1A1	40	56	20	50	10	4	20
UGT 1A4	10	86	20	50	10	4	20
UGT 1A7	9	87	20	50	10	4	20
UGT 1A8	10	86	20	50	10	4	20
UGT 1A9	2	94	20	50	10	4	20
UGT 1A10	13	83	20	50	10	4	20
UGT 2B15	10	86	20	50	10	4	20
RLM	1	95	20	50	10	4	20
SLM	1	95	20	50	10	4	20
HLM	1	95	20	50	10	4	20

Die Bestimmung der Enzymaktivität für das Isoenzym UGT 1A10 erfolgt laut Herstellerangabe mit 17β -Estradiol als Substrat. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Ghosal et al., 2004b; Uchaipichat et al., 2004) wird aber auch für dieses Isoenzym 7-HFC als Substrat verwendet. Da 17β -Estradiol-glucuronid als Standard zur Kalibrierung nicht zur Verfügung steht, wird in dieser Arbeit 7-HFC als Substrat für UGT 1A10 verwendet. Für die Aktivitätsbestimmung von UGT 1A4 wird nach Ghosal et al. (Ghosal et al., 2004b) Trifluorperazin als Substrat verwendet. Da Trifluorperazin und das zugehörige Glucuronid nicht zur Verfügung stehen, wird die Inkubation von UGT 1A4 mit 7-HFC als Referenzwert für ein nicht umsetzendes Isoenzym verwendet.

Die Inkubationsbedingungen aus Tabelle 10 (Glucuronidierungsansätze) werden für alle Enzyme und MIKs angewendet. Für den Inkubationsansatz wird 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 vorgelegt (Pipettierschema Tabelle 12). Nach Addition von 10 mM Magnesiumchlorid, Alamethicin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und den Enzymen/MIKs in entsprechender Konzentration (Tabelle 12) wird für 10 min auf Eis inkubiert. 5 mM Saccharo-Lacton und 5 μM Substrat (7-HFC) werden zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 37 °C

vorinkubiert. Nach der Zugabe von 4 mM UDPGA erfolgt die Inkubation für 20 min bei 37 °C im Wasserschüttelbad. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0,7 M Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2) gestoppt. Nach zweimaliger Extraktion mit Ethylacetat werden die vereinigten organischen Phasen unter Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird in 200 µL Methanol (80%) aufgenommen und direkt zur chromatographischen Trennung eingesetzt (Chromatographiebedingungen in Kapitel 2.3.1).

Kalibrierung mit 7-HFC-GlucA

Die Quantifizierung von 7-HFC-GlucA erfolgt anhand einer externen Kalibriergerade in einem Bereich von 0,5-100 µM. Zur Aufnahme der Kalibriergeraden werden die unterschiedlichen Verdünnungen analog den Inkubationsansätzen mit Ethylacetat extrahiert, zur Trockene gebracht und nach Aufnahme in Methanol (80%) mittels HPLC-DAD analysiert. Auf diesem Weg sollen Aufarbeitungsverluste kompensiert und Versuchsbedingungen angepasst werden. Es wird eine lineare Kalibrationsfunktion mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Peakfläche} = 258,3 \cdot c \text{ [nmol/40 } \mu\text{L]} - 32,2 \quad \text{mit } R^2 = 0,993$$

Bestimmungsgrenze (9-faches Signal/Rausch-Verhältnis):

0,013 nmol entsprechend 3,4 ng pro Injektion

Voruntersuchung auf IRI glucuronidierende UGTs und Mikrosomen

Durch eine Voruntersuchung soll ermittelt werden, ob IRI durch Leber-MIKs der verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte und Schwein) glucuronidiert wird und welche Glucuronide dabei gebildet werden. Darüber hinaus werden sieben spezifische UGT-Enzyme auf ihre Fähigkeit, IRI glucuronidieren zu können, hin untersucht. Zur Verfügung stehen die UGTs 1A1, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 und 2B15, die eine Auswahl an jenen Enzymen darstellen, die ähnliche Substrate umzusetzen (King et al., 2000). Die Inkubationsansätze für dieses Screening werden bei zwei

Substratkonzentrationen (2,5 μM und 25 μM) gemäß dem in Tabelle 13 angegebenen Pipettierschema durchgeführt.

Tabelle 13: Pipettierschema zum Screening der Mikrosomen und UGTs auf Metabolisierung von Irilon. Die Substratlösung von Irilon wird jeweils so angepasst, dass finale Konzentrationen von 2,5 μM und 25 μM resultieren. Zusätzlich enthalten alle Ansätze MgCl_2 , Alamethicin, Saccharo-Lacton und UDPGA entsprechend Tabelle 10.

UGTs/Mikrosomen	Konzentration (Protein) [mg/mL]	Volumen (Enzymsusp.) [μL]	Volumen (Puffer) [μL]	Volumen (Substrat) [μL]	Inkubationszeit [min]
UGT1A1	0,375	15	83	2	30
UGT1A9	0,375	15	83	2	30
UGT1A10	0,375	7	91	2	15
UGT1A7	0,375	7	91	2	120
UGT1A8	0,375	15	83	2	30
UGT1A4	0,375	15	83	2	30
UGT2B15	0,375	15	83	2	30
RLM	0,250	3	95	2	90
SLM	0,140	4	94	2	60
HLM	0,288	1,5	96,5	2	60

Enzymkinetische Bestimmung von k_m und V_{max}

Um die Kinetik einer Reaktion zu erfassen, ist es wichtig im linearen Bereich der Enzymaktivität zu arbeiten. Für die Versuchsparameter Inkubationszeit und Enzymkonzentration muss diese Linearität gegeben sein. Das heißt, bei einer Verdoppelung der Inkubationszeit muss auch der Umsatz doppelt so hoch sein. Dasselbe gilt für die Enzymkonzentration.

Für unterschiedliche Substrate und UGTs bzw. MIKs werden unterschiedliche Inkubationszeiten für den Umsatz benötigt. Alkharfy und Frye inkubierten 17β -Estradiol 60 min lang mit Human- und Rattenlebermikrosomen (Alkharfy and Frye, 2002). Fisher et al. dagegen beschreiben, dass die Glucuronidierung von 17β -Estradiol mit HLM nur bis 30 min Inkubationszeit linear ist, weil bei höheren Inkubationszeiten die UGTs denaturiert werden (Fisher et al., 2000). Hingegen zeigten Doerge et al., dass die Glucuronidierung der IF GEN und DAI mit HLM und verschiedenen UGTs über 180 min linear verläuft (Doerge et al., 2000). Genauso variabel wird der Einsatz an Enzymkonzentrationen beschrieben. Doerge et al. setzten für ihre Inkubationsversuche 0,25 mg/mL mikrosomales Protein ein (Doerge et al., 2000), während Alkharfy und Frye mit der doppelten Konzentration bei der Glucuronidierung von

17 β -Estradiol arbeiteten (Alkharfy and Frye, 2002). Diese unterschiedlichen Angaben zeigen, dass die Bestimmung der Inkubationsbedingungen für die Glucuronidierung von IRI nötig ist. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} einer Reaktion wird die Enzymaktivität [v] in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [S] gemessen. Der gewählte Arbeitsbereich wird dabei bewusst niedrig gewählt, um der Situation *in vivo* möglichst nahe zu kommen. Die Plasmakonzentration der IF nach Aufnahme über die normale Nahrung wird mit 1 μ M beschrieben, während Gewebe IF-Konzentrationen bis über 5 μ M enthalten können (Gu et al., 2005; Rüfer, 2005).

Es werden Konzentrationen des Substrats von 2,5-150 μ M (bei den mikrosomalen Umsetzungen) bzw. 2,5-75 μ M (bei den Inkubationen mit UGTs) gewählt, welche die physiologische Situation *in vivo* gerade noch umfassen, allerdings bis zu *in vivo* nicht erreichbaren Maximalkonzentrationen ansteigen, um ein vollständiges enzymkinetisches Profil abbilden zu können. Die weiteren Parameter entsprechen denen aus Tabelle 13 unter Anpassung der Substratkonzentration.

HPLC-DAD-Quantifizierung mittels externer Kalibrierung

Zur Quantifizierung von IRI und seinen Glucuroniden nach HPLC-Trennung wird eine externe Kalibrationsgerade erstellt. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 270 nm und ergibt eine lineare Kalibration mit $y = 13,7x - 0,22$ im Bereich von 1,2-240 ng auf der Säule entsprechend einer Bestimmungsgrenze (entsprechend einem Signal/Rausch-Verhältnis von 9) von 30 ng/mL bzw. 0,1 nmol/mL.

Die Quantifizierung der gebildeten Glucuronide kann nicht kalibriert werden, da die entsprechenden Substanzen nicht kommerziell oder synthetisch zugänglich sind. Die Bestimmung der gebildeten Stoffmenge Glucuronid wird daher unter der Annahme gleicher molarer Extinktionskoeffizienten für IF und die entsprechenden Glucuronide durchgeführt. Die Zulässigkeit dieses Vorgehens kann daraus abgeleitet werden, dass die Summe der bestimmten Flächen aus Substrat und

Produkt gut mit der Fläche übereinstimmen, die aus dem Kontrollansatz für IRI ohne Zusatz des Cosubstrates erhalten wurden. Sofern die Glucuronide eine abweichende Absorption zeigen würden, hätte die ermittelte Flächensumme in den Umsetzungen sich im Vergleich zum Kontrollwert ändern müssen.

Die Aktivität der Enzyme wird als „*Relative Reaction Progress*“ (RRP) nach Formel (6) (Anhang 6.1) angegeben. Der RRP spiegelt die Stoffmenge des gebildeten Produktes relativ zur Summe von detektiertem Produkt und Edukt wider. Da IRI und seine Glucuronide ganz ähnliche molare Absorption im UV zeigen, fungiert hier die Berechnung unter Bezug auf die Flächensumme gleichermaßen zur Kompensation von Pipettier- oder Injektionsfehlern.

2.4 Umsetzung von Irilon mit humaner fäkaler Mikroflora

Zusätzlich zu den *in vitro* Untersuchungen des Phase-I- und Phase-II-Metabolismus werden Versuche zur reduktiven Umsetzung mit humaner fäkaler Mikroflora (HFM) für IRI durchgeführt.

2.4.1 Durchführung

Die Inkubation von IRI mit HFM wird in Zusammenarbeit mit der Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung (DIfE) in Potsdam durchgeführt. Zur *in vitro* Untersuchung des reduktiven Metabolismus werden Stuhlproben von sieben weiblichen und drei männlichen Spendern (Alter zwischen 20 und 51 Jahren; Ø 36,1 Jahre) verwendet und sauerstofffrei bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. In den letzten sechs Monaten vor der Abgabe der Stuhlprobe haben die Spender keine Antibiotikatherapie vorgenommen und waren bei Abgabe der Probe gesund. Die zur Inkubation verwendete Suspension wird durch Verdünnung von 1 g Fäzes in 10 mL ST-Medium (siehe Kapitel 6.2.3.3) nach Braune et al. gewonnen (Braune et al., 2001). Zur Inkubation wird die Suspension 1:20 in ST-Medium verdünnt und 1% (v/v) IRI in DMSO zu einer Endkonzentration von 190 µM zugesetzt. Bei einer Temperatur von 37 °C werden die Fäzesproben mit IRI, eine Kontrolle ohne Fäzeszugabe sowie eine Kontrolle ohne Substrat für 96 h inkubiert. Als Vergleich zu anderen IF wird analog mit GEN verfahren. Nach jeweils 0, 4, 8, 24, 48 und 96 h Inkubation wird ein Aliquot von 300 µL aus allen Ansätzen entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Zur Extraktion werden die Aliquote mit 30 µL 0,1 M HCl angesäuert und zweimal mit je 600 µL Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge werden die vereinigten Extrakte in 500 µL Methanol (80%) zur weiteren Analyse aufgenommen.

2.4.2 Analyse mittels HPLC-ESI(+)-MS/MS

Um Strukturinformationen über mögliche Metabolite erhalten zu können, wird ein Teil der extrahierten Lösung mittels HPLC-ESI(+)-MS/MS analysiert. Die hierfür verwendeten chromatographischen und apparativen Parameter werden wie folgt gewählt:

Shimadzu (Langenfeld)	L-5000 LC Controller LC-10ADVP Pumpe DGU-14A Degaser SIL-HT-A Autosampler CTO-10AVP Säulenofen SPD-10AVVP UV-Detektor		
Applied Biosystems (Darmstadt)	API 2000 tandem MS mit Turbo Ionenspray Quelle		
stationäre Phase	Supelco Discovery C 18 (150 mm * 2.1 mm, 5,0 µm) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH München)		
mobile Phase	A: Ameisensäure (0,1 %; pH 3,0) B: Acetonitril		
Gradient	Zeit [min]	%A	%B
	0	20	80
	20	30	70
	30	45	55
	50	60	40
	55	90	10
	58	90	10
	63	20	80
68	20	80	
Flussrate	0,3 mL/min		
Säulentemperatur	isotherm, 40 °C		
Aufgabevolumen	25 µL		
Detektion	UV (260 nm)		
	Elektrospray-Spannung 5000 V (positiver Modus) Zerstäubergas 30 psi Trocknungsgas 40 psi; 450 °C Declustering potential 76 V Entrance potential 11,5 V Focussing potential 370 V Collision energy 40 V Collision exit potential 6 V		
MS/MS	zwischen 100 amu und der Masse des Mutterions (scan Zeit 2 sec)		
Fullscan	100-650 amu		
Applied Biosystems	Analyst 1.4.1 Auswertesoftware		

2.4.3 Analyse mittels GC-EI-MS/MS

Zur GC-EI-MS-Analyse werden 100 µL der wie unter 2.4.1 beschriebenen aufgearbeiteten Probelösung in einen 250 µL-Mikrovialeinsatz gegeben. Dazu werden 10 µL einer methanolischen GLYC-Lösung (7,7 µg/mL in Methanol mit 1% DMSO (v/v)) als ISTD pipettiert. Die Lösung wird unter Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 60 µL Silyl-991 aufgenommen. Zur Derivatisierung werden die Proben 30 min bei 70 °C belassen.

Die zur GC-EI-MS-Analyse verwendeten chromatographischen und apparativen Parameter werden wie folgt gewählt:

stationäre Phase	Kapillarsäule: Zebron ZB-5, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)		
Injektion	Split/splitless (1 min) bei 250 °C		
mobile Phase	He (1 mL/min constant flow)		
Temperaturgradient	Aufheizrate (°C/min)	T (°C)	Haltezeit (min)
	initial	150	1
	25	230	3
	10	258	0
	0,3	262	1
	15	320	2
Aufgabevolumen	2 µL		
Transferline	300°C		
Detektion	Ionenquelle Temperatur 200 °C		
	Elektronenstoß Ionisierung mit 70 eV		
	scan mode (100-650 amu)		
	scantime 0,55 sec		

Quantifizierung von IRI

Die Quantifizierung von IRI erfolgt mittels eines stoffspezifischen KF für den ISTD GLYC. GLYC wird dabei in einer geringeren Konzentration eingesetzt, um zum einen eine gute Löslichkeit des ISTD sicherzustellen und zum anderen um gegebenenfalls eine Konzentrationsabschätzung gebildeter Metabolite auch in niedrigeren Mengen zu ermöglichen. Der KF von 0,68 wird anhand der Messergebnisse der in Tabelle 14 dargestellten Peakflächen der Extracted-Ion-Chromatogramme (XIC) entsprechend Formel (1) in Anhang 6.1 berechnet.

Tabelle 14: Berechnung des stoffspezifischen Korrekturfaktors (KF) für Irilon (IRI) bei der GC-EI-MS Quantifizierung über Glycitein (GLYC) als internen Standard.

area IRI 4800 ng/Ansatz	area GLYC 48,1 ng/Ansatz	KF		
209379194	2818574	0,74440267		
178021061	2987046	0,59721858		
195889488	2473104	0,79372963		
167961619	2851307	0,5902961	STABW	rel. STABW (%)
		0,68	0,10	15,15

2.5 Isoflavonmetabolismus nach Aufnahme eines Rotkleepräparates

2.5.1 Studiendurchführung

Zur Untersuchung des *in vivo* Metabolismus der gesamten Rotklee-IF mit besonderem Fokus auf IRI, wird ein Studiendesign gewählt, das bei geringem Aufwand erste verlässliche qualitative und quantitative Aussagen über die Stoffwechselwege der IF aus einem ausgewählten Rotkleepräparat zulässt. Um dem Fokus IRI in besonderem Maße gerecht zu werden, wird auf MenoStabil (Bad Heilbrunner Naturheilmittel GmbH&Co, Bad Heilbrunn) als das NEM mit dem höchsten relativen IRI-Gehalt zurückgegriffen. Einer Gruppe von sieben Probanden (drei weiblich und vier männlich) werden in nüchternem Zustand zwei dieser Kapseln zur oralen Aufnahme gegeben. Die detaillierte Zusammensetzung ist in Abbildung 6 dargestellt, angegeben sind dabei die Gewichtsprozent der Komponenten am Gesamt-IF-Gehalt als Aglycone berechnet. Das bedeutet, dass beispielsweise die ermittelten 0,73 mg IRI-Glucosid pro Kapsel zunächst auf das freie Aglycon (hier 0,48 mg) umgerechnet und dann auf den Gesamt-IF-Gehalt der Kapsel (hier 18,96 mg) bezogen werden. Dies führt zu einem IRI-Beitrag des IRI-Glucosids von 2,5% am Gesamt-IF-Gehalt des NEM. Die Tabelle 15 gibt die tatsächlichen Mengen bei Aufnahme von zwei Kapseln an. Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen haben alle StudienteilnehmerInnen in den zwei Tagen vor der Durchführung auf die Aufnahme jeglicher soja- sowie rotkleehaltiger

Lebensmittel verzichtet. Die sonstige Nahrungsaufnahme wird nicht dokumentiert. 6,5 h nach Aufnahme des Präparates, was der Literatur gemäß übereinstimmend einem Zeitraum entspricht, nach dem die Konzentration der resorbierten IF im Blut ein Maximum durchläuft (Setchell et al., 2001; Bloedon LeAnne et al., 2002; Rüfer, 2005), wird den ProbandInnen vom Betriebsmedizinischen Dienst der Universität Hamburg eine Blutprobe entnommen.

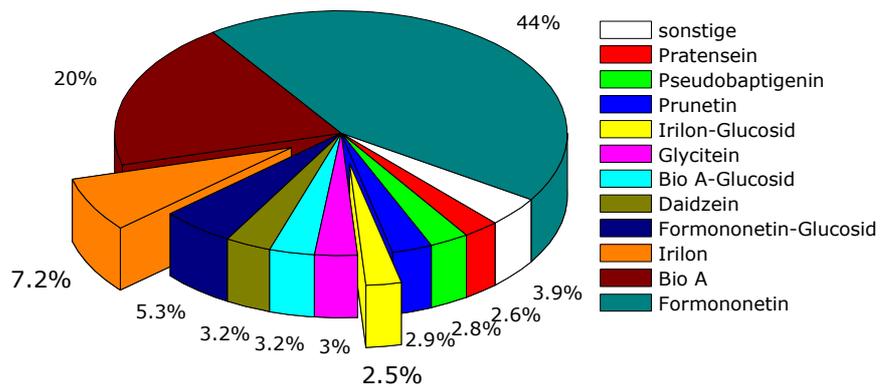


Abbildung 6: Prozentuale Zusammensetzung der Isoflavonfraktion des für die Probandenstudie verwendeten Präparates.

Tabelle 15: Menge der von den Probanden aufgenommenen, als Aglycon berechneten Isoflavone.

Isoflavon	Aufnahmemenge [mg]
Daidzein	1,3
Glycitein	1,3
Pratensein	1,0
Pseudobaptigenin	1,3
Formononetin	18,9
Genistein	0,2
Irimon	3,8
Prunetin	1,6
BiochaninA	8,7
IF-Summe	38,1

2.5.2 Aufbereitung des Blutplasmas

Direkt nach der Blutabnahme wird das mit EDTA stabilisierte Blut 10 min bei 4 °C und 1850 x g zentrifugiert und der Plasmaüberstand abpipettiert. Das gewonnene Plasma wird bis zur weiteren Aufarbeitung bei -84 °C tiefgekühlt. Die anschließende Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgt nach Setchell et al. (Setchell et al., 2002b) mit geringen Modifikationen.

Es werden 750 µL Plasma mit 5 mL TEAS-Puffer (0,5 M; pH 4,5) versetzt. Als ISTD wird GLYC (5 µL einer DMSO-Lösung mit 9,63 µg/mL) zugegeben, die Lösungen werden 10 min im Ultraschallbad bei 64 °C behandelt.

Die Aufreinigung der Proben erfolgt mittels Festphasenextraktion an Chromabond C18-ec-Phasen nach folgendem Schema:

Konditionierung:	2 mL Methanol
Waschen:	4 mL destilliertes Wasser
Probenaufgabe	
Waschen:	8 mL entmineralisiertes Wasser
Elution:	6 mL Methanol

Die erhaltene Lösung wird unter Stickstoffstrom bei maximal 50 °C getrocknet. Zur enzymatischen Hydrolyse der IF-Glucuronide und Sulfate wird der Rückstand zunächst mit 10 µL DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit der IF versetzt und in 1 mL Natriumacetatpuffer aufgenommen sowie mit β-Glucuronidase (4000 U) aus *Helix pomatia* versetzt (siehe Kapitel 6.2.3.4). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C im Schüttelwasserbad.

Die Reaktion wird mit 1 mL eisgekühltem Ethylacetat abgestoppt, und die IF mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion mit insgesamt dreimal 1 mL Ethylacetat aus der Lösung extrahiert. Zur besseren Phasentrennung werden fünf Tropfen Ethanol zugegeben. Der Extrakt wird unter Stickstoffstrom erneut zur Trockene gebracht, mit 10 µL DMSO und 1 mL Natriumacetatpuffer (0,15 M; pH 5) gelöst und ein weiteres Mal nach obigem Schema an C18-ec-SPE-Kartuschen gereinigt. Nach neuerlichem Einengen wird der Rückstand mit zweimal etwa 80 µL Methanol in einen Mikrovialeinsatz überführt. Die Lösung wird erneut unter Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 60 µL Silyl-991 aufgenommen. Zur Derivatisierung werden die Proben 30 min bei 70 °C belassen.

2.5.3 Aufbereitung des Präparates zur GC/MS-Analyse

Da eine Vielzahl der erwarteten IF aus Rotklee nicht kommerziell erhältlich ist, wird das authentische NEM als Referenzmaterial zur Identifizierung der IF sowie der möglichen Metaboliten gewählt. Für die Aufarbeitung des Präparates wird eine säurehydrolytische Aufarbeitung in Anlehnung an Preinerstorfer und Sontag (Preinerstorfer and Sontag, 2004) gewählt, um die enthaltenen IF-Glucoside in die Aglycone zu überführen. Etwa 50 mg des homogenisierten, gelartigen Kapselinhaltes werden mit 2,75 mol/L Salzsäure in 60%iger ethanolischer Lösung (Gesamtvolumen: 10 mL) aufgenommen und 3 h bei ca. 80 °C unter Rückfluss gekocht.

Anschließend wird die Lösung mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 9-10 eingestellt, die Aglycone werden dreimal mit wenigen mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig Wasser gewaschen und von der gereinigten Phase etwa 5 µL in einen Mikrovialeinsatz überführt. Die Lösung wird unter Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 60 µL Silyl-991 aufgenommen. Zur Derivatisierung werden die Proben 30 min bei 70 °C belassen.

Die zur GC-EI-MS-Analyse verwendeten chromatographischen und apparativen Parameter werden wie folgt gewählt:

stationäre Phase	Kapillarsäule: Varian VF-5ms 30 m x 0,25 mm iD, 0,25 µm Filmdicke (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt)		
Injektion	Split/splitless (1 min) bei 250 °C		
mobile Phase	He (1 mL/min constant flow)		
Temperaturgradient	Aufheizrate (°C/min)	T (°C)	Haltezeit (min)
	initial	150	1
	25	230	3
	10	258	0
	0,3	262	1
	15	320	2
Aufgabevolumen	2 µL		
Transferline	300°C		
Detektion	Ionenquelle Temperatur 200 °C		
	Elektronenstoß Ionisierung mit 70 eV		
	scan mode (100-650 amu)		
	scantime 0,55 sec		
	MS ² mode		
	Erregungsbedingungen: 3,0 V; 15 ms; high energy		
	Analyt	Mutterion (± 1 amu)	MS ² scan Bereich (amu)
	FORM	340	322-324
	BioA	413	369-372
	PRUN	413	369-372
	DAI	398	354-357
	GEN	471	398-401
	PBAP	354	280-283
	IRI	427	355-371
	GLYC	428	214-428
Calycosin	428	214-428	
Tri-OH-IF	486	243-486	
Tetra-OH-IF	559	470-488	
Tri-OH-methoxy-IF	501	250-501	
Mono-OH-Iri	515	257-515	

2.6 Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone

Obwohl Rotklee-IF als pflanzliche Estrogene vermarktet werden, gibt es keine fundierten Untersuchungen zu ihrer Estrogenität. Zur Bestimmung des estrogenen Potenzials der Rotklee-IF, werden die drei Haupt-IF (FORM, BioA und IRI), sowie GEN, Equol und Estradiol als Referenz auf ihre Fähigkeit untersucht, Coumestrol von immobilisierten ER α verdrängen zu können. In einer 96-Loch-Platte werden zunächst die freien Rezeptorstellen mit Coumestrol als fluoreszierendem Bindungspartner

belegt (Anregungswellenlänge: 355 nm; Emissionsmessung bei 405 nm). Werden die zu analysierenden IF in Lösungen unterschiedlicher Konzentration in die Vertiefungen gegeben, verdrängen sie mehr oder weniger stark das Coumestrol aus der Rezeptorbindung. Die überstehende Lösung wird entfernt. In der anschließenden fluorimetrischen Messung stellt die Abnahme der Fluoreszenz infolge der Verdrängung von Coumestrol entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz ein Maß für die Bindungsaffinität der Testsubstanz dar. Alle Substanzen werden in Konzentrationen von 0,1 µM und 10 µM in dem Assay getestet. Estradiol fungiert dabei als Referenz, um einen Vergleich zu dem eigentlichen natürlichen Rezeptorbindungspartner ziehen zu können. GEN und Equol als gut untersuchte IF bzw. IF-Derivate ermöglichen eine Einordnung der Daten in die existierende Literatur.

2.7 Isolierung von Isoflavonen aus *Iris germanica*

Die chromatographischen Bedingungen bei der Analyse des *Iris germanica*-Extraktes entsprechen denen, die auch bei der Untersuchung der NEM (siehe Kapitel 2.1) verwendet werden.

Zur Säurehydrolyse des *Iris germanica*-Extraktes werden die Methoden von Preinerstorfer und Sontag (Preinerstorfer and Sontag, 2004) sowie von Zhang et al. (Zhang et al., 2002) angepasst, mit dem Ziel bei möglichst milden Konditionen eine vollständige Hydrolyse zu gewährleisten:

25 mL des ethanolschen Extraktes werden mit 10 mL Ethanol, 35 mL Wasser sowie 20 mL rauchender Salzsäure versetzt und für 3 h unter Rückfluss moderat am Sieden gehalten. Anschließend wird mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 9-10 eingestellt und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird abschließend in Methanol (80%) resuspendiert. Die vollständige Spaltung wird mittels HPLC-DAD-MS überprüft (Chromatographiebedingungen siehe Kapitel 2.3.1). Die IF

werden an einer semipräparativen RP-18 Säule mittels HPLC-UV detektiert und getrennt fraktioniert. Die hierfür verwendeten chromatographischen und apparativen Parameter werden wie folgt gewählt:

Merck Hitachi System	L-5000 LC Controller 655A-12 liquid chromatograph Pumpe 655A variable wavelength UV monitor D-2000 Integrator
stationäre Phase	Phenomenex-Prodigy 5 μ ODS(3), 100A Porengröße, 250 * 10,0 mm, 5,0 μ m (Phenomenex, Aschaffenburg)
mobile Phase	A: Trifluoressigsäure (0,05%) B: Acetonitril
Gradient	isokratisch 65% A : 35% B
Flussrate	4,0 mL/min
Aufgabevolumen	300 μ L
Detektion	UV (270 nm)

Anschließend werden die Fraktionen unter Stickstoffstrom getrocknet, nachdem ein geringes Aliquot mittels analytischer HPLC-DAD-MS auf Reinheit überprüft wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Isoflavongehalte in kommerziellen Isoflavonpräparaten

Zur Bestimmung der IF-Zusammensetzung und -menge in unterschiedlichen isoflavonhaltigen NEM werden zwölf frei verkäufliche Präparate aus Drogerien und Apotheken bezogen und mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Vier davon sind Sojapräparate, die z.T. bereits in anderen Studien analysiert wurden. Der Untersuchungsschwerpunkt liegt auf den Rotkleepräparaten, von denen acht Produkte unterschiedlicher Hersteller analysiert werden. Die Analyse erfolgt sowohl mit wie auch ohne vorherige Hydrolyse der IF-Glucoside. Da die Ergebnisse nach Abspaltung der Zucker gut mit der Summe aus konjugierten und nicht konjugierten IF ohne Hydrolyse übereinstimmen, werden hier lediglich die Daten aus der Analyse ohne Hydrolyse präsentiert und diskutiert. Quantifiziert wird unter Verwendung von 4',5-Dihydroxy-7-methoxy-flavon als internem Standard (ISTD) und einem IF-spezifischen KF (siehe Anhang Tabelle A1).

3.1.1 Sojapräparate

In den HPLC-DAD-MS-Chromatogrammen aller untersuchten Sojapräparate sind acht basisliniengetreunte Peaks erkennbar, die IF zugeordnet werden können. Diese sind über Referenzverbindungen sowie über ihr Masse/Ladungsverhältnis mittels MS eindeutig identifizierbar. Im HPLC-DAD-Chromatogramm (Abbildung 7) ist zu erkennen, dass im Sojaausgangsmaterial, das zur Herstellung verwendet wird, die Zuckerkonjugate der IF dominieren (Peaks Nr. 1-3). Die im Vergleich zu den freien IF polareren 7- β -D-Glucoside eluieren in der Umkehrphasenchromatographie relativ früh, die genauen Retentionszeiten (RT) sind in Tabelle A2 im Anhang angegeben. Bei RT von über 23 min sind geringe Mengen der 6''-Acetylglucoside zu finden (Peaks 8 und 14), wobei das Acetylglycitin (Peak 9) nur einen sehr geringen Anteil besitzt und nicht in

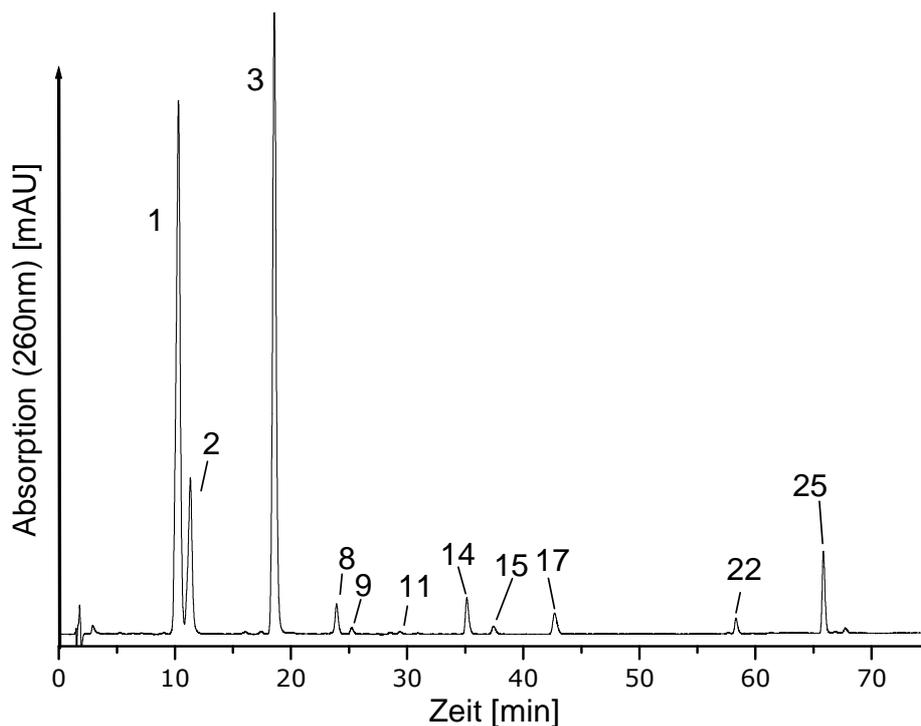


Abbildung 7: Repräsentatives HPLC-DAD-Chromatogramm eines sojabasierten Nahrungsergänzungsmittels. Peakzuordnung entsprechend Tabelle 16. Peak 25 entspricht dem internen Standard.

allen Präparaten nachweisbar ist. Die freien IF DAI (Peak 17) und GEN (Peak 22) sind in allen Präparaten mit einem Gehalt von wenigen Prozent bestimmbar. Nur in Präparat Nr. 2 ist GLYC (Peak 15) als freies IF nicht nachweisbar. Gemeinsam mit Präparat Nr. 4 sind hier weiterhin zusätzlich je ca. 3% der Malonylglucoside (Malonyldaidzin mit RT = 20,1 min und Malonylgenistin mit RT = 29,2 min, Peak Nr. 11) enthalten. Peak 25 ist dem ISTD 4',5-Dihydroxy-7-methoxy-flavon zuzuordnen. In Tabelle 16 ist die IF-Zusammensetzung der vier Präparate detailliert dargestellt.

Insgesamt dominieren in den Sojapräparaten die zuckerkonjugierten IF-Derivate Daidzin, Genistin und Glycitin der entsprechenden Aglycone DAI, GEN und GLYC mit durchschnittlich 93% gegenüber nur 7% der IF, die in unkonjugierter Form vorliegen. Die Schwankungen zwischen den vier Präparaten in der Verteilung der einzelnen IF sowie im Verhältnis Aglycon zu Glucosid sind stark ausgeprägt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 16: Isoflavonzusammensetzung der sojabasierten Nahrungsergänzungsmittel. Alle Angaben in [%] als Aglyconäquivalent bezogen auf den Gesamtisoflavongehalt. „nn“: nicht nachweisbar; „Ac“: Acetyl; „Mal“: Malonyl; „GLYC“: Glucoside; „DAI“: Acetylglucoside; „GEN“: Malonylglucoside; „Aglycone“: Aglycone.

	Name	Estromineral	Osteo Balance	Meno Aktiv	Ymea
	Präparat Nr.	1	2	3	4
Peak Nr.:	IF-Derivat				
1	Daidzin	38,3 ± 6,4	20,3 ± 2,1	52,7 ± 2,4	39,3 ± 1,8
2	Glycitin	12,1 ± 1,7	3,4 ± 0,4	13,5 ± 2,5	20,3 ± 1,3
3	Genistin	42,0 ± 6,0	69,9 ± 7,6	23,2 ± 2,1	17,9 ± 0,8
5	Mal-daidzin	nn	1,0 ± 0,2	nn	2,6 ± 0,1
6	Mal-glycitin	nn	nn	nn	nn
8	Ac-daidzin	2,1 ± 0,4	nn	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,1
9	Ac-glycitin	0,4 ± 0,1	nn	0,5 ± 0,05	0,8 ± 0,1
11	Mal-genistin	nn	2,4 ± 0,3	nn	1,1 ± 0,1
14	Ac-genistin	1,4 ± 0,2	nn	1,8 ± 0,1	0,3 ± 0,05
15	GLYC	0,7 ± 0,1	nn	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2
17	DAI	2,3 ± 0,4	2,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1	11,0 ± 0,8
22	GEN	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Tabelle 17: Verteilung der Isoflavone (IF) auf die drei unterschiedlichen Aglycone in den Sojapräparaten in [%] des Gesamtisoflavongehaltes. Die letzte Spalte gibt den Prozentsatz des Vorliegens der IF in der unkonjugierten Form an.

Präparat Nr.	DAI	GLYC	GEN	Σ freie Aglycone
1	42,7	13,2	44,1	3,7
2	23,5	3,4	73,3	3,2
3	59,2	14,9	25,8	5,0
4	55,1	24,6	20,3	15,5

3.1.2 Rotkleepräparate

Die HPLC-DAD-Chromatogramme der analysierten Rotkleepräparate zeigen ein komplexeres Peakmuster, das sich über einen weiteren Retentionszeitbereich erstreckt (Abbildung 8). Qualitativ lassen sich neun IF als Aglycone in allen Präparaten eindeutig identifizieren (siehe Tabelle 18). Hierzu können von acht Verbindungen ebenso die entsprechenden Glucoside bestimmt werden. Für zwei IF sind geringe Mengen der Acetylglucoside nachweisbar. Im Gegensatz zu dem Chromatogramm des Sojapräparates (Abbildung 7) ist hier auf den ersten Blick erkennbar, dass die Aglycone, die bei späterer RT eluieren, dominieren. Im Elutionsbereich der Glucoside und Acetylglucoside zwischen 10 min und 37 min ist in Rotklee-NEM dazu eine Vielzahl von wenig intensiven Signalen zu erkennen.

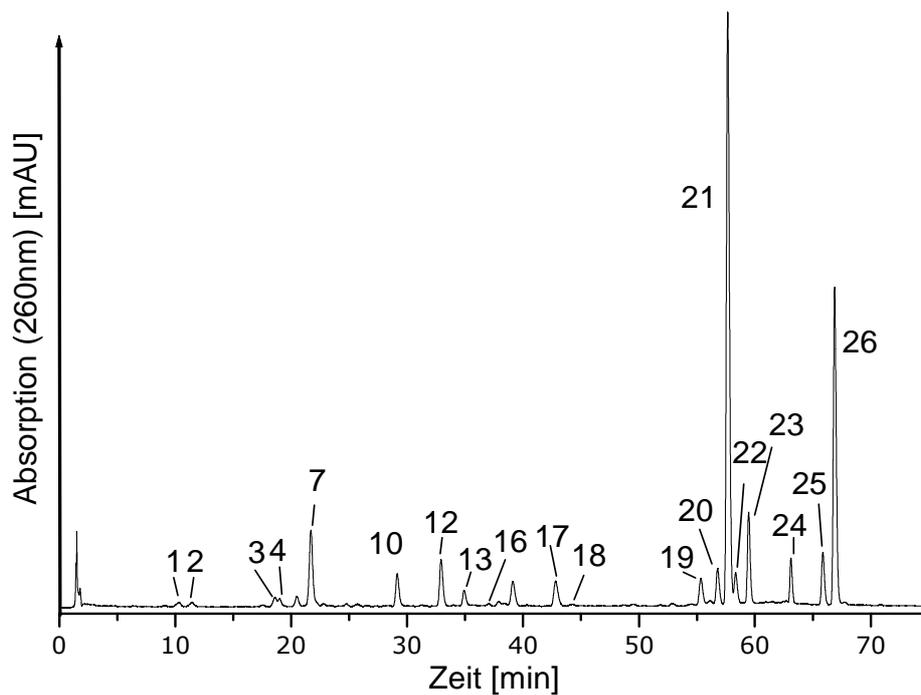


Abbildung 8: Repräsentatives HPLC-DAD Chromatogramm eines rotkleebasierten Nahrungsergänzungsmittels. Peakzuordnung entsprechend Tabelle 18. Peak 25 entspricht dem internen Standard.

In Tabelle 19 sind die relativen Anteile der einzelnen IF-Derivate prozentual an der Gesamt-IF-Menge dargestellt. Als die zwei dominierenden IF liegen in allen Fällen FORM mit einem mittleren Anteil am Gesamt-IF von 47,8% (32,7-51,7%) und BioA mit einem mittleren Gehalt von 26,4% (19,8-47,6%) vor. IRI stellt in allen acht untersuchten Präparaten das am drittstärksten vertretene IF mit durchschnittlich 8,5% (4,9-10,0%) dar. Alle weiteren quantifizierten IF betragen im Mittel zwischen 2,5% und 4% an der Gesamtisoflavonmenge. Hierbei zeigt sich die Abfolge Prunetin(PRUN)>Pseudobaptigenin(PBAP)>DAI>GLYC>GEN>Pratensin(PRA).

Ergebnisse

Tabelle 18: Isoflavonzusammensetzung der rotkleebasierten NEM. Alle Angaben in [%] als Aglyconäquivalent bezogen auf den Gesamtisoflavongehalt. „nn“: nicht nachweisbar; „Ac“: Acetyl; „Glc“: Glucosid; „■“: Glucoside; „■“: Acetylglucoside; „■“: Aglycone

	Präparat Name (Nr.)	Hannes pure Lebenslust (1)	Menoflavon LT (2)	Monoflavon (3)	Meno Stabil (4)
Peak-Nr.	IF-Derivat				
1	Daidzin	0,30 ± 0,01	0,66 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,25 ± 0,04
2	Glycitin	0,43 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,30 ± 0,08
3	Genistin	0,84 ± 0,09	1,35 ± 0,10	1,51 ± 0,09	0,54 ± 0,09
4	PBAP-Glc	0,96 ± 0,07	1,06 ± 0,09	1,18 ± 0,08	0,71 ± 0,12
7	FORM-Glc	5,65 ± 0,43	8,18 ± 0,59	8,99 ± 0,25	5,25 ± 0,88
10	IRI-Glc	2,89 ± 0,24	3,07 ± 0,35	3,38 ± 0,23	2,52 ± 0,44
12	BioA-Glc	3,21 ± 0,29	4,26 ± 0,30	4,89 ± 0,26	3,24 ± 0,55
13	PRUN-Glc	1,26 ± 0,08	1,57 ± 0,18	1,72 ± 0,09	1,41 ± 0,13
15	GLYC	2,92 ± 0,02	2,79 ± 0,23	2,63 ± 0,15	3,02 ± 0,46
16	FORM-Ac-Glc	0,36 ± 0,02	0,51 ± 0,10	0,55 ± 0,03	0,94 ± 0,14
17	DAI	3,38 ± 0,15	3,25 ± 0,24	3,56 ± 0,18	3,24 ± 0,51
18	IRI-Ac-Glc	nn	nn	nn	0,25 ± 0,03
19	PBAP	2,91 ± 0,11	2,60 ± 0,08	2,64 ± 0,16	2,81 ± 0,42
20	PRA	2,53 ± 0,11	2,58 ± 0,04	2,53 ± 0,19	2,55 ± 0,37
21	FORM	42,92 ± 1,60	41,02 ± 2,85	40,55 ± 1,68	43,73 ± 4,47
22	GEN	2,32 ± 0,08	2,20 ± 0,06	2,09 ± 0,09	nn
23	IRI	6,57 ± 0,25	5,75 ± 0,24	5,29 ± 0,15	7,24 ± 0,96
24	PRUN	2,74 ± 0,11	2,21 ± 0,12	2,10 ± 0,13	2,85 ± 0,31
26	BioA	17,46 ± 0,70	16,30 ± 1,23	14,90 ± 0,43	19,58 ± 2,05

	Präparat Name (Nr.)	Merosan (5)	Bischoff Rotkleeblüten (6)	Espara Rotklee Royal (7)	Promensil (8)
Peak-Nr.:	IF-Derivat				
1	Daidzin	0,44 ± 0,04	0,52 ± 0,05	nn	nn
2	Glycitin	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,23	nn	nn
3	Genistin	0,78 ± 0,04	0,99 ± 0,06	nn	0,45 ± 0,05
4	PBAP-Glc	0,82 ± 0,06	0,88 ± 0,03	nn	nn
7	FORM-Glc	6,24 ± 0,45	6,53 ± 0,17	0,40 ± 0,03	1,50 ± 0,05
10	IRI-Glc	2,53 ± 0,25	2,85 ± 0,02	0,74 ± 0,04	1,24 ± 0,05
12	BioA-Glc	3,56 ± 0,21	3,46 ± 0,09	0,70 ± 0,03	3,05 ± 0,08
13	PRUN-Glc	1,14 ± 0,07	1,11 ± 0,04	0,26 ± 0,01	1,21 ± 0,05
15	GLYC	2,64 ± 0,21	2,82 ± 0,16	0,75 ± 0,04	1,14 ± 0,04
16	FORM-Ac-Glc	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,01	nn	nn
17	DAI	3,44 ± 0,16	3,63 ± 0,07	0,67 ± 0,11	1,00 ± 0,07
18	IRI-Ac-Glc	0,20 ± 0,01	nn	nn	nn
19	PBAP	2,78 ± 0,15	2,61 ± 0,18	1,57 ± 0,02	0,87 ± 0,04
20	PRA	2,34 ± 0,12	2,47 ± 0,04	1,41 ± 0,02	3,60 ± 0,16
21	FORM	45,31 ± 2,07	42,93 ± 4,25	48,11 ± 0,96	31,21 ± 1,39
22	GEN	1,87 ± 0,13	2,06 ± 0,06	1,31 ± 0,02	2,67 ± 0,11
23	IRI	6,15 ± 0,29	6,95 ± 0,14	4,11 ± 0,06	4,54 ± 0,19
24	PRUN	2,12 ± 0,17	2,72 ± 0,13	1,75 ± 0,03	3,12 ± 0,15
26	BioA	17,04 ± 0,70	16,80 ± 1,44	38,20 ± 0,68	44,57 ± 1,74

Für fast alle IF können zwischen den einzelnen Präparaten Unterschiede im relativen Anteil um einen Faktor zwei bis vier festgestellt werden. Der Anteil der frei vorliegenden IF liegt für alle acht NEM zwischen 76,3% und 97,9%; es verteilen sich im Durchschnitt nur ca. 15% der gesamten IF auf die bis zu acht konjugierten IF-Derivate. Für PRA ist kein Zuckerkonjugat bestimmbar, und die Acetylglucoside können nur für FORM und IRI quantifiziert werden. Auch die Rotkleepräparate unterscheiden sich bezüglich ihrer IF-Verteilung sehr. Eine Übersicht gibt Tabelle 19.

Tabelle 19: Verteilung der Isoflavone (IF) auf die Aglycone in den Rotkleepräparaten in [%] des Gesamtisoflavongehaltes. Die letzte Spalte gibt den Prozentsatz an IF an, die im Präparat als Aglycon vorliegen.

Präp. Nr.	DAI	GLYC	PRA	PBAP	FORM	GEN	IRI	PRUN	BioA	Σ freie Aglycone
1	3,7	3,4	2,5	3,9	48,9	3,2	9,5	1,3	20,7	83,8
2	3,9	3,4	2,6	3,7	49,7	3,6	8,8	1,6	20,6	78,7
3	4,4	3,3	2,5	3,8	50,1	3,6	8,7	1,7	19,8	76,3
4	3,5	3,3	2,6	3,5	49,9	0,5	10,0	1,4	22,8	85,0
5	3,9	3,1	2,3	3,6	51,7	2,7	8,9	1,1	20,6	83,7
6	4,2	3,3	2,5	3,5	49,7	3,1	9,8	1,1	20,3	83,0
7	0,7	0,8	1,4	1,6	48,5	1,3	4,9	0,3	38,9	97,9
8	1,0	1,1	3,6	0,9	32,7	3,1	5,8	1,2	47,6	92,7

3.1.3 Quantifizierung der Isoflavongehalte

Ein besonderer Fokus der Untersuchung der NEM soll auch auf der Überprüfung der quantitativen Angaben der Hersteller bezüglich des Gesamt-IF-Gehaltes liegen. Dazu werden die ermittelten Gehalte der IF und Konjugate auf ihre Aglycone umgerechnet und summiert. Die Tabellen 20 und 21 stellen die daraus resultierenden Gesamt-IF-Gehalte den Deklarationen der Hersteller gegenüber. Für die untersuchten Rotkleepräparate 6 und 7 lässt sich eine gute Übereinstimmung der Summe der bestimmten IF mit dem vom Hersteller deklarierten IF-Gehalt feststellen. Bei den Präparaten 2, 3 und 8 liegt der tatsächlich ermittelte Gehalt um mehr als 20% über der deklarierten Menge.

Tabelle 20: Ermittelter Gesamtgehalt an Isoflavonen (IF) berechnet als Aglycone in den Rotkleepräparaten im Vergleich mit den Herstellerangaben. „RK“: Rotklee

Präparat Nr.	% Irilon am Gesamt-IF	Gesamt-IF Gehalt pro Kapsel in mg	Deklariertes IF-Gehalt pro Kapsel
1	9,5 ± 0,8	59,9 ± 1,9	keine Angabe
2	8,8 ± 0,4	55,3 ± 1,9	40 mg
3	8,7 ± 0,6	33,0 ± 1,8	20 mg
4	10,0 ± 1,1	18,8 ± 1,8	200 mg RK Extrakt
5	8,9 ± 0,4	72,8 ± 2,9	500 mg RK Extrakt
6	9,8 ± 0,2	38,8 ± 1,9	40 mg
7	4,9 ± 0,1	41,4 ± 0,7	40 mg
8	5,8 ± 0,2	49,7 ± 1,7	40 mg

Bei den übrigen Präparaten 1, 4 und 5 ist der IF-Gehalt vom Hersteller nicht deklariert worden. Bei den Sojapräparaten 1 und 2 stimmen Deklaration und tatsächlicher Gehalt gut überein. Im Falle des Präparates 3 ist nur 50% des angegebenen Gehaltes tatsächlich enthalten, und für Präparat 4 ist kein IF-Gehalt deklariert.

Tabelle 21: Ermittelter Gesamtgehalt an Isoflavonen (IF) berechnet als Aglycone in den Sojapräparaten im Vergleich mit den Herstellerangaben.

Präparat Nr.	Gesamt-IF-Gehalt pro Kapsel in mg	Deklariertes IF-Gehalt pro Kapsel
1	64,1 ± 8,0	60 mg
2	18,9 ± 1,8	20 mg
3	9,9 ± 1,1	20 mg
4	5,6 ± 0,2	43 mg Soja-Extrakt

3.1.4 Quantifizierung der Isoflavone nach enzymatischer Spaltung

Nach enzymatischer Freisetzung der IF-Aglycone werden in der HPLC-DAD-Analyse deutlich übersichtlichere Chromatogramme erhalten (siehe Anhang, Abbildung A1). Die analysierten IF-Konzentrationen in den Präparaten entsprechen in guter Weise denen, die ohne die Spaltung der Glucoside in Kapitel 3.1.3 bestimmt wurden. Die Werte weisen allerdings aufgrund der aufwendigeren Aufarbeitung, sowie der Quantifizierung ohne ISTD stärkere Schwankungen auf und liefern keine zusätzlichen Informationen.

3.2 *In vitro* Phase-I-Metabolismus der Rotkleeisoflavone

Der oxidative Phase-I-Metabolismus der Rotklee-IF wird anhand mehrerer verschiedener Modellsysteme untersucht. Für erste orientierende Versuche ist die Verwendung von MIKs gewonnen aus metabolisch besonders aktiven Geweben, vor allem Leber, aber auch Dünndarm, von Ratten oder humanen Spenderorganen üblich. Für weitere Untersuchungen der an der Umsetzung beteiligten Enzyme finden MIKs mit rekombinanten humanen CYP-Enzymen (sogenannte Supersomen) Anwendung. Nach diesem gängigen Schema wird auch bei der Aufklärung des IRI-Metabolismus verfahren. IRI wird in den verschiedenen Modellsystemen mit NADPH als Cosubstrat inkubiert, und die Metaboliten werden nach Flüssig/Flüssig-Extraktion mittels HPLC-DAD/MS analysiert.

Qualitatives Ergebnis der *in vitro* Inkubationen

In den Inkubationsansätzen mit MIKs und Supersomen können in wechselnden Anteilen vier chromatographisch und massenspektrometrisch differenzierbare Metabolite nachgewiesen werden. Ein repräsentatives Chromatogramm einer Umsetzung, in der alle vier Metabolite gebildet werden, zeigt die Abbildung 9. Dem UV-Chromatogramm bei 270 nm werden die XIC-Spuren der zu erwartenden Metabolite gegenüber gestellt. Die XIC resultieren aus dem Fullscan-Massenspektrum, aus dem nur die Signale für die einzelnen Massen-Ladungszahlen (m/z) der zu erwartenden oxidativen Metabolite von IRI extrahiert werden. Dabei zeigt der Metabolit mit der kürzesten Retentionszeit in der RP-Trennung eine m/z von 331 amu, entsprechend einem dihydroxylierten IRI-Derivat. Im XIC dieser Massenspur sind noch zwei weitere Peaks erkennbar, denen aber keine Signale im UV-Chromatogramm zugeordnet werden können.

Ergebnisse

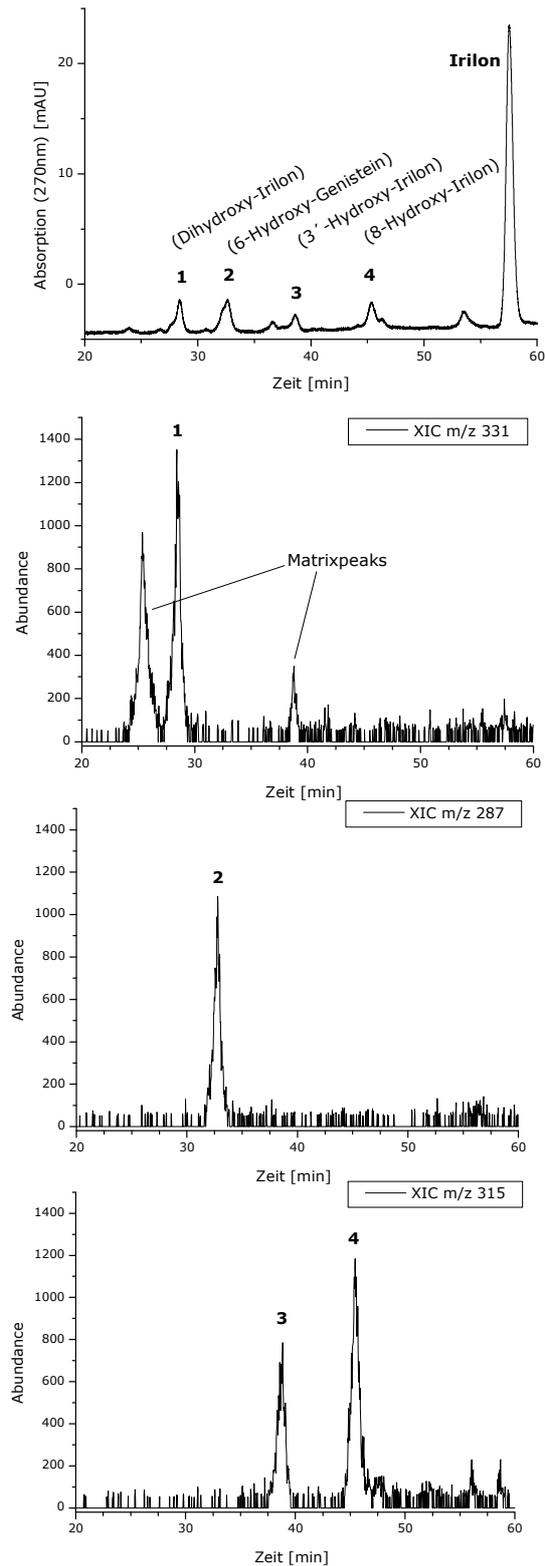


Abbildung 9: Gegenüberstellung des HPLC-DAD-Chromatogramms (270 nm) der oxidativen Phase-I-Metabolisierung von Irlon (10 μ M) mit den entsprechenden HPLC-MS Extracted-Ion-Chromatogrammen (XIC) der Massenspuren mit m/z 287, 315 und 331 für die erwarteten Hauptmetabolite.

Da IRI eine intensive UV-Absorption zeigt, handelt es sich dabei nicht um IF-Derivate. Zumal diese Peaks auch in der Kontrolle ohne Einsatz von Cosubstrat gefunden werden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Substanzen aus der MIK-Matrix handelt, die in ihrem MS-Spektrum ebenso ein Fragment mit dieser m/z zeigen. Die Bildung des dihydroxylierten IRI-Metaboliten wird selbst unter identischen Versuchsbedingungen nicht reproduzierbar detektiert. Ein Einbeziehen in die nachfolgenden Betrachtungen ist daher nicht möglich. Auch sind mehrfache Hydroxylierungen für die Situation *in vivo* nur von geringer Relevanz. In einer *in vivo* Studie konnten die dihydroxylierten DAI- und GEN-Metabolite im Urin der Probanden nicht oder nur in sehr geringem Maße gefunden werden (Kulling et al., 2001). Der IRI-Metabolit 2 im UV-Chromatogramm korreliert gut mit dem einzigen Signal des XIC bei einer m/z von 287 amu, entsprechend einem IRI-Derivat mit abgespaltener Methyendioxygruppe (entsprechend 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF bzw. 6-Hydroxy-GEN). Die Identität dieses Metaboliten konnte über Cochromatographie mit der authentischen Referenzsubstanz eindeutig bestätigt werden. Zwei weitere Peaks im UV-Chromatogramm, können den beiden Peaks im XIC mit $m/z = 315$ amu in der MS-Detektion zugeordnet werden. Diese Peaks mit den Nummern 3 und 4 entsprechen jeweils einem Quasimolekülion ($[M+H]^+$) eines monohydroxylierten IRI-Metaboliten.

Für die Metaboliten 1, 3 und 4 ist die genaue Position der Hydroxylierung aus dem HPLC-ESI-(+)-MS-Spektrum nicht abzuleiten. Für den dihydroxylierten Metaboliten ist allerdings von einer Oxidation sowohl an Position C-3' wie auch C-8 auszugehen, da die beiden weiteren Optionen in Position C-2 und C-2' sterisch ungünstig sind und bisher für IF allenfalls in Spuren gefunden werden (Rüfer et al., 2007). Eine Differenzierung der beiden monohydroxylierten IRI-Metabolite 3 und 4 kann mit Hilfe von HPLC-ESI(+)-MS/MS- und GC-EI-MS/MS-Analysen durchgeführt werden und ist in Kapitel 3.8.3 detailliert beschrieben. Dabei kann Metabolit 3 als die catecholische Verbindung 3'-Hydroxy-IRI und

Peak 4 als 8-Hydroxy-IRI identifiziert werden. Entsprechend dieser Zuordnung werden die vier Metabolite in der folgenden Präsentation der Ergebnisse auch benannt.

3.2.1 Umsetzung von Irilon mit Human- und Rattenlebermikrosomen

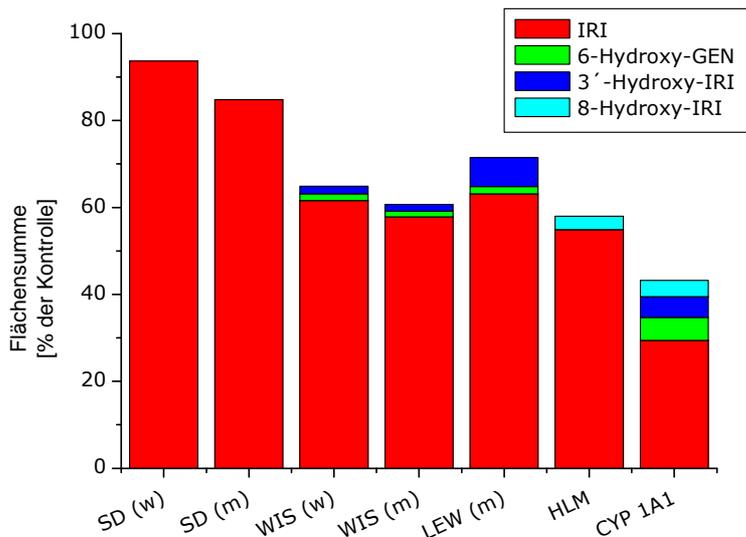
Rattenlebermikrosomen

Zur Untersuchung des Phase-I-Metabolismus von IRI mit RLM werden MIKs aus den Lebern männlicher Lewis-Ratten selbst hergestellt. Zusätzlich werden RLM von sowohl weiblichen wie männlichen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt, um spezies- und geschlechtsbedingte Unterschiede detektieren zu können. Eine exakte Quantifizierung der einzelnen Metabolite ist ohne entsprechende Referenzsubstanzen nicht möglich, aufgrund des ähnlichen UV-Absorptionsspektrums von IRI und seinen Derivaten (siehe Anhang, Abbildung A2) wird ein gleicher Extinktionskoeffizient angenommen. Die Metabolitenbildung wird jeweils als prozentualer Anteil bezogen auf die eingesetzte IRI-Menge im Ansatz angegeben. Dabei bildet die in der Kontrollinkubation ohne NADPH detektierte Menge an IRI die Bezugsgröße, und die in den jeweils zugehörigen mikrosomalen Umsetzungen bestimmte Menge an IRI wird als 'nicht metabolisiert' betrachtet. Die Differenz aus dem im Kontrollversuch bestimmten IRI-Gehalt und der Summe aus IRI und Metaboliten in der Umsetzung wird als 'Enzym-gebunden' gewertet.

Der Umfang der Umsetzung sowie das Metabolitenspektrum der durch die unterschiedlichen RLM-Spezies gebildeten Metaboliten weist deutliche Unterschiede auf. Geschlechtsspezifische Unterschiede werden dagegen nicht gefunden werden.

Die Inkubationen von IRI (10 μ M) mit weiblichen wie männlichen Sprague-Dawley-RLM zeigen keine Metabolitenbildung. Sowohl für die Wistar-RLM (weiblich wie männlich) als auch für die Lewis-RLM (männlich) sind dagegen jeweils zwei Metaboliten, 6-Hydroxy-GEN und

3'-Hydroxy-IRI, detektierbar. Bei den Inkubationen mit Wistar-RLM ergeben sich geschlechtsunabhängig für beide Metaboliten nur sehr geringe Umsätze von jeweils ca. 1,5%. Die Inkubation mit Lewis-RLM zeigt ebenfalls nur eine geringe Bildung von 6-Hydroxy-GEN, allerdings liegt die detektierte Menge an 3'-Hydroxy-IRI mit ca. 6,8% Anteil bezogen auf die eingesetzte IRI-Menge deutlich höher. Die Anteile in den einzelnen Umsetzungen der Dreifachbestimmungen sind im Anhang (Tabelle A3) angegeben. Die Addition der Peakflächen aus unverändertem Substrat und Umsetzungsprodukten in den Inkubationen führt relativ zum eingesetzten IRI zu einer Wiederfindung von 85% bzw. 94% für die männlichen bzw. weiblichen Sprague-Dawley-RLM und von 61% für männliche Wistar-RLM, 64% für weibliche Wistar-RLM und 72% für Lewis-RLM. Obwohl bei den Wistar- und Lewis-RLM nur geringe Mengen an Metaboliten detektiert sind, bleibt eine erhebliche Menge von etwa 25% des IRI bezogen auf den zugehörigen Kontrollansatz ohne Cosubstratzusatz undetektiert. Für die Sprague-Dawley-RLM, die keine Metabolitenbildung zeigen, ist dieses Phänomen deutlich geringer ausgeprägt, ca. 90% des eingesetzten IRI werden unverändert wiedergefunden. In Abbildung 10 sind die prozentualen Anteile der Metabolite und der Anteil des unverändert wiedergefundenen IRI graphisch dargestellt, wobei 100% den jeweils mitgeführten Kontrollansätzen ohne Cosubstratzugabe entsprechen. Eine Tendenz zu einer Abhängigkeit des Verlustes von der eingesetzten Proteinmenge oder der CYP-Konzentration im Ansatz ist nicht zu erkennen.

**Abbildung 10:**

Bestimmung von Irilon (IRI) und seinen oxidativen Metaboliten nach Inkubation mit den verschiedenen MIKs und rekombinantem CYP 1A1. Unverändertes Substrat sowie gebildete Metabolite sind als Mittel der Flächenprozentage einer Dreifachbestimmung bezogen auf die Fläche der Kontrollinkubationen angegeben. („SD“: Sprague-Dawley; „WIS“: Wistar; „LEW“: Lewis; „w“: weiblich; „m“: männlich.)

Humanlebermikrosomen

Der oxidative Phase-I-Metabolismus von IRI (10 μ M) durch HLM führt zur Bildung von nur einem detektierbaren Metaboliten. Es handelt sich um 8-Hydroxy-IRI, welcher bei Inkubation mit RLM nicht gebildet wird. Dieser Metabolit wird zu einem Anteil von 3,1% bezogen auf den Kontrollansatz gebildet. Unverändertes IRI ist nach der Umsetzung nur zu 55% detektierbar. Auch bei den Inkubationen mit HLM „verschwinden“ über 40% des eingesetzten IRI (siehe Abbildung 10).

Induzierte Rattenlebermikrosomen

Mit induzierten RLM durchgeführte Inkubationen von IRI (30 μ M) führen zu keiner detektierbaren Metabolitenbildung. IRI ist nach Inkubation nur noch in einer Menge von unter 5% bezogen auf die Kontrolle nachweisbar. Die Einhaltung geeigneter Inkubationsbedingungen sowie die Aktivität der induzierten RLM werden durch parallel mitgeführte Inkubationen mit GLYC als Substrat verifiziert. Die gleiche Menge GLYC wird unter den gewählten Bedingungen fast vollständig zu demethylierten und hydroxylierten Produkten umgesetzt, wie von Rüfer et al. beschrieben wurden (Rüfer et al., 2007). Nur 8% des eingesetzten GLYC werden unverändert wiedergefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Zum Vergleich sind zusätzlich die Ergebnisse der Umsetzung mit nicht

induzierten Lewis-RLM angegeben. Die Flächensumme von Substrat und Metaboliten liegt sowohl für die Inkubation von IRI mit induzierten wie auch nicht induzierten RLM sowie für GLYC mit induzierten RLM deutlich unter der Fläche des Substrates im Kontrollansatz. Nur 2% des eingesetzten IRI sowie 49% des GLYC werden nach Umsetzung mit den induzierten MIKs wiedergefunden. Für IRI zeigt sich ein ausgeprägter Substanzverlust, auch bei Inkubationen mit nicht induzierten MIKs.

Tabelle 22: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Inkubationen von Irilon (IRI) mit induzierten und nicht induzierten RLM und von Glycitein (GLYC) mit induzierten RLM unter identischen Bedingungen. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte einer Doppelbestimmung und geben die Peakflächenprozentage bezogen auf die jeweiligen Kontrollinkubationen ohne Cosubstratzugabe an.

	IRI ind.-RLM	IRI RLM	GLYC ind.-RLM
Flächensumme Metabolite	0,5	5,8	40,6
Flächensumme Substrat	1,1	59,8	8,0
theoretisch gebunden bzw. umgesetzt	98,9	40,2	92,0
nicht detektierte Substanz	98,4	34,4	51,4

3.2.2 Umsetzung von Irilon durch rekombinante humane Cytochrom-P450-Enzyme

Zusätzlich zu den Inkubationen mit MIKs werden Umsetzungen von IRI (10 µM) mit verschiedenen CYP-Enzymen durchgeführt. Von den in das Screening einbezogenen CYPs zeigt ausschließlich das CYP 1A1 bei einer Konzentration von 50 pmol CYP pro mL Inkubationsansatz eine Metabolitenbildung. Die Umsetzung von IRI zu 8-Hydroxy-IRI führt reproduzierbar zu einer Metabolitenmenge von etwa 2% bezogen auf den Kontrollwert. Gleichzeitig sinkt die Wiederfindung als Summe aus IRI und Metabolit auf etwa 70%. Die CYP-Enzyme 2C9, 2D6, 2E1 sowie 3A4 katalysieren die Bildung von IRI nicht. Auch ist kein ausgeprägter Rückgang der Wiederfindung des eingesetzten IRI auf weniger als 90%. Tabelle 23 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 23: Metabolitenbildung bei Inkubation von Irilon (10 μM) mit verschiedenen CYPs (50 pmol/mL). Angaben in Flächenprozent bezogen auf den Kontrollwert. Angegeben sind jeweils die Ergebnisse aus einer Doppelbestimmung. „nn“: nicht nachweisbar

	CYP 1A1	CYP 2C9	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4
Irilon	68,7	90,9	94,0	91,8	90,2
Schwankungsbreite	63,1-74,2	86,3-95,6	92,6-95,4	89,2-94,4	86,9-93,5
IRI-Metabolit	2,1	nn	nn	nn	nn
Schwankungsbreite	1,7-2,5				

Untersuchung der Enzymkinetik

Um genauere Aussagen über die enzymatische Umsetzung von IRI mit CYP 1A1 treffen zu können, werden enzymkinetische Messungen durchgeführt. Hierzu werden Inkubationen mit IRI in unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Um die Umsatzrate und somit die Detektierbarkeit zu erhöhen, wird die CYP-Konzentration im Inkubationsansatz auf 100 pmol CYP/mL verdoppelt. Unter der Annahme, dass der nach der Inkubation nicht mehr detektierbare Anteil an IRI umgesetzt oder an das Enzym gebunden ist, wird diese Menge als metabolisiert gewertet. Werden die Ergebnisse der Umsatzgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen, ist ein leicht sigmoider Kurvenverlauf erkennbar

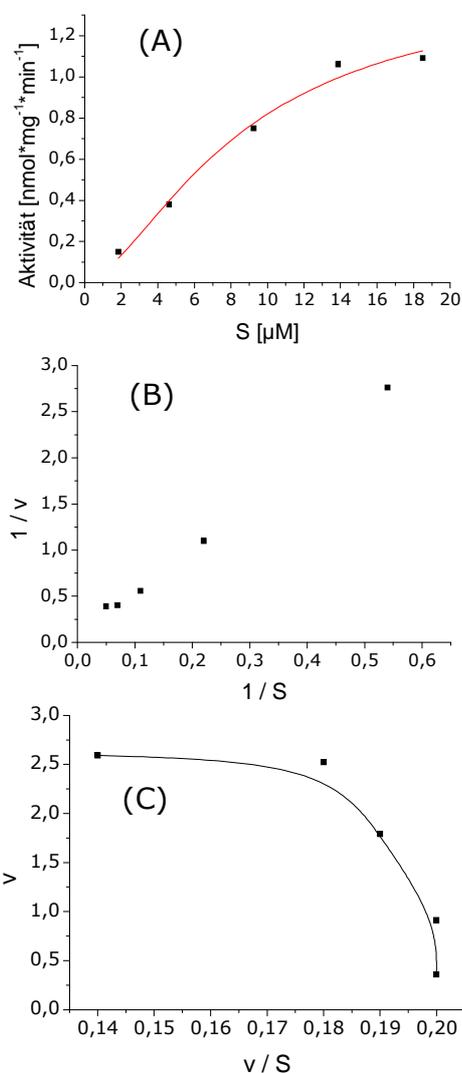


Abbildung 11: (A) Aktivität von CYP 1A1 gegenüber Irilon in Abhängigkeit von der Substratkonzentration; (B) Lineweaver-Burk-Darstellung; (C) Auftragung nach Eadie-Hofstee.

(Abbildung 11 (A)). Durch die Anwendung der in Kapitel 2.2.4 dargestellten kinetischen Auswerteverfahren werden die in Abbildung 11 (B) und (C) dargestellten Lineweaver-Burk- und Eadie-Hofstee-Plots erhalten. Die Darstellung nach Lineweaver-Burk lässt sich nicht mit einer Ausgleichsgeraden linear annähern, so dass ein Ableiten der enzymkinetischen Parameter nicht möglich ist. Der Eadie-Hofstee-Plot ist ebenso nicht linearisierbar, aber ein Verbinden der einzelnen Datenpunkte zeigt die Tendenz zu einer zur Ordinate hin geöffneten Ellipse. Wie in Kapitel 2.2.4.3 dargestellt, ist diese ein Hinweis auf eine sigmoid verlaufende, autoaktivierte Kinetik. Durch mathematische Anpassung nach Formel (6) (Kapitel 6.1), unter Annahme eines sigmoiden Kurvenverlaufes, berechnen sich die enzymkinetischen Parameter wie folgt:

$$V_{\max} = 1,46 \pm 0,33 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k = 8,6 \pm 3,0 \text{ } \mu\text{M}$$

$$n = 1,6 \pm 0,4$$

Displacement

Die sehr geringe Wiederfindung von IRI und seinen Metaboliten in den Inkubationsansätzen gibt Anlass zu der Vermutung, dass es aufgrund des MDP-strukturelementes zu einer Komplexbildung mit CYP-Enzymen kommt. Eine Zugabe von hydrophoben Substraten zu dem Inkubationsansatz kann möglicherweise nicht kovalent gebundenes IRI oder dessen Metabolite vom Enzym verdrängen. Dies wird durch Zugabe von Decanol entsprechend dem Versuchsschema aus Tabelle 24 untersucht.

Unter den gewählten Inkubationsparametern ist bei Extraktion nach 60-minütiger Standardinkubation ohne Modifikation durch Displacement eine Wiederfindung von 30% relativ zum Kontrollwert zu detektieren. Wird nach 60 min der Displacer zugegeben und 30 min weiterinkubiert, bevor wie üblich extrahiert wird, steigt die Wiederfindung leicht auf 41%. Die Fortdauer der Inkubation nach Decanolzugabe bis zur Extraktion hat dabei keinen Einfluss auf die Wiederfindung. Nach Inkubationszeiten zwischen

15 min und 60 min wird in allen Fällen eine Wiederfindung zwischen 43% und 46% gemessen.

Tabelle 24: Übersicht über Vorgehen und Ergebnis der Displacementversuche. Wiederfindung (WF) bezogen auf die Kontrolle (KO) ohne NADPH als Cosubstrat.

		Displacementversuche		Standardinkubation	
		Umsetzung	KO	Umsetzung	KO
0 min					
Zugabe von	NADPH	ja	nein	ja	nein
60 min					
Zugabe von	Decanol	ja	ja	nein	nein
Extraktion		nein	nein	WF 30%	100%
90 min					
Extraktion		WF 41%	100%		

3.2.3 Umsetzung von Biochanin A und Formononetin

Für die beiden Haupt-Rotklee-IF werden analog zu den IRI-Inkubationen bei einer IF-Konzentration von 10 μM mit RLM, HLM sowie CYP-Enzymen durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden unterteilt nach den beiden Substraten dargestellt.

3.2.3.1 Biochanin A

Die eingesetzten MIKs und CYP-Enzyme katalysieren die Bildung von zwei Hauptmetaboliten. Durch oxidative Demethylierung entsteht GEN, zusätzlich wird ein monohydroxylierter Metabolit gebildet. Kulling beschreibt 3'-Hydroxy-BioA als oxidativen Hauptmetaboliten von BioA nach Umsetzung mit induzierten MIKs (Kulling, 2001). Da der gebildete monohydroxylierte Metabolit auch im Retentionsverhalten in der RP-Chromatographie unter vergleichbaren Bedingungen dem von Kulling beschriebenen Metaboliten entspricht, wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um 3'-Hydroxy-BioA handelt.

Die Umsetzungen mit den rekombinanten CYPs zeigen, dass alle untersuchten Enzyme in der Lage sind, BioA zu demethylieren (Tabelle 25). Bezüglich der Aktivität der CYPs gibt es aber deutliche Unterschiede.

Tabelle 25: Umsetzung von BioA mit den rekombinanten CYPs. Der Umsatz ist kalkuliert als Flächenanteil [%] bezogen auf die Kontrollwertfläche jeweils als Mittelwert einer Doppelbestimmung

	CYP 1A1	CYP 2C9	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4
BioA	77,3	103,2	99,2	90,4	96,6
Schwankungsbreite	76,0-78,7	101,7-105,6	98,7-99,6	86,6-94,2	94,9-98,3
GEN	9,3	1,4	2,2	11,7	1,4
Schwankungsbreite	9,0-9,5	1,1-1,6	2,1-2,4	11,3-12,0	1,3-1,6
3'-Hydroxy-BioA	1,3	nn	nn	nn	nn
Schwankungsbreite	1,0-1,5				

Für CYP 1A1 und 2E1 ist eine Metabolitenbildung mit einem Flächenanteil von rund 10% Metabolit detektierbar, wohingegen die anderen CYPs in der Reihung 2D6>2C9=3A4 maximal 3,1% GEN als Demethylierungsprodukt bilden. CYP 1A1 bildet als einziges CYP-Enzym zusätzlich auch den monohydroxylierten Metaboliten.

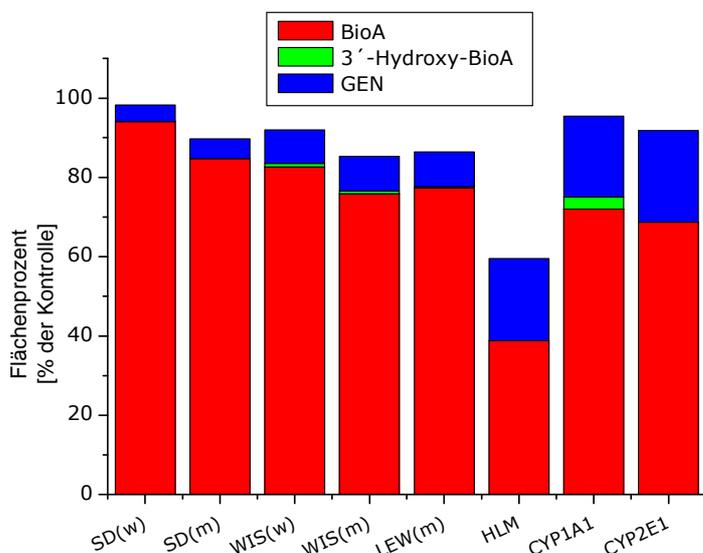


Abbildung 12: Untersuchung von BioA und seinen oxidativen Metaboliten nach Inkubation mit verschiedenen MIKs und den CYPs 1A1 und 2E1. Unverändertes Substrat sowie gebildete Metabolite sind als Mittel der Flächenprozentage einer Dreifachbestimmung bezogen auf die Kontrollwertfläche (Doppelbestimmung) angegeben.

Die Inkubationen mit den MIKs sowie mit den CYPs 1A1 und 2E1, die im Screening die höchste Aktivität gezeigt haben, werden zur genaueren Analyse nochmals in höherer Konzentration eingesetzt. Hierbei zeigen die Sprague-Dawley-RLM (weiblich wie männlich) die geringste Aktivität und katalysieren ausschließlich die Bildung von GEN mit 4-5%

Peakflächenanteil bezogen auf den Kontrollwert. Die Lewis- und Wistar-RLM (weiblich wie männlich) verhalten sich sehr ähnlich und katalysieren dominierend die Demethylierung zu GEN mit 8-9%

Peakflächenanteil (Abbildung 12). Zusätzlich wird der monohydroxylierte Metabolit mit einer Intensität von unter 1% gebildet. Für alle untersuchten RLM liegt der Kontrollwert, berechnet als die Summe der Peakflächen von Substrat und Metabolite zwischen 85% und 100%. Im Gegensatz zu IRI treten hier keine nennenswerten Substanzverluste auf. Durch HLM findet eine intensive Demethylierung statt, Hydroxylierungen werden nicht detektiert. Die Wiederfindung von BioA und Metaboliten nach der Umsetzung mit HLM liegt allerdings nur bei 60% bezogen auf den Kontrollansatz. Für die einzelnen CYPs bestätigt sich das Ergebnis aus dem Screening. CYP 1A1 bildet neben dem dominierenden GEN (20%) zusätzlich einen monohydroxylierten BioA-Metaboliten (3%). Für CYP 2E1 ist auch bei höherer Enzymkonzentration keine Hydroxylierung von BioA zu detektieren, GEN wird mit 23% noch etwas stärker gebildet als durch CYP 1A1. Die Wiederfindung der IF berechnet über die Flächensumme liegt für beide Enzyme bei über 90%. Die detaillierte Darstellung der Analysendaten ist im Anhang (Tabelle A4) zu finden.

3.2.3.2 Formononetin

Durch die eingesetzten MIKs und Supersomen wird FORM zu vier Hauptmetaboliten umgesetzt. Neben dem durch oxidative Demethylierung entstehenden DAI sind drei monohydroxylierte Metabolite detektierbar. Gemäß dem Vergleich der Analysendaten mit den Ergebnissen einer *in vitro* Studie mit induzierten MIKs, handelt es sich um 8-Hydroxy-FORM (FORM M1), 3'-Hydroxy-FORM (FORM M2) sowie 6-Hydroxy-FORM (FORM M4) (Kulling, 2001). Die CYPs 1A1 und 2E1 werden nicht in das Screening einbezogen, da aufgrund der Inkubationsergebnisse mit BioA davon auszugehen ist, dass sie eine gute Aktivität der Metabolisierung von FORM zeigen. Sie werden direkt gemeinsam mit den MIKs in höherer Enzymkonzentration eingesetzt (0,1 nmol CYP/mL Ansatz). Zur Klärung der Frage, ob FORM durch weitere CYP-Enzyme umgesetzt wird, wird ein Screening mit den CYPs 2C9, 2D6 und 3A4 bei halbiertem Enzymkonzentration durchgeführt. Dabei ist in allen Fällen eine

Demethylierung zu jeweils etwa 1-2% festzustellen (Tabelle 26). Die Aktivität nimmt dabei in der Reihung 2D6>3A4>2C9 ab. Zusätzliche Hydroxylierungsprodukte sind nicht detektierbar.

Tabelle 26: Umsetzung von FORM mit einzelnen CYPs. Der Umsatz ist kalkuliert als Flächenanteil [%] bezogen auf die Kontrollwertfläche jeweils als Mittelwert einer Doppelbestimmung

	CYP 1A1	CYP 2C9	CYP 2D6	CYP 2E1	CYP 3A4
FORM	nn	104,6	103,4	nn	92,7
Schwankungsbreite		103,8-105,5	101,0-105,8		92,3-93,1
DAI	nn	1,4	1,9	nn	1,8
Schwankungsbreite		1,2-1,6	1,8-2,0		1,7-1,9

Da keine der im Screening untersuchten CYPs eine hohe Aktivität aufweisen, werden diese nicht im Detail untersucht. Die Inkubationen von FORM mit den MIKs sowie den CYPs 1A1 und 2E1 ergeben eine sehr heterogene Metabolitenbildung wie Abbildung 13 zeigt. Die Inkubation mit Sprague-Dawley-RLM (weiblich wie männlich) führt zur geringsten Metabolitenbildung. Neben der Bildung von DAI mit knapp 2% Peakflächenanteil bezogen auf die Kontrolle ist die Bildung von 6-Hydroxy-FORM nachweisbar. Nur durch Sprague-Dawley-RLM aus weiblichen Tieren wird in geringem Maße auch die Bildung von 8-Hydroxy-FORM und 3'-Hydroxy-FORM katalysiert (<1%). Die Lewis- und Wistar-RLM (weiblich wie männlich) verhalten sich sehr ähnlich und katalysieren dominierend die Demethylierung (5,5-7,5%). 6-Hydroxy-FORM

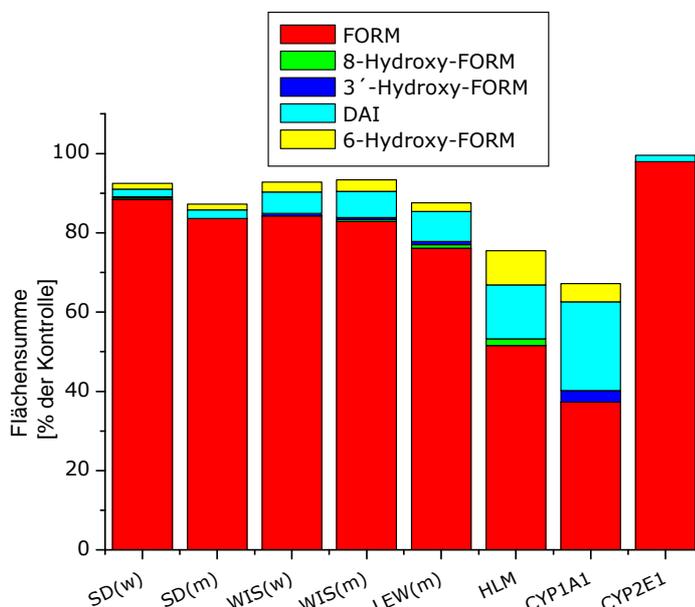


Abbildung 13: Untersuchung von FORM und seinen oxidativen Metaboliten nach Inkubation mit den verschiedenen MIKs und den rekombinanten CYPs 1A1 und 2E1. Unverändertes Substrat sowie gebildete Metabolite sind als Mittel der Flächenprozentage einer Dreifachbestimmung bezogen auf die gemittelte Kontrollwertfläche (Doppelbestimmung) angegeben.

wird zu einem Anteil von 2-3% gebildet. Die Bildung von 8-Hydroxy-FORM und 3'-Hydroxy-FORM ist in allen Fällen äußerst gering (<1%) und für Wistar-RLM (weiblich) wird 8-Hydroxy-FORM nicht detektiert. Für alle untersuchten RLM liegt die Wiederfindung zwischen 87% und 94%, nennenswerte Substanzverluste treten also nicht auf (siehe auch Anhang, Tabelle A5).

Durch HLM findet eine intensive Demethylierung zu DAI statt (14%). Mit 8-Hydroxy-FORM (2%) und 6-Hydroxy-FORM (9%) werden daneben zwei monohydroxylierte Metabolite gebildet. Insgesamt ist im Vergleich zu den RLM eine geringere Wiederfindung von im Mittel 76% zu beobachten. Für Umsetzungen mit den CYPs 1A1 und 2E1 zeigt sich ein unterschiedliches Bild. CYP 1A1 bildet dominierend DAI (22%) sowie zusätzlich die monohydroxylierten FORM-Derivate 3'-Hydroxy-FORM (3%) und 6-Hydroxy-FORM (4,5%). Für CYP 2E1 ist, anders als für die Umsetzung von BioA, nur eine geringe Aktivität festzustellen, und es wird DAI als einziger Metabolit mit einer Intensität von knapp 2% gebildet. Die Wiederfindung bei Inkubation mit CYP 2E1 liegt bei 100%, während für CYP 1A1 nur 67% wiedergefunden werden.

3.2.4 Beeinflussung des oxidativen Metabolismus von Formononetin durch Irilon

Die Umsetzung von FORM (21,5 µM) durch CYP 1A1 (100 pmol/mL) in Gegenwart von IRI (18,5 µM) wird untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung des Metabolismus anderer IF durch IRI zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Aktivität von CYP 1A1 im Bezug auf die Umsetzung von FORM bei Coinkubation mit IRI stark herabgesetzt ist. Abbildung 14 zeigt die Intensität der Metabolitenbildung anhand der detektierten Peakflächen für die Metabolite 6-Hydroxy-FORM, 8-Hydroxy-FORM und DAI. Im Vergleich zum Referenzversuch (grün), bei dem kein IRI zugesetzt wurde, ist die Bildung aller drei Metaboliten für die Coinkubation (rot) deutlich niedriger.

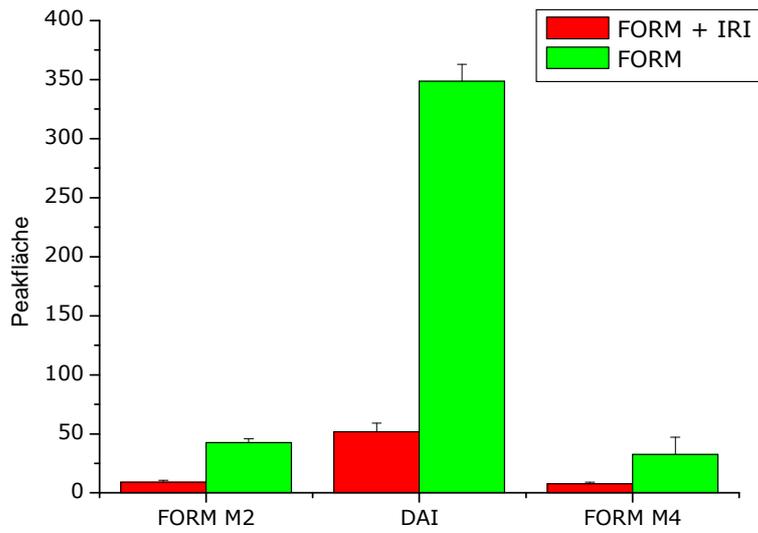


Abbildung 14: Inkubation von Formononetin (FORM) mit CYP 1A1 in An- und Abwesenheit von Irilon (IRI). Dargestellt ist die detektierte Peakfläche der Metaboliten von FORM nach Inkubation unter Standardbedingungen ohne IRI (grün) und bei Coinkubation mit IRI (rot).

3.3 *In vitro* Phase-II-Metabolismus von Irilon

Zur Untersuchung des Phase-II-Metabolismus von IRI werden zunächst *in vitro* Umsetzungen mit Leber-MIKs verschiedener Säugerspezies (Mensch, Ratte, Schwein) und aktivierter Glucuronsäure als Cosubstrat durchgeführt. Ergänzend folgen Untersuchungen mit rekombinanten humanen UGTs. Die qualitative und quantitative Analyse erfolgt mittels HPLC-DAD-MS.

Eine Konjugation des IRI-Moleküls kann ohne vorherigen Phase-I-Metabolismus an den freien Hydroxyfunktionen in Position C-4' oder C-5 sowie an beiden Stellen durch Glucuronsäure erfolgen. Nach flüssigchromatographischer Trennung an einer Umkehrphase sind die Glucuronide aufgrund ihrer höheren Polarität bei kürzeren Retentionszeiten zu detektieren.

3.3.1 Aktivitätsscreening gegenüber Irilon

In einem Screening der verfügbaren UGTs sowie der MIKs wird untersucht, ob und welche der in Betracht gezogenen Enzyme eine Umsetzung von IRI katalysieren. Nach HPLC-DAD-MS-Analyse ist erkennbar, dass die UGTs 1A1, 1A7, 1A8, 1A9 und 1A10 sowie alle drei Säugerleber-MIKs IRI zu einem oder beiden möglichen Monoglucuroniden umsetzen. Die Identifizierung der Glucuronide erfolgt anhand der Masse-Ladungszahl ($m/z = 473$ für das Quasimolekülion $[M-H]^-$ des Monoglucuronids bzw. $m/z = 649$ für das Diglucuronid) und den UV-Spektren. Abhängig von Enzym bzw. Spezies, aber auch von der Substratkonzentration (2,5 μM und 25 μM) werden die beiden Glucuronide in deutlich unterschiedlichem Maß und Anteil gebildet. Diglucuronide sind nicht detektierbar. In Abbildung 15 sind exemplarisch das HPLC-DAD und die HPLC-MS-Chromatogramme der Umsetzung von IRI (25 μM)

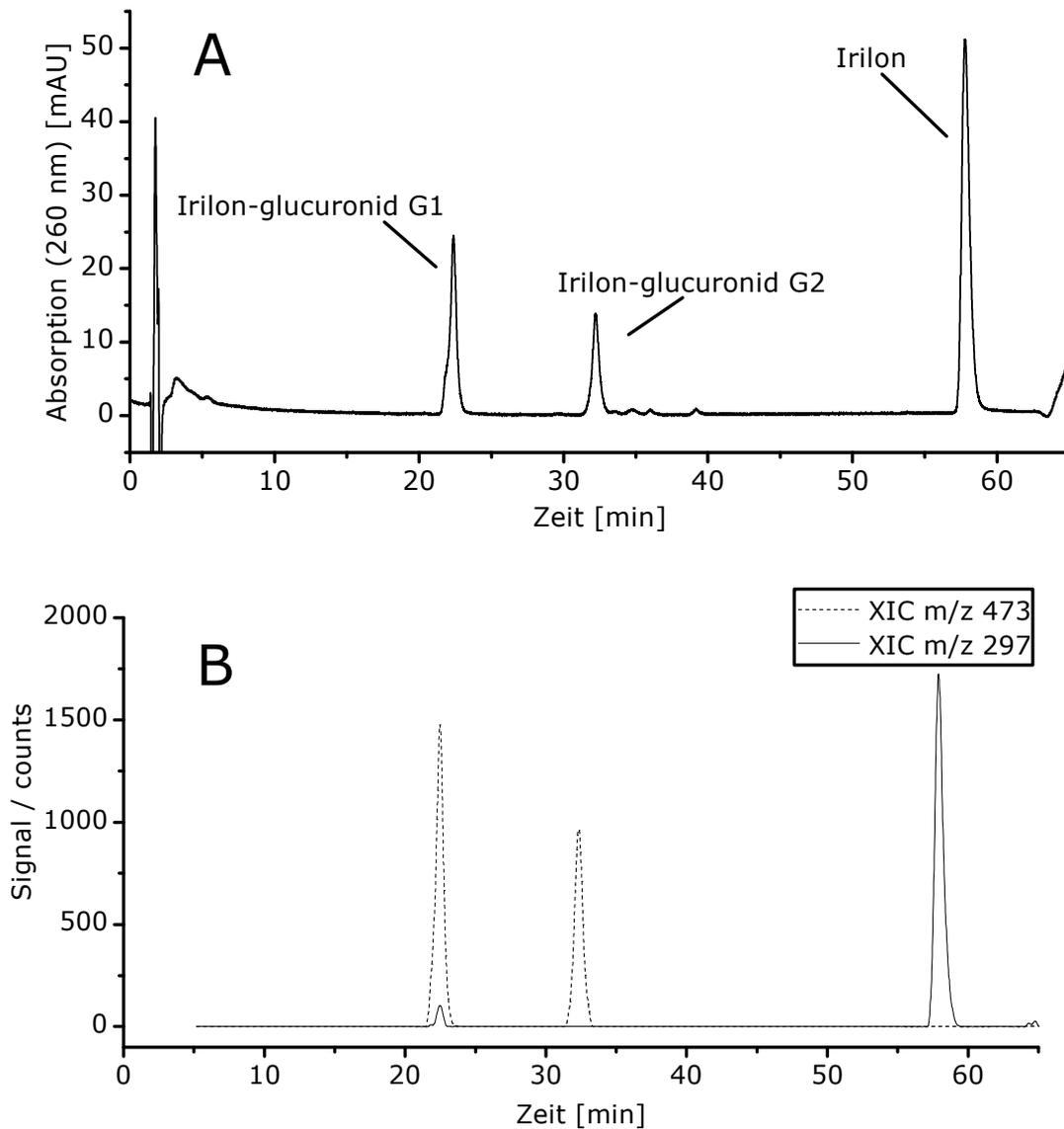


Abbildung 15: Chromatogramme der Inkubation von Irilon (25 µM) mit RLM.

A: HPLC-UV- Chromatogramm bei 260 nm.

B: HPLC-MS Extracted-Ion-Chromatogramm (XIC) auf den Massenspuren $m/z = 297$ ($[M-H]^-$ Aglycon) und $m/z = 473$ ($[M-H]^-$ Monoglucuronid).

mit RLM dargestellt. Teil B der Abbildung zeigt die MS-Chromatogramme mit RLM für die Massenspuren mit $m/z = 297$ für das Aglycon und $m/z = 473$ für die Monoglucuronide dargestellt. Gemäß der kürzeren Elutionszeit in der HPLC wird das Glucuronid mit der Retentionszeit von 22,4 min zunächst als Glucuronid 1 (G1) und das bei 32,2 min Folgende als Glucuronid 2 (G2) bezeichnet. Bei einer RT von 57,8 min eluiert das Substrat IRI. Die Absorptionsmaxima liegen bei 265 nm für G1, 270 nm für G2 und 272 nm für IRI. Berechnet nach Formel (6) (Kapitel 6.1) lässt

sich über die eingesetzte Substratmenge und das Flächenverhältnis von Produkt zur Flächensumme aus Substrat und Produkten die Aktivität der Enzyme im Bezug auf IRI erhalten (siehe Kapitel 2.3). Abbildung 16 macht deutlich, dass der Einsatz von einer zehnfach höheren Substratkonzentration nicht zu einer Verzehnfachung der Intensität der Bildung der beiden Glucuronide führt.

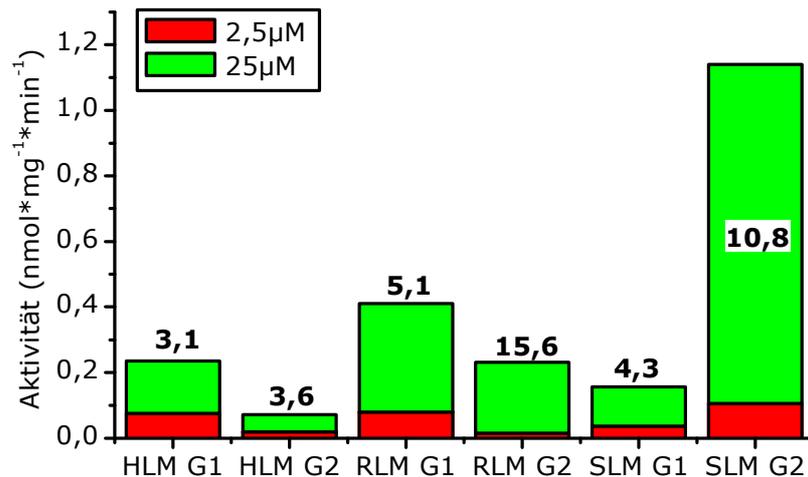


Abbildung 16: Aktivität der drei Säugermikrosomen (HLM, RLM, SLM) hinsichtlich der Bildung der zwei Glucuronide G1 und G2 bei einer Irilon-Konzentration von 2,5 µM (rot) und von 25 µM (grün). Die Zahlen an den Balken geben den Faktor der Aktivitätssteigerung von 2,5 µM auf 25 µM Substrat an.

Für G1 resultiert aus einem zehnfachen Substratangebot nur eine um den Faktor 3 (HLM) bis 5 (SLM) gesteigerte Umsatzrate. Ein anderes Bild ergibt sich für G2, welches von RLM bei Einsatz einer zehnfachen Substratkonzentration in gut 15-facher Menge gebildet wird. Für SLM liegt diese Steigerung in der Metabolitenbildung für G2 bei Faktor 11, lediglich die HLM zeigen mit Faktor 3,6 eine Steigerung ähnlich der Zunahme bei der G1-Bildung. Zusammenfassend ist für das Screening der MIKs festzustellen, dass alle drei Spezies gleichermaßen die Bildung beider IRI-Glucuronide katalysieren.

Von den untersuchten UGTs (1A1, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 und 2B15) sind mit Ausnahme des Isoenzym 2B15 ebenfalls alle in der Lage, die Bildung von mindestens einem Glucuronid zu katalysieren (siehe Abbildung 17). Bei einer Substratkonzentration von 2,5 µM IRI bilden alle diese UGTs genau ein Glucuronid in deutlich unterschiedlichen Mengen. Dabei wird G2

ausschließlich von UGT 1A10 gebildet. Bei der zehnfachen Substratkonzentration kann für dieses Isoenzym nach wie vor nur die Bildung von G2 detektiert werden. Für die UGTs 1A7 und 1A9 ist ebenso nur ein Produkt (G1) nachweisbar. Für UGT 1A1 und 1A8 ist bei einer

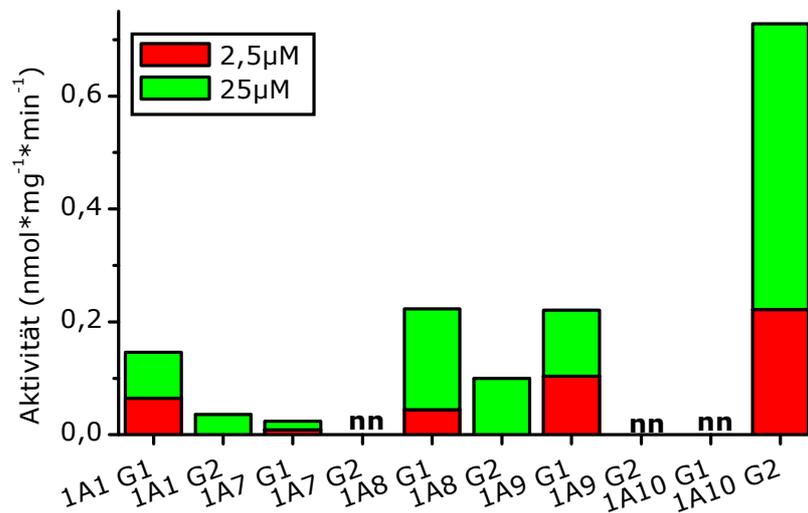


Abbildung 17: Aktivität der UGTs für die Bildung der zwei Glucuronide G1 und G2 bei einer Irilon-Konzentration von 2,5 µM (rot) und 25 µM (grün).

IRI-Konzentration von 25 µM zusätzlich zu G1 auch eine Bildung von G2 messbar. Der Anstieg der Aktivität bei Verzehnfachung der Substratkonzentration schwankt hier zwischen Faktor 2 (UGT 1A9, Bildung von G1) und etwa Faktor 5 (UGT 1A8, Bildung von G1).

Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche gegenseitige Beeinflussung oder eine atypische Kinetik bei der Bildung der beiden Glucuronide hin. Insbesondere die Tatsache, dass bei Verzehnfachung der Substratmenge durch RLM eine mehr als zehnfache Aktivitätssteigerung für die Bildung von G2 folgt, ist ein Hinweis auf eine autoaktivierte Kinetik. Um Aussagen über eventuelle Inhibitionen und Aktivierungen treffen zu können, sind kinetische Untersuchungen notwendig, die im Folgenden beschrieben werden.

3.3.2 Untersuchung der kinetischen Parameter k_m und V_{max}

Zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter k_m und V_{max} werden zunächst die Reaktionsbedingungen für die UGT bzw. die MIK-Inkubationen angepasst, um zu gewährleisten, dass im linearen Bereich gearbeitet wird. Als Inkubationszeit für die Aufnahme der kinetischen Daten werden unterschiedliche Zeitspannen gewählt, die für eine IRI-Konzentration von 10 μM für UGTs und 100 μM für MIKs in einem Konzentrationsbereich von 0,2-0,4 mg Protein/mL als optimal ermittelt wurden (Tabelle 27).

Tabelle 27: Optimierte Inkubationszeiten und Proteinkonzentrationen für die Umsetzung von Irilon mit den UGTs und MIKs zur Aufnahme der enzymkinetischen Daten.

Supersomen/ Mikrosomen	Proteinkonzentration [mg/mL]	optimierte Inkubationszeit [min]
UGT 1A1	0,375	30
UGT 1A7	0,375	120
UGT 1A8	0,375	30
UGT 1A9	0,375	30
UGT 1A10	0,375	15
HLM	0,192	60
RLM	0,262	90
SLM	0,245	60

Unter Anwendung der optimierten Parameter werden die kinetischen Daten in einem Konzentrationsbereich von 1 μM bzw. 2,5 μM bis 75 μM (in einigen Fällen bis 150 μM) IRI aufgenommen.

Über die in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Auswerte- und Linearisierungsverfahren werden die enzymkinetischen Parameter k_m und V_{max} bestimmt. In den meisten Fällen führen die angewendeten Verfahren nur im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich des Substrates IRI zu einer linearen Funktion. In einigen Fällen muss aber vor allem für die Kinetik der G2-Bildung festgestellt werden, dass eine Auswertung über die Verfahren nach Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee zu keinen auswertbaren Ergebnissen führt. Für HLM zeigt sich, dass bis zu einer

Substratkonzentration von etwa 50 μM die Werte für G1 und G2 sehr gut durch alle drei Linearisierungen auswertbar sind (Abbildung 18). Im Diagramm der Michaelis-Menten-Auftragung von Aktivität (v) gegen Substratkonzentration (S) ist bei höheren Konzentrationen dann ein Rückgang von v für die Bildung beider Glucuronide zu erkennen, der auf eine Inhibition hinweist.

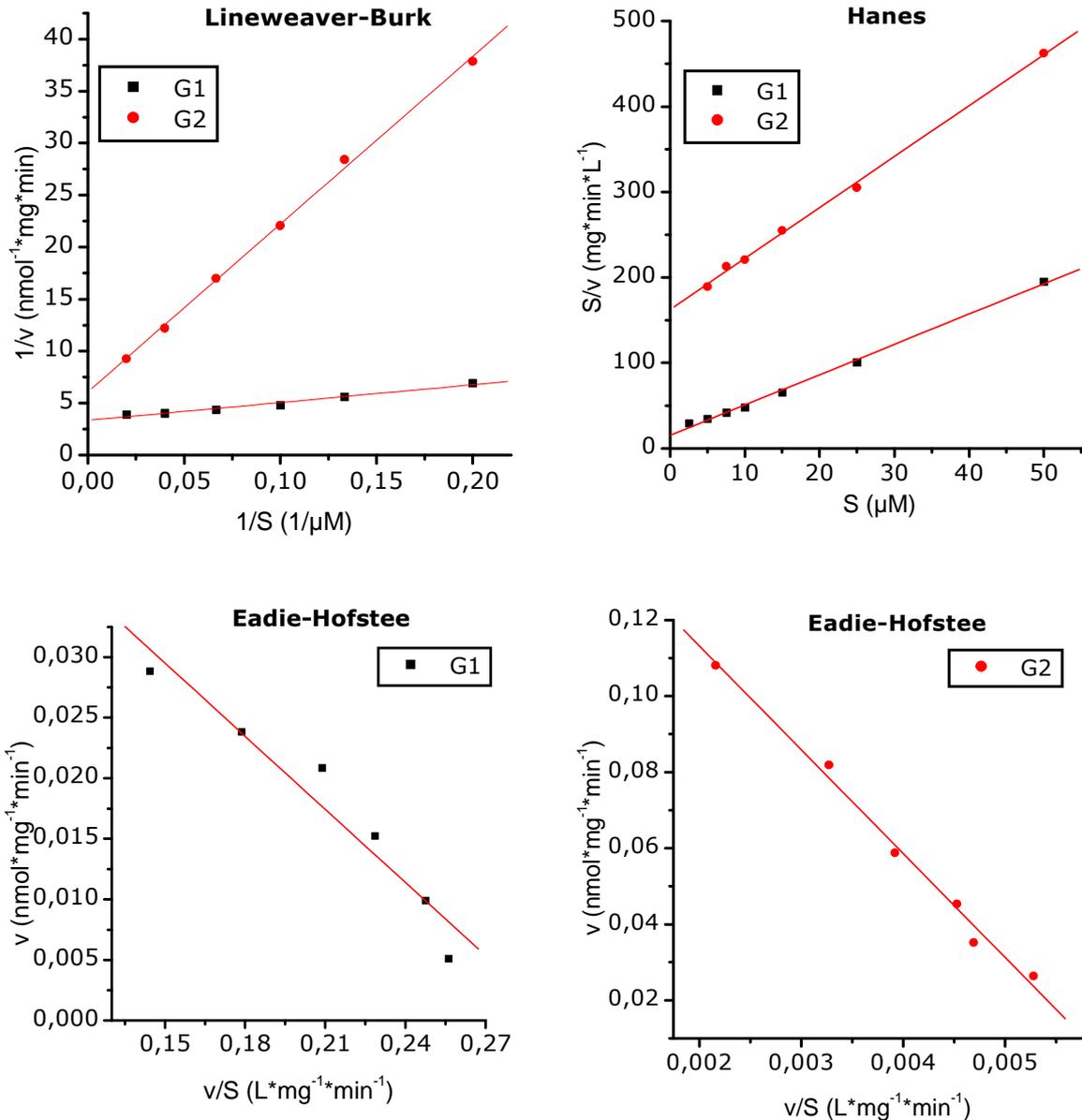


Abbildung 18: Diagramme der Bildung von Glucuronid 1 (G1) und Glucuronid 2 (G2) durch HLM in den Darstellungen nach Lineweaver-Burk, Hanes und Eadie-Hofstee im Substratkonzentrationsbereich von 5-50 μM . Zusätzlich ist die Darstellung nach Michaelis-Menten im Bereich bis 100 μM gezeigt.

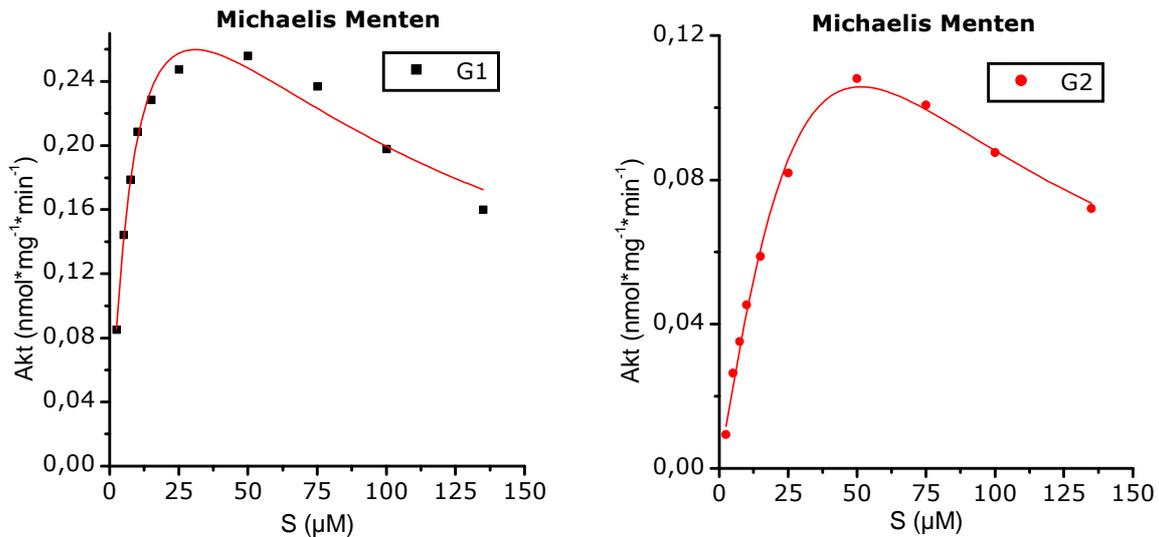


Abbildung 18: Fortsetzung

Die Linearisierung nach **Lineweaver-Burk** ist demnach nur in dem genannten Konzentrationsbereich auswertbar und ergibt folgende Geradengleichungen und kinetische Parameter (Abbildung 18):

Für G1: $y = 17,15x + 3,34$
 $V_{\max} = 0,30 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$
 $k_m = 5,1 \text{ }\mu\text{M}$

Für G2: $y = 161,3x + 6,09$
 $V_{\max} = 0,16 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$
 $k_m = 26,5 \text{ }\mu\text{M}$

Bei Anwendung des Auswerteverfahrens nach **Eadie-Hofstee** lassen sich für den Bereich bis zu einer Substratkonzentration von 50 µM folgende Parameter errechnen (Abbildung 18):

Für G1: $y = -4,66x + 0,29$
 $V_{\max} = 0,29 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$
 $k_m = 4,7 \text{ }\mu\text{M}$

Für G2: $y = -27,3x + 0,168$
 $V_{\max} = 0,17 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$
 $k_m = 27,3 \text{ }\mu\text{M}$

Die Auswertung nach **Hanes** führt in diesem Bereich schließlich zu folgenden Parametern (Abbildung 18):

Für G1: $y = 3,54x + 15,5$
 $V_{\max} = 0,28 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_m = 4,4 \text{ } \mu\text{M}$

Für G2: $y = 5,96x + 162,6$
 $V_{\max} = 0,17 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
 $k_m = 27,3 \text{ } \mu\text{M}$

Die enzymkinetischen Daten unter strikter Anwendung dieser Linearisierungsverfahren sind für alle untersuchten Enzymsuspensionen in Tabelle 28 angegeben. Höhere Substratkonzentrationen als $50 \text{ } \mu\text{M}$ weichen im Eadie-Hofstee-Diagramm deutlich von der linearen Funktion ab, da hier wieder geringer werdende Werte für v ermittelt werden. Es ergibt sich also keine Gerade, sondern eine Kurve für die G1-Bildung durch HLM (Abbildung 19), deren Form in der Literatur als Hinweis auf eine vorliegende Substratinhibition beschrieben wird (Ueng et al., 1997; Houston and Kenworthy, 2000).

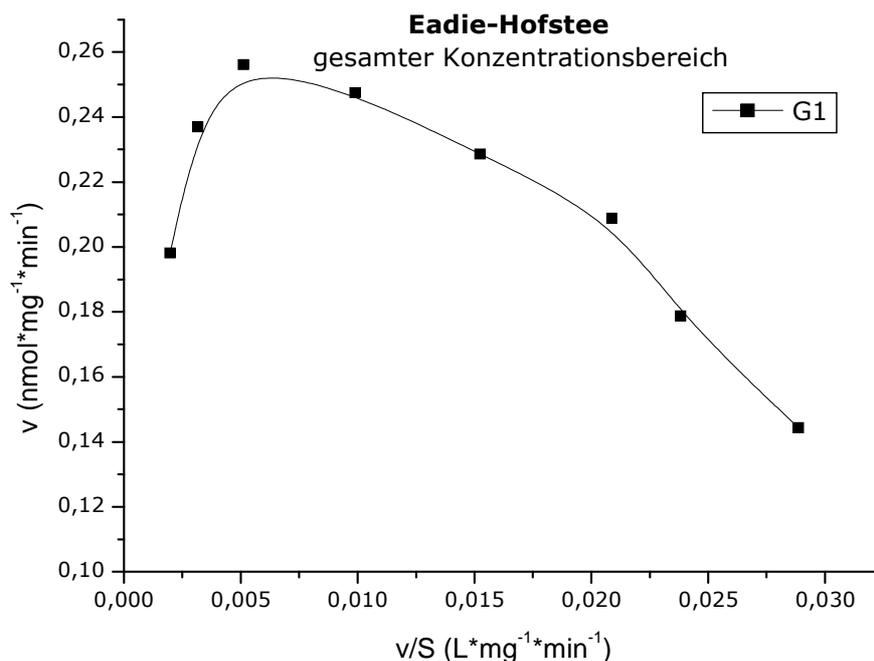


Abbildung 19: Eadie-Hofstee Darstellung der Bildung von G1 durch HLM im gesamten Konzentrationbereich von 5-150 μM .

Nimmt man eine **Substratinhibition** für die Bildung von G1 an und verwendet die entsprechende Formel nach Gleichung (8) (Kapitel 6.1) zur Auswertung über die Michaelis-Menten-Darstellung, erhält man folgende enzymkinetische Parameter mit der Inhibitionskonstante (k_S):

$$V_{\max} = 0,40 \pm 0,03 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$k_m = 8,7 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{M}$$

$$k_S = 121,7 \pm 22,8 \text{ } \mu\text{M}$$

Für die Bildung von G2 durch HLM lässt sich weder eine Anpassung unter der Annahme Substratinhibition noch gemäß einer Autoaktivierung sinnvoll durchführen, da in beiden Fällen die errechneten Schwankungsbreiten der Parameter sehr hoch sind ($k_m = 131 \pm 75 \text{ } \mu\text{M}$ für eine Substrathemmung bzw. ein R^2 von nur 0,95 für die sigmoide Anpassung). Andererseits kann aber auch keine der beiden Annahmen ganz ausgeschlossen werden.

Für die Leber-MIKs von Ratte und Schwein werden die enzymkinetischen Parameter analog bestimmt (Tabelle 29). Dabei ist für die **RLM** ein komplexes kinetisches Verhalten zu beobachten. Die einfache Auftragung von Substratkonzentration gegen Umsatzgeschwindigkeit ähnelt nur auf den ersten Blick dem Bild, das sich für die HLM in Abbildung 18 ergibt. Im Gegensatz zu der Kinetik der Bildung von G1, die erneut dem Verlauf einer Umsetzung mit Substrathemmung bei sehr hohen Substratmengen folgt, lässt sich zusätzlich für G2 bei niedrigen Konzentrationen ein sigmoider Kurvenverlauf erahnen (Abbildung 20). Durch die angewendeten Auswerteverfahren lassen sich zunächst in der Darstellung nach Lineweaver-Burk für die Bildung von G1 problemlos die Werte für k_m (13,7 μM) und V_{\max} (0,54 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) ablesen. Eine lineare Auswertung der Bildung von G2 ist nicht durchführbar. Die Auswertung nach Eadie-Hofstee liefert für G1 in niedrigen Konzentrationsbereich ganz ähnliche Werte wie die Lineweaver-Burk-Auswertung. Unter Einbeziehung der hohen Konzentrationen ist auch hier wie für die HLM das typische Bild

Tabelle 28: Ermittelte enzymkinetische Parameter V_{\max} [$\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] und k_m [μM] der Iriolonglucuronidierung durch unterschiedliche UGTs und MIKS. „n.d.“: Glucuronid nicht detektiert; „-“: keine lineare Anpassung möglich; „LB“: Auswertung nach Lineweaver-Burk; „EH“: Auswertung nach Eadie-Hofstee.

		IRI-G1-LB	IRI-G1-Hanes	IRI-G1-EH	IRI-G2-LB	IRI-G2-Hanes	IRI-G2-EH
UGT 1A1	V_{\max}	0,26	0,30	0,30	0,04	0,03	-
	k_m	9,1	10,4	10,4	3,8	0,73	-
UGT 1A7	V_{\max}	0,03	0,02	0,02	n.d.	n.d.	n.d.
	k_m	5,5	3,8	5,1	n.d.	n.d.	n.d.
UGT 1A8	V_{\max}	0,31	0,28	-	0,16	0,16	-
	k_m	18,1	14,8	-	20,1	19,5	-
UGT 1A9	V_{\max}	0,25	0,26	0,25	n.d.	n.d.	n.d.
	k_m	4,1	4,9	4,2	n.d.	n.d.	n.d.
UGT 1A10	V_{\max}	n.d.	n.d.	n.d.	0,84	0,91	0,85
	k_m	n.d.	n.d.	n.d.	7,5	8,9	7,6
HLM	V_{\max}	0,30	0,28	0,29	0,16	0,17	0,17
	k_m	5,1	4,3	4,7	26,5	27,3	27,3
RLM	V_{\max}	0,54	0,55	0,55	-	-	-
	k_m	13,7	11,2	11,3	-	-	-
SLM	V_{\max}	0,19	0,23	0,23	-	-	-
	k_m	10,5	12,4	12,6	-	-	-

einer substratgehemmten Kinetik zu erkennen. Für G2 beschreibt die Darstellung nach Eadie-Hofstee eine nach links geöffnete Ellipse, die als Indikator für einen sigmoiden kinetischen Verlauf der Reaktion gilt (Abbildung 20). Dies deckt sich mit dem Kurvenverlauf von $[v]$ gegen $[S]$ aus der Michaelis-Menten-Darstellung und deutet somit auf einen kinetischen Verlauf hin, der auf einer schwachen Autoaktivierung beruht. Zusätzlich deutet der leichte Abfall der Enzymaktivität bei sehr hohen Substratkonzentrationen auf eine Substratinhibierung hin. Eine solche gemischte Kinetik ist mit der Zusammensetzung von MIKS, die verschiedene UGTs enthalten, erklärbar. Sie kann aber nicht ohne Weiteres aus der Darstellung nach Eadie-Hofstee abgelesen werden.

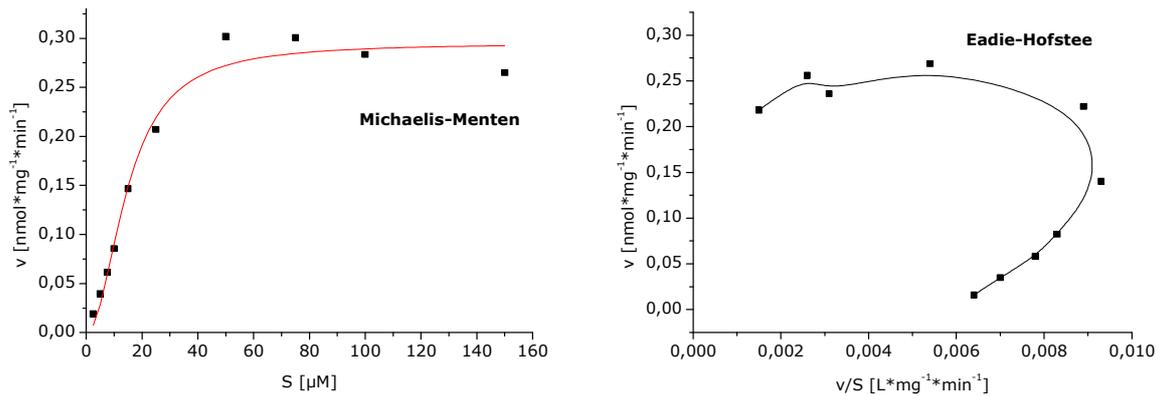


Abbildung 20: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Darstellung für die Bildung von G2 bei Umsetzung von Irilon mit RLM dargestellt für den gesamten Konzentrationsbereich.

Für die Bildung von G1 durch RLM lassen sich durch Anpassung folgende kinetische Parameter einer Substratinhibition bestimmen:

$$V_{\max} = 0,89 \pm 0,28 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$$

$$k_m = 20,4 \pm 10,3 \text{ } \mu\text{M}$$

$$k_s = 80,1 \pm 47,7 \text{ } \mu\text{M}$$

Für G2 lassen sich durch Anpassung folgende Werte eines sigmoiden Reaktionsverlaufes errechnen. „n“ gibt dabei den Grad der Sigmoidität an:

$$V_{\max} = 0,25 \pm 0,01 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$$

$$k = 12,6 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{M}$$

$$n = 2,5 \pm 0,5$$

Die Umsetzung mit **SLM** führt für die Bildung von G1 in niedrigen Konzentrationsbereich bis etwa 50 μM für alle Auswerteverfahren ebenso zu einer linearen Funktion mit vergleichbaren Kenndaten. Bei sehr hohen IRI-Konzentrationen ist auch hier für die Bildung von G1 in der Eadie-Hofstee-Darstellung eine Substrathemmung ablesbar. Eine dementsprechende Auswertung führt zu einem V_{\max} von $0,26 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$, einem k_m von $14,1 \text{ } \mu\text{M}$ sowie einer sehr hohen Hemmkonstante k_s von $214,5 \text{ } \mu\text{M}$. Das durch SLM dominierend gebildete G2 zeigt auch hier eine abweichende Kinetik. Die Auswertung nach Lineweaver-Burk ist zwar rechnerisch möglich, liefert aber mit einem k_m von über $75 \text{ } \mu\text{M}$ und

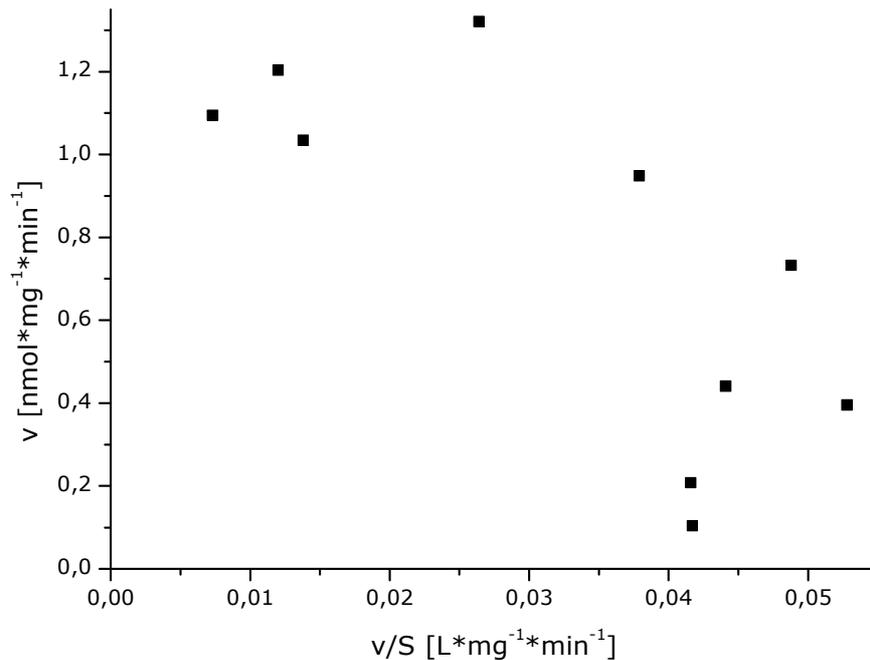


Abbildung 21: Eadie-Hofstee-Darstellung der Bildung von G2 aus Irilon durch SLM.

$V_{\max} = 3,4 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$ Werte, die nicht dem Verlauf der Kurve in der Michaelis-Menten-Auftragung von S gegen v entsprechen. Der Eadie-Hofstee-Plot gibt einen zusätzlichen Hinweis auf eine atypische Kinetik, die allerdings nicht eindeutig einer Substrathemmung oder Autoaktivierung zuzuordnen ist (Abbildung 21). Eine Auswertung nach Hanes führt für G2 ebenso zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Eine Anpassung an einen sigmoiden Kurvenverlauf ($R^2 = 0,958$) führt zu $V_{\max} = 1,2 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$ sowie $k = 11,6$ und $n = 2,0$. Mit einer fast identischen Standardabweichung der einzelnen Messpunkte von der angepassten Kurve ($R^2 = 0,959$) ist aber auch eine Substratinhibition denkbar, die zu $V_{\max} = 3,0 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$ sowie $k_m = 48,9$ und $k_s = 96,4 \text{ nmol*mg}^{-1}\text{*min}^{-1}$ führt. Zusammenfassend kann somit für die Bildung von G2 durch SLM kein eindeutiges kinetisches Modell vorgeschlagen werden. Tabelle 29 fasst die Auswertung der kinetischen Daten für die Leber-MIKs unter Berücksichtigung der atypischen Kinetiken zusammen.

Tabelle 29: Ermittelte enzymkinetische Parameter V_{\max} [$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] und k_m [μM] der Irlonglucuronidierung durch unterschiedliche UGTs und MIKs unter Berücksichtigung der atypischen Kinetiken. „n.d.“: Glucuronid nicht detektiert; „-“: Modell kommt nicht in Betracht; „ S_{50} “: Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit einer autoaktivierten Kinetik; „n“: Grad der Sigmoidität; „ k_s “: Hemmkonstante [μM].

Enzym		IRI-G1-Subinh.	IRI-G1-Autoakt.	IRI-G2-Subinh.	IRI-G2-Autoakt.
1A1	V_{\max}	$0,74 \pm 0,27$	-	n.a.	n.a.
	k_m	$27,7 \pm 12,0$	-	n.a.	n.a.
		$k_s = 7,6 \pm 3,4$	-	n.a.	n.a.
1A7	V_{\max}	$0,04 \pm 0,01$	-	n.d.	n.d.
	k_m	$9,4 \pm 2,5$	-	n.d.	n.d.
		$k_s = 101 \pm 37,9$	-	n.d.	n.d.
1A8	V_{\max}	$1,4 \pm 0,92$	-	-	$0,11 \pm 0,01$
	k_m	$107 \pm 77,9$	-	-	$S_{50} = 10,0 \pm 2,1$
		$k_s = 14,5 \pm 11,3$	-	-	$n = 1,6 \pm 0,6$
1A9	V_{\max}	$0,27 \pm 0,03$	-	n.d.	n.d.
	k_m	$5,0 \pm 1,5$	-	n.d.	n.d.
		$k_s = 533 \pm 590$	-	n.d.	n.d.
1A10	V_{\max}	n.d.	n.d.	$1,0 \pm 0,23$	$0,64 \pm 0,05$
	k_m	n.d.	n.d.	$10,3 \pm 4,3$	$S_{50} = 4,4 \pm 0,9$
		n.d.	n.d.	$k_s = 121 \pm 79,0$	$n = 1,5 \pm 0,5$
HLM	V_{\max}	$0,40 \pm 0,03$	-	$0,63 \pm 0,33$	-
	k_m	$8,7 \pm 1,2$	-	$131 \pm 75,3$	-
		$k_s = 122 \pm 23$	-	$k_s = 20,9 \pm 13,2$	-
RLM	V_{\max}	$0,89 \pm 0,28$	-	-	$0,25 \pm 0,01$
	k_m	$20,4 \pm 10,3$	-	-	$S_{50} = 12,6 \pm 1,1$
		$k_s = 80,1 \pm 47,7$	-	-	$n = 2,5 \pm 0,5$
SLM	V_{\max}	$0,26 \pm 0,04$	-	-	$1,18 \pm 0,06$
	k_m	$14,1 \pm 3,9$	-	-	$S_{50} = 11,6 \pm 1,5$
		$k_s = 215 \pm 97,4$	-	-	$n = 2,0 \pm 0,5$

Für die unterschiedlichen **UGTs** lassen sich in allen Fällen gut übereinstimmende enzymkinetische Parameter über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk und Hanes errechnen. Damit ist in der Regel eine Auswertung im Sinne einer Kinetik nach Michaelis-Menten möglich, die zu den in Tabelle 28 dargestellten Kenndaten führt. Eine Auswertung nach Eadie-Hofstee ist nur in den Fällen durchführbar, in denen lediglich ein einziges Glucuronid gebildet wird. Generell lässt sich für alle rekombinanten UGTs bei hohen Substratkonzentrationen ein leichter Rückgang der Umsatzgeschwindigkeit erkennen, der aber weit weniger ausgeprägt ist als bei den MIKs. Da sich dieser Effekt vielfach nur bei der höchsten eingesetzten Substratkonzentration auswirkt, ist eine entsprechende Auswertung im Sinne einer atypischen Substrathemmung hier mit einer größeren Unsicherheit behaftet, die sich an den in Tabelle 29 angegebenen Schwankungsbreiten ablesen lässt. Bei den Enzymen UGT 1A1 und 1A8, die beide Produkte bilden, ist eine deutlichere atypische Kinetik abzulesen, die auch hier auf eine Substratinhibition hindeutet. Eine entsprechende Auswertung der Bildung von G1 über eine Anpassung nach der Gleichung aus Kapitel 6.1 führt bei UGT 1A1 zu Werten von $k_m = 27,7 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 0,74 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei einer starken Hemmkonstante von $k_s = 7,6 \mu\text{M}$. Die Bildung von G2 ist nicht eindeutig auswertbar. Für das UGT 1A8-Enzym lassen sich für die G1-Bildung $k_m = 106,7 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 1,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei einer weniger starken Hemmkonstante von $k_s = 14,5 \mu\text{M}$ errechnen. Hier ist auch die G2-Bildung einer autoaktivierten Kinetik folgend auswertbar. Der Grad der Sigmoidität liegt bei $n = 1,6$, $V_{\max} = 0,11 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $S_{50} = 10,0 \mu\text{M}$. Für beide UGTs ist eine Bildung von G2 erst ab einer Substratkonzentration von 5-7,5 μM detektierbar.

Für die weiteren UGTs ist eine sehr unterschiedliche Intensität der Glucuronidbildung zu erkennen. Dabei werden generell unter Berücksichtigung der atypischen Kinetiken höhere Werte der enzymkinetischen Parameter ermittelt, die aber nicht so stark von den durch Linearisierung erhaltenen abweichen wie bei den MIKs.

Dabei zeigt UGT 1A7 eine sehr geringe maximale Umsatzgeschwindigkeit von $0,02 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. UGT 1A10 stellt das andere Extrem dar, hier lässt sich mit allen angewendeten Linearisierungsverfahren eine V_{\max} von etwa $0,9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ermitteln.

3.3.3 Berechnung der intrinsischen Clearance (Cl_{int})

Als Maß für die Leistungsfähigkeit der einzelnen Enzyme bzw. MIKs wird die Cl_{int} berechnet. In Tabelle 30 sind die ermittelten Werte angegeben. Für die Berechnung der Clearance wird sowohl für die substratgehemmte Kinetik wie auch für Enzyme, die einer Michaelis-Menten-Kinetik folgen, der Quotient aus V_{\max} geteilt durch k_m verwendet. Praktisch bedeutet dies, dass die Cl_{int} als Maß für die bessere „Ausscheidbarmachung“ von IRI sowohl für kleine k_m , d.h. hohe Substrataffinität, wie auch große V_{\max} , d.h. hohe maximale Umsatzleistung, steigt. Für die sigmoiden kinetischen Verläufe, die mehr oder minder intensiv für die Bildung von G2 gefunden werden, ist zur Berechnung von Cl_{int} Formel (5) aus Kapitel 6.1 notwendig. Für die Bildung von G1 ist es in den meisten Fällen nicht von Belang, ob die kinetischen Parameter verwendet werden, welche die Substrathemmung berücksichtigen, oder ob die Linearisierungen der geringeren Substratkonzentrationen unterhalb des gehemmten Bereichs herangezogen werden. Durch die Auswertung der Hemmung steigen die enzymkinetischen Kenndaten jeweils um etwa den gleichen Faktor, so

Tabelle 30: Spalten eins und zwei geben das Verhältnis der beiden durch Säugermikrosomen gebildeten Glucuronide bei $2,5 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$ Substratkonzentration zueinander an. In der dritten Spalte ist die intrinsische Clearance (Cl_{int}) angegeben. Der erste Wert repräsentiert die Summe aus den beiden einzelnen Cl_{int} für G1 und G2 nach linearer Auswertung. Der zweite Wert gibt die analoge summarische Cl_{int} unter Berücksichtigung der atypischen Kinetiken an.

	IRI-G1/IRI-G2 bei $2,5 \mu\text{M}$	IRI-G1/IRI-G2 bei $25 \mu\text{M}$	Cl_{int} ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	
UGT 1A1			43	30,8
UGT 1A7			5	4,3
UGT 1A8			25	18,8
UGT 1A9			60	54,0
UGT 1A10			112	97,1 Subinh. 77,0 Autoakt.
HLM	4,02	3,33	65	50,7
RLM	5,07	1,78	54	53,5
SLM	0,35	0,14	77	69,3

dass die Clearance als ihr Quotient nahezu konstant bleibt. Dennoch ist für alle untersuchten Enzymsuspensionen der Unterschied in den für Cl_{int} berechneten Werten zu erkennen und bei Berücksichtigung der Hemmung wird die katalytische Effizienz um etwa 10% bis 25% niedriger bewertet. Im Vergleich liegen die drei MIKs in einem ähnlichen Bereich der katalytischen Effizienz. Mit Werten zwischen 59 und 70 ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) für die substratgehemmten Kinetiken ist ihre Leistungsfähigkeit in einem mittleren Bereich angesiedelt, verglichen mit den Cl_{int} -Werten, die für die verschiedenen UGTs ermittelt werden. Bei den UGTs ist allerdings die Bandbreite deutlich höher, angefangen mit dem Enzym 1A7, das nur einen Cl_{int} von $4,3 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ aufweist, bis hin zum sehr aktiven 1A10, das eine Cl_{int} von $97 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zeigt.

3.3.4 Strukturaufklärung

Da die Glucuronidierung von IRI durch MIKs und einige UGTs zu den beiden Glucuroniden G1 und G2 führt, ist eine Identifizierung notwendig. Die erhaltenen Massenspektren geben keine Anhaltspunkte für die Position der Konjugation mit Glucuronsäure. Die Tatsache, dass die UGTs 1A9 und 1A10 jeweils ausschließlich die Bildung eines Produktes katalysieren, kann aber zu Strukturanalyse genutzt werden. Unter der Annahme, dass diese beiden Enzyme für ein methyliertes IRI-Derivat die gleiche Regioselektivität aufweisen sollten, werden Inkubationen mit 5-O-Methyl-IRI durchgeführt. Hier ist die Hydroxyfunktion in Position C-5 methyliert und so für eine Konjugation mit Glucuronsäure nicht zugänglich. Nur jenes der beiden UGTs sollte eine Glucuronidierung dieser Verbindung katalysieren, welches für die noch freie Position C-4' spezifisch ist. Eine qualitative Durchführung unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.3) führte nur bei Einsatz des UGT 1A10 zur Bildung eines Glucuronides. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das UGT 1A9 eine Konjugation in Position C-5 katalysiert, die in diesem Fall nicht mehr zugänglich ist. Somit kann das Glucuronid G1 dem IRI-5-Glucuronid zugeordnet werden und G2 ist das IRI-4'-Glucuronid.

3.4 Reduktiver Metabolismus von Irimon

Ein Großteil der durch die Nahrung aufgenommenen IF und ihrer Derivate wird im Darm durch die vorhandene Mikrobiota umgesetzt. Da die IF und die gebildeten Metabolite aus dem Colon resorbiert werden können (Heinonen et al., 2004b), ist diese Verstoffwechslung durch Bakterien für die Beurteilung des Metabolismus und der Bioverfügbarkeit von IF von entscheidender Bedeutung. Um den *in vitro* IRI-Metabolismus durch die humane Darmflora zu untersuchen, werden in Zusammenarbeit mit dem DIfE Inkubationsstudien von IRI mit HFM durchgeführt. Aus dem Verlauf der Umsetzung werden Aliquots entnommen, mittels chromatographischer Methoden getrennt und massenspektrometrisch auf Metabolite untersucht.

3.4.1 HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS

Mittels HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS werden die Aliquots aus den Inkubationen von IRI mit den sieben Fäzesproben sowie den jeweiligen Referenzansätzen ohne Substratzusatz bzw. von IRI im Medium ohne Fäzessuspension analysiert. Generell wird durch den Vergleich der HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS-Chromatogramme der Umsetzungen und der Kontrollen nur ein zusätzlicher Peak sowohl durch UV wie auch durch ESI(+)-MS-Detektion gleichermaßen gefunden. Dieser Peak zeigt in der massenspektrometrischen Analyse die m/z von 301 amu – entsprechend dem für Dihydroirimon (DHI) zu erwartenden Quasi-molekülion $[M+H]^+$.

Abbildung 22 zeigt die Bildung von DHI sowie die Signalintensitäten für IRI in den unterschiedlichen Fäzesproben (FP) zu den sechs Entnahmezeitpunkten. In drei der untersuchten Stuhlproben wird eine Metabolitenbildung massenspektrometrisch deutlich detektiert und kann einem im UV detektierbaren Peak gleicher Retentionszeit zugeordnet werden. Mit den Proben FP7 und FP14 wird der Metabolit nur im sehr geringen Maße gebildet. Die Intensitäten des Peaks liegen in beiden Detektionsmethoden nur knapp über der Nachweisgrenze. Deutliche höhere Konzentrationen werden lediglich nach Inkubation mit Probe FP8 gefunden (Abbildung 22).

Die Tatsache, dass es sich bei dem gefundenen Peak tatsächlich um einen während der Inkubation gebildeten Metaboliten handelt, wird dadurch belegt, dass weder in den jeweiligen Fäzesproben ohne IRI-Zugabe noch in der Referenzinkubation von IRI im Medium ohne Fäzeszugabe dieser Peak auftritt. In dem unmittelbar zu Beginn der Inkubation entnommenen Aliquot (0 h) ist ebenso kein DHI nachweisbar.

IRI ist in allen Proben sowie in der Referenzinkubation in hoher Konzen-

tration detektierbar. Eine deutliche Abnahme der Signalintensität für IRI im Verlaufe der Inkubationsdauer mit den FP ist im Vergleich zu der Referenz ohne Fäzessuspension nicht festzustellen. Die Signalintensitäten zeigen jedoch sowohl innerhalb eines Ansatzes zu den sechs Entnahmezeitpunkten wie auch zwischen den Aliquoten aus den verschiedenen FP, die gleichzeitig entnommen wurden, große Schwankungen.

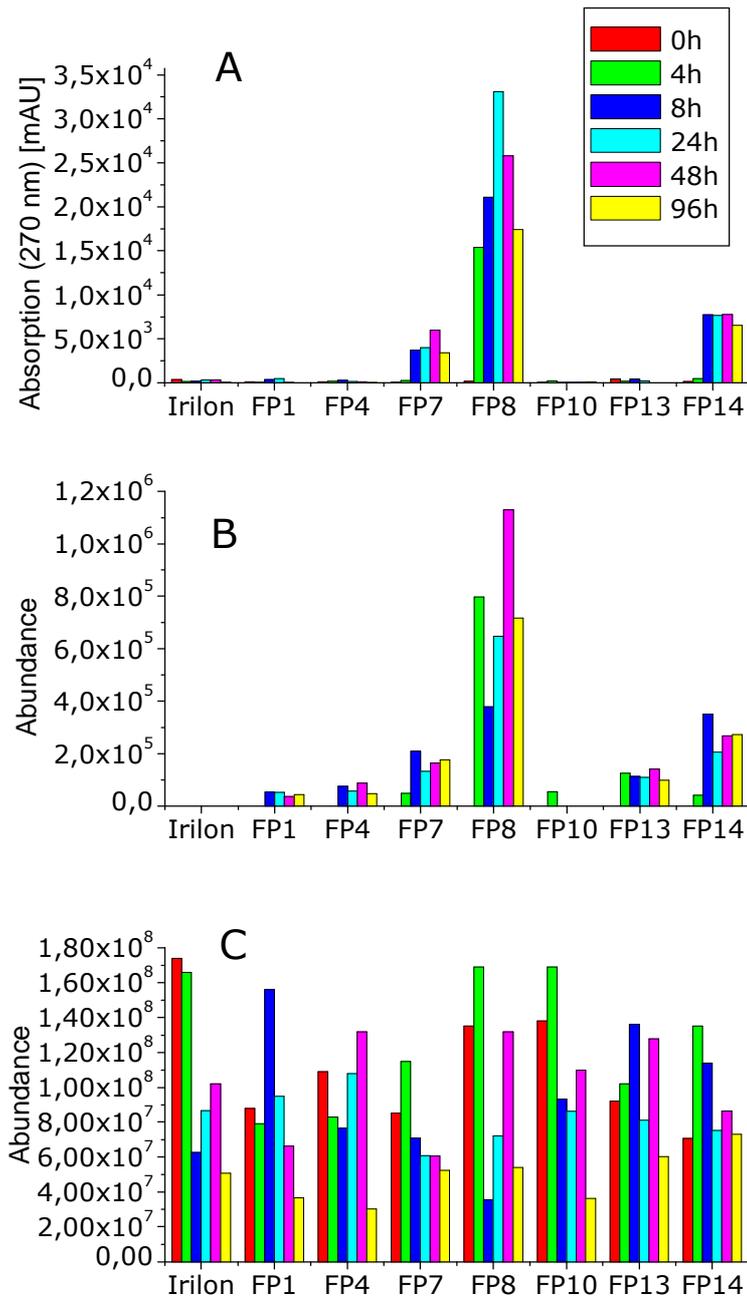


Abbildung 22: Signalintensitäten von Dihydroirilon (DHI) und Iriulon nach Inkubation mit den Fäzesproben (FP) zu den sechs Entnahmezeitpunkten. HPLC-DAD Analyse von DHI (A); HPLC-MS Auswertung von DHI (B) und IRI (C) im „Extracted-Ion-Monitoring“ bei $m/z = 301$ bzw. 299.

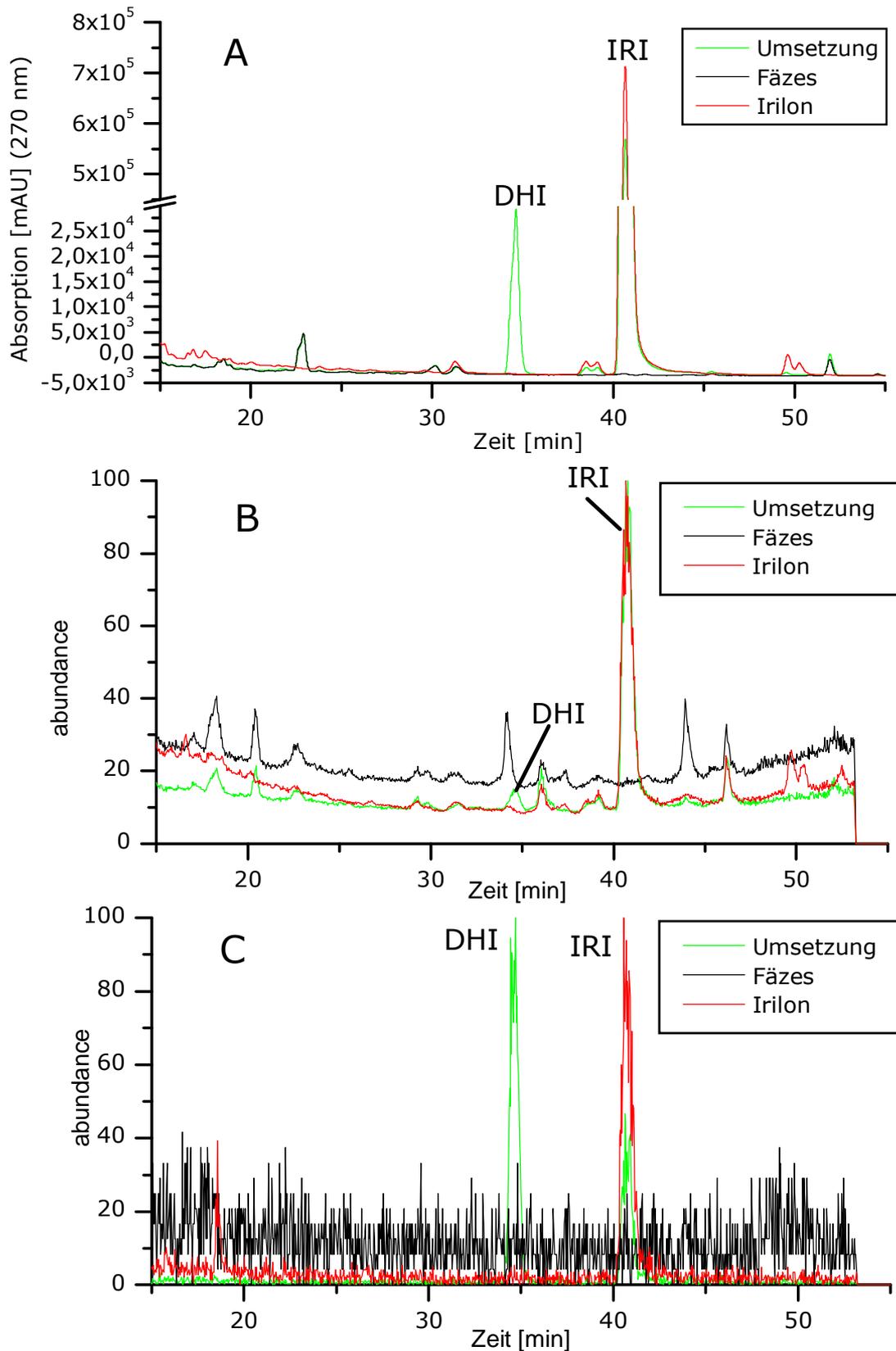


Abbildung 23: Chromatogramme der Analyse der 24-stündigen Inkubation von Iriion (IRI) ($190 \mu\text{M}$) mit Fäzesprobe 8 (grün), IRI ohne Fäzessuspension (rot) und Fäzesprobe 8 ohne IRI (schwarz) in UV-Detektion (A), im ESI(+)-MS-Totalionenstrom (B) und als ESI(+)-MS-Massenspur mit $m/z = 301$ (C).

Ein für die FP8 erhaltenes MS-Chromatogramm bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zeigt Abbildung 23. Der Peak bei einer RT von 40,7 min in Chromatogramm C resultiert aus unverändertem IRI, das zwei schwere Isotope enthält und somit ebenso eine m/z von 301 zeigt. Bei RT 37,4 min ist deutlich der gebildete Metabolitpeak im Chromatogramm der Umsetzung zu erkennen, während die Chromatogramme der Kontrollexperimente keinen Peak mit dieser Retentionszeit zeigen. Mittels HPLC-ESI(+)-MS/MS kann im XIC auch in den Proben FP1, 4 und 13 ein Peak bei der entsprechenden Retentionszeit von 47,4 min detektiert werden. Dieser ist aber in der ähnlich sensitiven UV-spektrometrischen Analyse nicht nachweisbar, so dass von einer Störung durch die Matrix in der MS-Analyse ausgegangen wird.

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Probemenge wurde bei der Analyse mittels HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS auf eine Quantifizierung oder Mehrfachbestimmung verzichtet.

3.4.2 GC-EI-MS/MS

Die GC-MS/MS-Analyse nach der Umsetzung von IRI mit HFM wird sowohl zur Identifizierung der entstehenden Metaboliten als auch zur Quantifizierung der Ausgangs- und Umsetzungsprodukte eingesetzt. Der Vergleich der Chromatogramme aus der Umsetzung von IRI mit HFM und den als Referenz mitgeführten Inkubationen von IRI wird auf Peaks untersucht, die ausschließlich in der Umsetzung zu finden sind. Dabei können nur in drei der sieben Ansätze Metabolite gefunden werden. So werden in den FP7, 8 und 14 jeweils zwei zusätzliche Peaks geringer Intensität bei kürzerer Retentionszeit als IRI mittels GC-EI-MS/MS detektiert. Am intensivsten kann in FP8 bei einer Retentionszeit von 21,8 min die Entstehung eines Metaboliten mit einem Basispeak mit $m/z = 252$ und einem intensivem Signal mit $m/z = 429$ gezeigt werden.

Im Fullscan-Modus ist dieser Peak dennoch nur sehr klein in Relation zu dem noch unverändert vorliegenden IRI (RT: 27,4 min). Der zweite entstandene Peak (Basispeak $m/z = 516$) ist nur im XIC deutlich zu erkennen (RT: 17,5 min), zumal auch das Chromatogramm des ohne

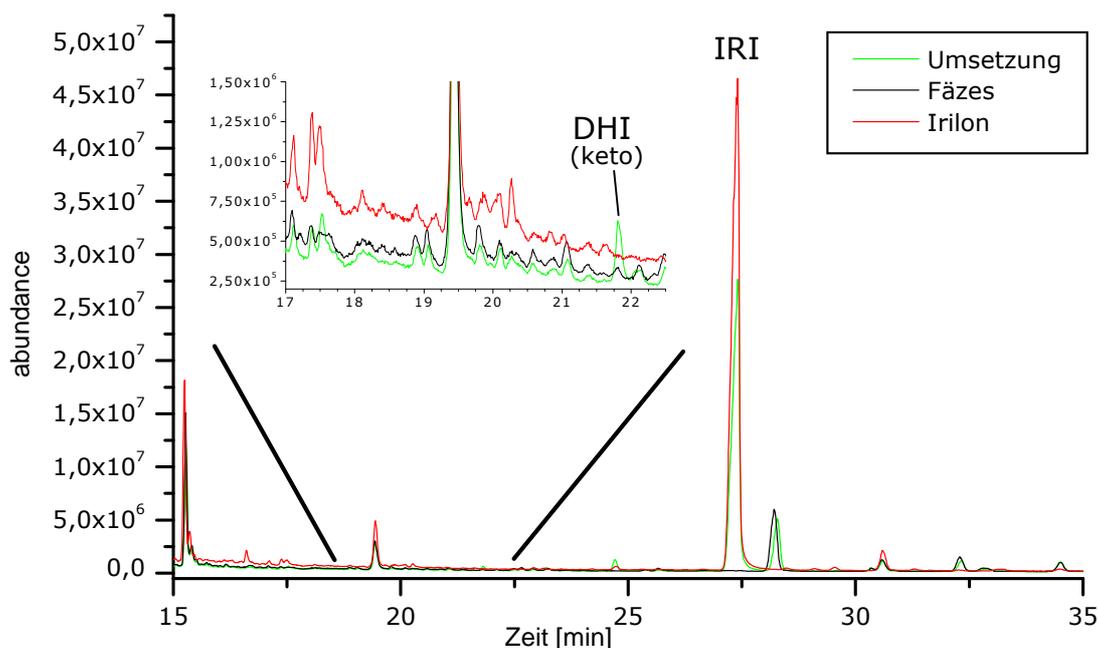


Abbildung 24: GC-EI-MS Totalionenchromatogramme der Inkubationen von Iriion (IRI) mit Fäzesprobe 8 nach 24 Stunden (grün), Referenz ohne IRI (schwarz) und IRI ohne Fäzes (rot). Einzig der Peak bei einer Retentionszeit von 21,9 min tritt ausschließlich in der Analyse der Umsetzung auf. Alle anderen Peaks stammen aus der IRI-Lösung oder der Fäzessuspension.

Mikroflora inkubierten IRI an dieser Stelle einen Peak mit gleicher Masse aufweist (Abbildung 24). Aus den Fragmenten der EI-MS-Spektren der beiden Peaks lässt sich ableiten, dass beide auf die Tautomeren der gleichen Verbindung zurückzuführen sind. Analog den Dihydro-Verbindungen der IF DAI und GEN, die im ersten Schritt der reduktiven Verstoffwechslung durch HFM entstehen, kann auch IRI an der Doppelbindung im C-Ring reduziert werden. Das in Kapitel 3.8.2 f beschriebene Fragmentierungsverhalten von Isoflavanen kann, wie in 3.8.3 c dargestellt, auf die hier gefundenen Metabolite von IRI angewendet werden. Diesen Fragmentierungsreaktionen folgend entspricht das Hauptfragmentsignal des Peaks bei einer RT von 21,8 min mit $m/z = 429$ dem Molekülion von Dihydro-IRI (DHI), und das Ion mit $m/z = 252$ entspricht dem rDA-Fragment aus Ring A. Der zweite Metabolitpeak entspricht im EI-MS-Spektrum dem Enol-Tautomer von DHI mit einem Molekülion von 516 amu als Basispeak und einem rDA-A-Ring-Fragment mit 325 amu. Anhand der charakteristischen Fragmentierung kann der entstandene Metabolit also eindeutig als DHI

identifiziert werden. In den folgenden Betrachtungen wird lediglich der größere Peak des Keto-Tautomeren stellvertretend behandelt.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, wird der Metabolitpeak über den Inkubationszeitraum von 8 h bis 48 h in konstanter Ausprägung in den FP7, 8 und 14 detektiert. Lediglich bei der Inkubation mit FP8 ist schon bei 4 h eine Metabolitenbildung zu erkennen. Da weder in den Fäzeskontrollen noch vor Inkubation (0 h) DHI gefunden wird, kann ausgeschlossen

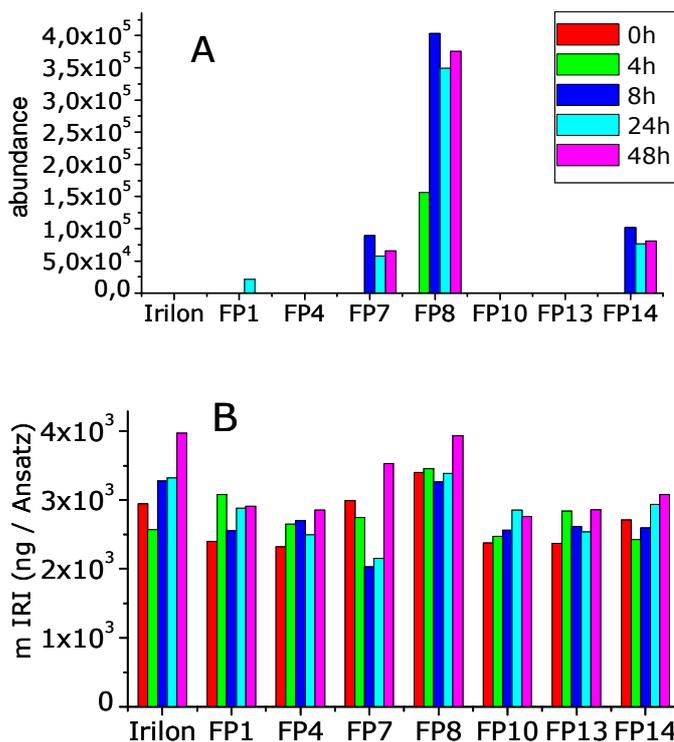


Abbildung 25: (A) Flächenintensitäten für die Keto-Form von Dihydroirilon (XIC m/z = 429); (B) Irilon-Konzentration in den Inkubationsansätzen (XIC m/z = 427).

werden, dass ein Eintrag von außen stattgefunden hat. DHI wird folglich im Verlaufe der Inkubation mit HFM gebildet. Der IRI-Gehalt bleibt während der gesamten Inkubation relativ konstant und ähnlich der Ausgangskonzentration. Diese wird in allen sieben Ansätzen gleichermaßen zu durchschnittlich $187 \mu\text{g}$ IRI im Ansatz bestimmt. Dies entspricht sehr gut der ursprünglich eingesetzten Konzentration von $190 \mu\text{M}$. Die Schwankun-

gen zwischen den unterschiedlichen Messungen sind allerdings groß, so dass IRI-Absolutmengen von etwa $2,5$ - $4,5 \mu\text{g}$ in den verschiedenen Ansätzen gefunden werden. Auch im relativen Verlauf zeigen sich bei keinem Probenansatz Änderungen des IRI-Gehaltes über die Inkubationszeit. Bei keiner Probe liegt die für den Zeitpunkt 0 h bestimmte Ausgangskonzentration erkennbar über der nach mehrstündiger Inkubation. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass

neben der geringfügigen Bildung von DHI in den Probensätzen FP 7, 8 und 14 eine weitere mengenmäßig bedeutende Verstoffwechslung stattgefunden hat. Die Ursache der Messwertschwankungen der IRI-Bestimmung wird in Kapitel 3.9 näher betrachtet.

Eine mehrfache Wiederholung der Aufarbeitungen kann aufgrund relativ geringer Menge der zur Verfügung stehenden Aliquote aus den Inkubationsansätzen nicht erfolgen. Da DHI in sehr geringen Konzentrationen gebildet wird, ist eine Aufteilung der Extrakte für Wiederholungsmessungen ebenfalls nicht möglich.

3.5 *In vivo* Untersuchung nach Aufnahme eines Rotkleepräparates

3.5.1 Pilotstudie mit Probanden

Zur Überprüfung der Bioverfügbarkeit von IRI wird sieben freiwilligen Probanden (drei weibliche und vier männliche; Alter: 24-30 Jahre) 6,5 h nach Aufnahme eines kommerziell erhältlichen, Rotklee-basierten NEM eine Blutprobe entnommen. Die Probanden verzichteten in den 48 h vor Einnahme bis zur Blutabnahme auf die Aufnahme jeglicher IF enthaltender Lebensmittel.

Das Plasma wird nach Aufarbeitung gemäß Abschnitt 2.5.2 einer gaschromatographischen Analyse auf Rotklee-IF sowie deren Metaboliten unterzogen.

Die Analyse mittels GC-EI-MS wird in zwei Schritten durchgeführt, wobei zunächst der Fullscan-Modus verwendet wird, um eine möglichst große Zahl der in Frage kommenden Substanzen erfassen zu können. Die resultierenden Chromatogramme sind sehr komplex und beinhalten viele Matrixpeaks. Die eigentlich relevanten IF-Peaks sind in vielen Fällen erst durch Darstellung als XIC erkennbar (Abbildung 26). Da der Fullscan-Messmodus relativ unempfindlich ist, wird eine Analyse im MS/MS-Modus nachgeschaltet, in der selektiv auf bereits bekannte

Rotklee-IF und deren Metabolite, sowie auf Hinweise aus den Fullscan-Daten hin untersucht wird. Dabei werden die jeweiligen erwarteten Hauptionen bzw. -fragmente im ersten Schritt in der Ionenfalle isoliert und anschließend in einem Kollisionsschritt weiter fragmentiert. Die Isolation einzelner definierter Vorläufermassen erhöht die Empfindlichkeit deutlich, und das gewonnene Töchterionenspektrum liefert zusätzliche Strukturinformationen für die weitere Auswertung.

Bereits durch die MS-Analyse in Fullscan-Modus kann gezeigt werden, dass im Plasma aller Probanden das gesamte Spektrum der zu erwartenden Substanzen, d.h. die Rotklee-IF selbst und die demethylierten sowie monohydroxylierten Produkte, zu finden ist. Als dominierende IF im Plasma liegen die drei Haupt-Rotklee-IF FORM, BioA und IRI sowie die Demethylierungsprodukte DAI und GEN vor. Wie auch in Tabelle 31 detailliert dargestellt, überwiegen DAI, IRI und GEN bezüglich ihrer Peakintensitäten deutlich. Über diese IF hinaus sind mit PRUN, 3',4',7-Trihydroxy-IF, 4',6,7-Trihydroxy-IF, 4',7,8-Trihydroxy-IF und 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF noch weitere Verbindungen qualitativ nachweisbar, die zur Quantifizierung nicht miteinbezogen werden können, da die isolierten Verbindungen kommerziell nicht in ausreichender Reinheit bzw. Menge verfügbar sind. PRUN zeigt im XIC einen geringfügig größeren Peak als das Stellungsisomer BioA. 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF ist von den weiteren IF in den Plasmaproben am stärksten vertreten und liegt mit etwa der gleichen Peakintensität des Basispeaks wie BioA und PRUN vor.

Im Anhang (Abbildung A3) sind die XIC der in der Tabelle aufgelisteten IF zusammengestellt. Weiterhin sind geringe Mengen von fünf weiteren IF-Derivate im Fullscan-Modus detektierbar, die über den Vergleich mit Literaturdaten und -MS-spektren 4',5,7,8-Tetrahydroxy-IF, 3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF (Orbol), PBAP und Calycosin (CALY) sowie einem weiteren Dihydroxy-methoxy-IF zugeordnet werden können (Tabelle 31). Weitere in Frage kommende monohydroxylierte FORM- sowie BioA-Metabolite sind im Fullscan-Modus nicht erkennbar.

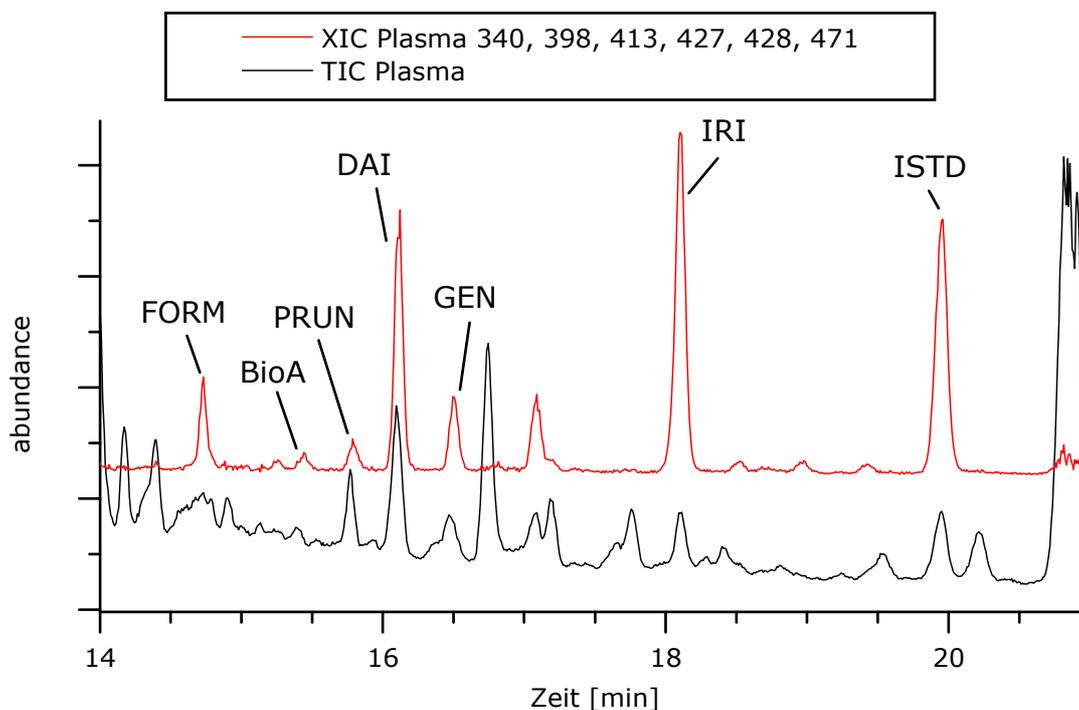


Abbildung 26: Gegenüberstellung des MS-Fullscan-Chromatogramms einer Plasmaprobe mit den Extracted-Ion-Chromatogrammen auf den Massenspuren der Hauptisoflavone.

Tabelle 31: Intensitäten der Isoflavone in der GC-EI-MS-Fullscan Analyse in Präparat und im Probandenplasma. „-“ nicht detektierbar; „o/-“ an der Nachweisgrenze; „o“ an der Bestimmungsgrenze; „+“ deutlich; „++“ stark; „+++“ sehr stark ausgeprägtes Signal.

Verbindung	m/z	RT	Intensität im Präparat	Intensität im Plasma
FORM	340	14.74	+++	+
DAI	398	16.12	++	+++
BioA	413	15.45	+++	o
PRUN	413	15.80	++	o
GEN	471	16.51	+	++
Methoxy-trihydroxy-IF	501	17.77	o	o
IRI	427	18.11	++	+++
Methoxy-trihydroxy-IF	501	18.65	o/-	o/-
Hydroxy-FORM	428	18.98	o	o/-
CALY	428	18.53	+	o/-
4',5,6,7-tetrahydroxy-IF	559	18.74	o/-	o
Methoxy-trihydroxy-IF	501	19.04	+	o
Methoxy-trihydroxy-IF	501	17.33	o	-
Methoxy-trihydroxy-IF	501	19.49	o	-
3',4',7-Trihydroxy-IF	486	19.41	o	o
4',5,7,8-Tetrahydroxy-IF	559	19.20	o	o/-
4',7,8-Trihydroxy-IF	486	19.98	o/-	o
3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF	559	19.85	o/-	-
4',6,7-Trihydroxy-IF	486	21.10	o/-	o/-
3'-Hydroxy-IRI	515	22.30	o	o
8-Hydroxy-IRI	515	23.17	-	o/-
PBAP	354	16.89	+	o/-

Im Anschluss durchgeführte MS/MS-Untersuchungen derselben Proben, in denen verschiedene Mutterionen der aus der Literatur über *in vitro* Umsetzungen bekannten Massen vorgegeben werden, geben deutliche Hinweise auf weitere vor allem monohydroxylierte Produkte. Zudem wird der MS/MS-Modus zur empfindlicheren Quantifizierung der fünf Haupt-IF genutzt. Im Plasma von zwei der weiblichen und einem männlichen Probanden ist DAI das IF mit der höchsten Konzentration von 0,35-0,59 μM . Bei den vier weiteren untersuchten Plasmaproben liegt die Konzentration von IRI mit einem Gehalt von 0,18-0,59 μM noch über DAI. Die unveränderten Rotkleehaupt-IF FORM und BioA können ebenfalls in allen Proben nachgewiesen werden. Der Konzentrationsbereich für FORM liegt zwischen 0,03-0,19 μM und somit ähnlich wie der für GEN, das vor allem durch die Demethylierung von BioA gebildet wird, bestimmte Gehalt (0,04-0,09 μM). BioA selbst ist nur in einem Bereich von 7-14 nM in den

	\bar{c} gesamt (IF) μM	\pm μM
FORM	0,111	0,052
BioA	0,014	0,007
DAI	0,385	0,144
GEN	0,063	0,021
IRI	0,351	0,156

Tabelle 32:

Durchschnittliche Plasmaisoflavonkonzentrationen bei den sieben Probanden nach Aufnahme von zwei Rotklee-NEM-Kapseln.

Plasmaproben enthalten und somit um mehr als eine Zehnerpotenz unter DAI und IRI (Tabelle 32). Die genauen IF-Gehalte der untersuchten Proben befinden sich im Anhang (Tabelle A6).

Weiterhin werden die in der Folge aufgeführten Metabolite über den Vergleich ihrer Retentionszeiten mit sicher identifizierten Verbindungen sowie über ihre Masse-Ladungszahlen qualitativ identifiziert. MS/MS-Daten können in der Literatur nicht gefunden werden, so dass ein Vergleich des Tochterionenspektrums nicht durchführbar ist. Aufgrund deutlich erhöhter Selektivität kann für einige Peaks ein Signal-Rauschverhältnis von mehr als 20 erreicht werden, wo im Fullscan-Modus kein eindeutiges Signal zu erkennen ist. Bei den Peaks der drei monohydroxylierten DAI-Derivate ist bei fast allen Probanden zu erkennen, dass für den ersten Peak (3',4',7-Trihydroxy-IF) eine um den Faktor zwei bis drei größere Fläche

als für die beiden anderen, in etwa gleich intensiven Substanzen gemessen wird.

Im MS/MS-Modus können weiterhin noch zwei Peaks bei Retentionszeiten von 22,3 min und 23,2 min detektiert werden, die mit einer m/z von 515 amu die theoretische Hauptmasse von trimethylsilyliertem monohydroxylierten IRI aufweisen. Gemäß den in Kapitel 3.8.3 a) angestellten Überlegungen zum Fragmentierungsverhalten trimethylsilylierter, catecholischer IF in der GC-EI-MS-Analyse ist davon auszugehen, dass der Peak bei einer RT von 22,3 min der 3'-hydroxylierte IRI-Metabolit ist. Der Peak bei 23,2 min zeigt ein anderes Fragmentierungsmuster und ist dem 8-Hydroxy-IRI zuzuordnen. Die Identität der beiden kommerziell nicht erhältlichen Verbindungen wird zusätzlich über den Vergleich ihrer Retentionszeiten mit den Umsetzungsprodukten aus den *in vitro* Inkubationen von IRI mit HLM und RLM abgesichert.

3.5.2 Analyse des Nahrungsergänzungsmittels

Zur vergleichenden Analyse des im Plasma detektierbaren IF-Musters mit dem tatsächlich aufgenommenen IF-Spektrum wird aus der gleichen Charge des zur *in vivo* Studie verwendeten Präparates eine GC-Trennung nach vorheriger saurer Hydrolyse vorgenommen. Es kann gezeigt werden, dass FORM das dominierende IF im aufgenommenen Rotklee-NEM ist. Die zweitintensivsten Signale sind BioA und IRI zuzuordnen. DAI, PRUN, PBAP und GEN sind ebenfalls nachweisbar. Zusätzlich wird deutlich, dass eine Vielzahl von weiteren IF in geringen Mengen in dem Präparat enthalten ist. In Tabelle 31 sind alle im Extracted-Ion-Modus aus dem Fullscan detektierbaren und zuzuordnenden IF mit einem Symbol, welches die relative Menge in dem Präparat angibt, aufgelistet. Neben den für Rotklee bekannten IF können mehrere Substanzen mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 501 amu in dem MS²-Experiment identifiziert werden.

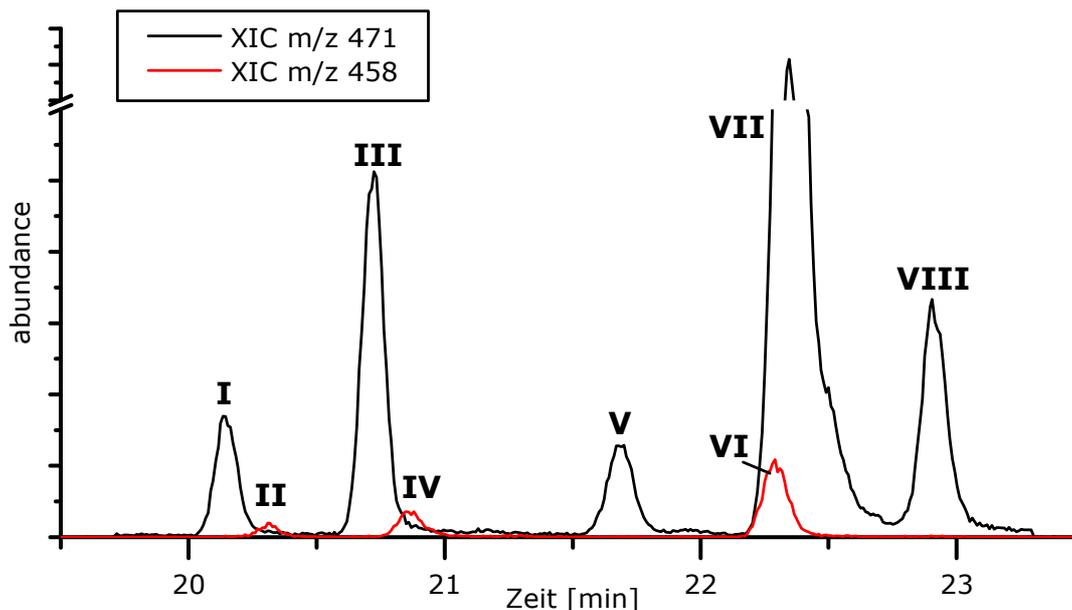


Abbildung 27: „Extracted-Ion-Chromatogramm“ (XIC) der Massenspuren für $m/z = 471$ und 458 aus dem MS/MS-Chromatogramm des rotkleebasierten NEM (Mutterion $m/z 501$).

Erst die Aufgliederung des Chromatogramms in die Massenspuren mit m/z 471 und 458 zeigt deutlich, dass es sich um acht einzelne Stoffe handelt, die sich in ihrem Fragmentierungsverhalten unterscheiden (Abbildung 27). Ein Vergleich mit der Literatur (Kulling, 2001) lässt aufgrund der Retentionszeiten relativ zu den anderen IF sowie aufgrund der ähnlichen Massenspektren die Annahme zu, dass es sich um Trihydroxy-methoxy-IF, also Stellungsisomere von BioA und PRUN mit einer zusätzlichen Hydroxyfunktion handelt. Die theoretisch möglichen Verbindungen sind in Abbildung 28 dargestellt. Es wird deutlich, dass genau acht unterschiedliche Derivate denkbar sind, von denen drei eine isolierte Methoxygruppe tragen und bei den restlichen fünf diese Gruppe β -ständig zu einer silylierten Hydroxyfunktion positioniert ist. Dies stellt auch die Begründung für das unterschiedliche Fragmentierungsverhalten dar, denn wie in Kapitel 3.8.3 gezeigt wird, ist für Dihydroxy-methoxy-IF, die in Position C-5 hydroxyliert sind (BioA, PRUN), ein signifikant anderes Muster nachweisbar, als es für in dieser Position unsubstituierte IF (GLYC, CALY) der Fall ist. Diese Erkenntnis ist auf die Trihydroxy-methoxy-IF übertragbar. Da die betrachteten IF alle das $[M-15]^+$ -Fragment als

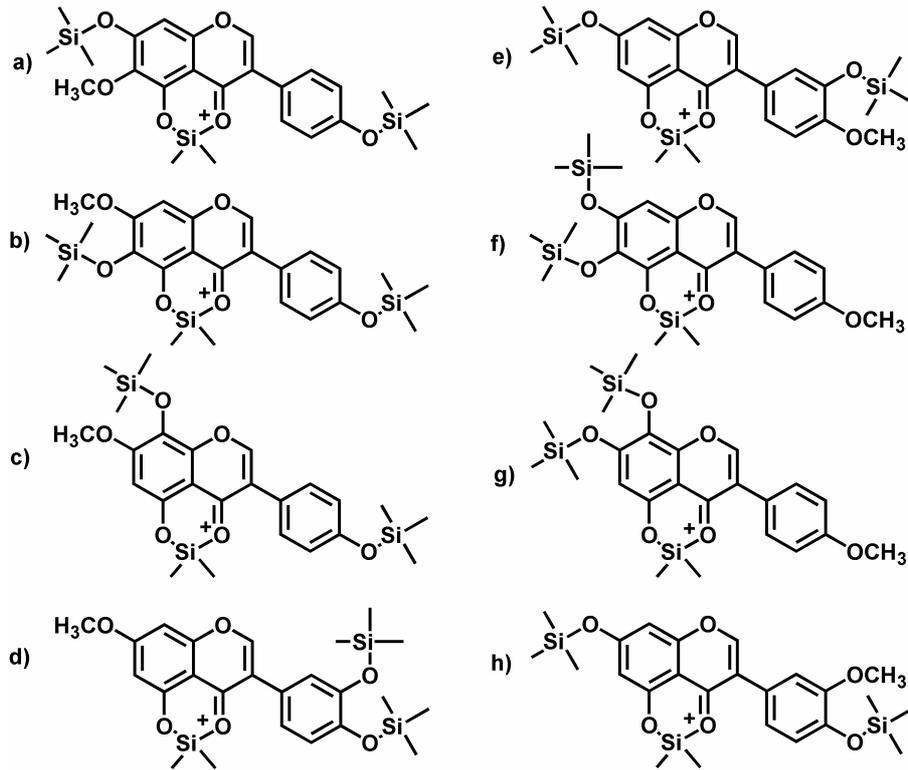


Abbildung 28: Stellungsisomere für Trihydroxy-methoxy-IF mit einer Hydroxyfunktion in Position C-5.

Basispeak zeigen und nicht das vollständige Molekülion, ist gemäß Kapitel 3.8.3 von einer Hydroxylierung der Position C-5 auszugehen. Folglich ist für jene Substanzen, die eine isolierte Methoxygruppe besitzen, mit dem charakteristischen Verlust von 43 amu zu rechnen. Für den Fall einer β -Ständigkeit der Methoxyfunktion zu einer Hydroxygruppe wird die Ringbildung unter Verlust von 30 amu erwartet. Dies deckt sich mit den massenspektrometrischen Daten. Drei der detektierten Peaks zeigen eine intensive Abspaltung von 43 amu und repräsentieren die Substanzen d, f und g aus Abbildung 28. Die Peaks I, III, V, VII und VIII hingegen sind den Substanzen a, b, c, e und h zuzuordnen. Zusätzlich ist nach der Abspaltung der 43 amu noch ein Verlust von 88 amu in den Spektren der Peaks II, IV und VI klar detektierbar, der charakteristisch für die vicinalen silylierten Hydroxygruppen ist (siehe Kapitel 3.8.2).

Für die FORM-Derivate mit einer zusätzlichen Hydroxyfunktion, außer dem bereits betrachteten BioA, errechnet sich eine theoretische m/z von 428 amu. Bereits für Rotklee beschrieben ist das CALY (4'-Hydroxy-FORM), welches in dem Präparat bei einer RT von 27,9 min als intensivster Peak mit m/z 428 detektiert werden kann. Der obligate

Verlust von zweimal 15 amu aus einer Methoxygruppe benachbart zu einer silylierten Hydroxygruppe ist stark ausgeprägt, ein Fragment mit 413 amu aus dem Verlust von nur einer Methyleinheit ist nur schwach detektierbar. Zusätzlich ist im MS²-Experiment ein weiterer Peak gleicher Masse bei 28,8 min erkennbar, der aber nicht eindeutig einer Verbindung zuzuordnen ist. Die in Frage kommenden Moleküle sind 6- oder 8-Hydroxy-FORM, aber auch beispielsweise das 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-IF und weitere Stellungsisomere.

Anhand von authentischen Referenzsubstanzen und den Massenspektren lassen sich schließlich auch im NEM drei Trihydroxy-IF identifizieren, wobei das 4',6,7-Trihydroxy-IF nur eine sehr geringe Peakintensität zeigt.

Ähnlich ausgeprägte Peaks sind auch im MS²-Experiment mit dem Mutterion mit $m/z = 559$ zu finden, die anhand ihrer Massenspektren und im Fall des 6-Hydroxy-GEN auch mit Hilfe der Referenzsubstanz auf die Tetrahydroxy-IF zurückzuführen sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits im Rotklee Derivate der IF vorhanden sind, die auch im *in vitro* Metabolismus entstehen. Als Konsequenz ist es nicht möglich, bei diesen ebenfalls in Plasma detektierten Peaks mit Sicherheit von endogenen Metaboliten von BioA, PRUN oder FORM zu sprechen, da sie ebenso gut durch eine direkte Aufnahme aus dem Präparat in das Plasma gelangt sein könnten.

Da hier ohne GLYC als internem Standard gearbeitet werden musste, erfolgt keine weitere Quantifizierung zumal viele der detektierten IF nicht als Referenzsubstanz zur Kalibrierung erhältlich sind. Die mengenmäßigen Verhältnisse werden anhand der erhaltenen Peakflächen im Chromatogramm bestimmt.

3.5.3 Isoflavonverteilungsmusters nach Resorption

Um einen ersten Eindruck von den Metabolismwegen der IF aus Rotklee *in vivo* zu bekommen, werden die in erster Linie qualitativen Resultate aus den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 gegenübergestellt. Dazu wird mit relativen IF-Gehalten sowohl im Präparat wie auch in den Plasmaproben gearbeitet.

In mehreren GC-Trennungen wird mittels deutlich empfindlicher Tandemmassenspektrometrie auf die im Fullscan-Modus identifizierten Verbindungen hin untersucht und für die einzelnen IF ein relativer Flächenanteil bezogen auf die gesamte Flächensumme der IF berechnet. Aufgrund der Vielzahl der identifizierten Komponenten ist eine ausreichende Auftrennung in einem GC-Lauf nicht durchführbar.

Für eine Analyse in MS²-Modus ist Voraussetzung, dass das Zeitfenster für die jeweilige Masse ausreichend groß ist, um vor und nach dem Peak noch eine Grundlinie vorzufinden, die eine Integration ermöglicht. Die in der Folge präsentierten Ergebnisse geben somit Tendenzen für einzelne IF-Gruppen an. Dabei wird die anteilige Veränderung einzelner Komponenten innerhalb dieser Gruppe von vor Verabreichung im Präparat gegenüber 6,5 h nach Aufnahme im Plasma abgebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 dargestellt, dort repräsentiert das Symbol „+“, dass das betreffende IF nach Resorption im Plasma relativ stärker detektiert wird als in dem Präparat selbst. „0“ symbolisiert, dass dieses IF in etwas gleichem relativen Anteil im Plasma vorliegt, und „-“ kennzeichnet die IF, die in ihrem relativen Gehalt im Blut weniger gefunden werden.

Generell ist deutlich erkennbar, dass die methylierten IF FORM und BioA

Tabelle 33: Relative Entwicklung des Gehaltes einzelner Isoflavone nach Resorption im Vergleich zu der Zusammensetzung des Präparates. Ergebnisse der MS/MS-Analysen mit den jeweiligen Basispeaks aus dem Fullscan als Vorläuferionen.

Komponente	rel. Gehalt im Plasma im Vergleich zum NEM	Komponente	rel. Gehalt im Plasma im Vergleich zum NEM
FORM	-	I	-
BioA	-	II	+
PRUN	o	III	o
DAI	+	IV	+
GEN	+	V	o
PBAP	-	VI	o
IRI	+	VII	-
3',4',7-Trihydroxy-IF	+	VIII	-
4',7,8-Trihydroxy-IF	+	CALY	-
4',6,7-Trihydroxy-IF	+	Dihydroxy-methoxy-IF	+
6-Hydroxy-GEN	+	3'-Hydroxy-IRI	+
4',5,7,8-Tetrahydroxy-IF	+	8-Hydroxy-IRI	+
3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF	+		

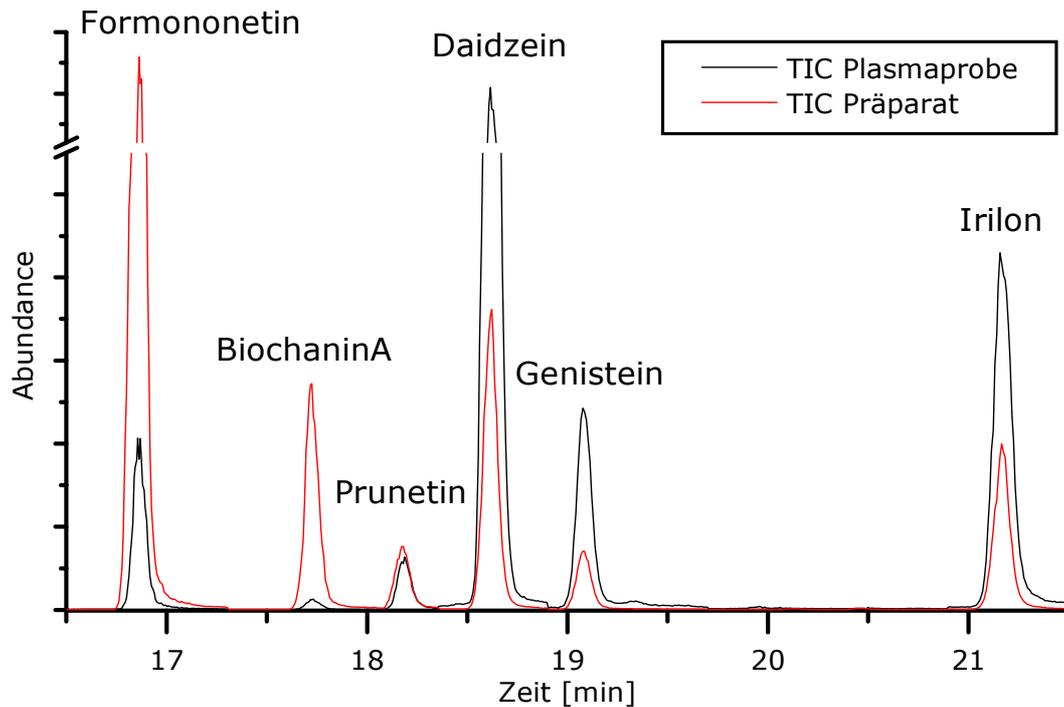


Abbildung 29: Vergleich der GC-MS/MS-Chromatogramme aus Probandenplasma (schwarz) und Präparat (rot) im Total-Ionen-Chromatogramm (TIC).

stark abnehmen und im Gegenzug die so entstehenden IF DAI und GEN ebenso deutlich zunehmen. Eine graphische Gegenüberstellung der Haupt-IF vor und nach Resorption ist in Abbildung 29 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen IF ein stark unterschiedliches Ansprechverhalten in der Ionenfalle zeigen und daher der Peak für IRI hier im Vergleich zu DAI und GEN deutlich kleiner erscheint, als der tatsächliche IRI-Gehalt es ist. Weiterhin nehmen IRI, die Trihydroxy-IF sowie die Tetrahydroxy-IF in ihren relativen Gehalten nach Aufnahme zu. Dabei erreichen 3',4',7-Trihydroxy-IF und 4',7,8-Trihydroxy-IF eine Peakfläche, die in der gleichen Größenordnung wie für BioA und PRUN liegt. Für die Tetrahydroxy-IF werden nur geringe Signalintensitäten detektiert, lediglich das 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF ergibt einen ähnlich intensiven Peak. PBAP und CALY sind im Plasma fast nicht mehr nachweisbar, während PRUN, das Stellungsisomer von CALY, deutlich weniger abnimmt. Uneinheitlich ist auch das Verhalten der BioA- und PRUN-Derivate. Für die Substanzen mit isolierter Methoxygruppe wird ein gleich bleibender bis leicht steigender Gehalt festgestellt, wohingegen bei den weiteren Verbindungen ein sinkender Gehalt detektiert wird. Schließlich ist für beide monohydroxylierte IRI-Derivate ein steigender

relativer Anteil zu verzeichnen, wobei 8-Hydroxy-IRI im Präparat gar nicht nachweisbar ist, im Plasma aber ebenso das weniger intensive Derivat darstellt.

3.6 Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone

Um eine erste Einschätzung vornehmen zu können, ob und in welchem Maße IRI ein estrogenes Potenzial besitzt, wird eine Untersuchung in einem ER α -Bindungsassay durchgeführt. Dabei wird die Fähigkeit einer Substanz ermittelt, Coumestrol aus der Rezeptorbindung verdrängen zu können. Diese Untersuchungen der Haupt-Rotklee-IF im Rezeptorassay zeigen für die untersuchten IF bei einer Konzentration von 0,1 μ M keine messbare Fluoreszenzminderung in der Mikrotiterplattenreader-Analyse (Abbildung 30). Für GEN ist bei dieser Konzentration eine Fluoreszenzintensität von nur noch 90% verglichen mit dem Kontrollwert vorhanden, folglich hat eine Verdrängung von etwa 10% des fluoreszierenden Coumestrols stattgefunden. Die Fluoreszenz bei Zugabe

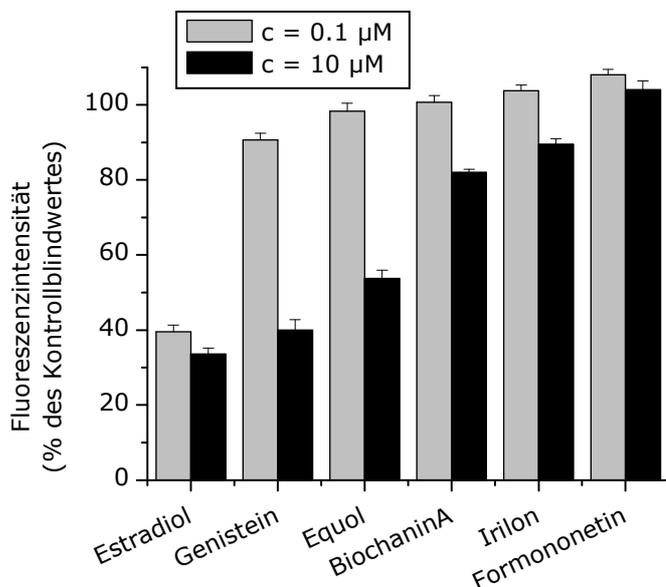


Abbildung 30:

Verdrängungsintensität von Coumestrol aus ER α durch verschiedene Isoflavone sowie von Equol und Estradiol bei Konzentrationen von 0,1 bzw. 10 μ M.

von Estradiol sinkt bei einer 0,1 μ M Lösung bereits auf 40%. Eine Erhöhung der Konzentration der Testsubstanzen auf 10 μ M führt in allen Fällen zu einer stärkeren Verdrängung von Coumestrol aus der Rezeptorbindung. Im Falle von FORM ist diese so gering, dass praktisch kein estrogenes Potenzial bezogen auf den ER α besteht. Für IRI und

BioA ist eine schwache Verdrängung von etwa 10% bzw. 20% festzustellen. Equol zeigt bei einer Konzentration von 10 µM eine sehr deutlich gesteigerte Verdrängung von etwa 50%, und GEN erreicht mit einem Wert von 60% die gleiche Wirkung, wie sie für Estradiol in der niedrigeren Konzentration gefunden wird. Für Estradiol ist auch die Erhöhung der Konzentration auf 10 µM nur noch mit einer geringfügig gesteigerten Verdrängung verbunden. In Abbildung 30 sind die beschriebenen Daten graphisch dargestellt.

3.7 Isolierung von Isoflavonen aus *Iris germanica*

Für eine Vielzahl von vor allem qualitativen Untersuchungen ist es sinnvoll, IF in guter Reinheit und zu günstigen Konditionen zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck wird in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie an der TU Braunschweig eine Isolierung von IRI und 5-methyl-IRI (Nigricin) durchgeführt. Basierend auf Literaturdaten ist davon auszugehen, dass die IF-Zusammensetzung in Extrakten aus Pflanzen der Gattung *Iridaceae* – insbesondere *Iris germanica* (L.) – deutlich weniger komplex als die von Rotklee sein sollte. Ein in Apotheken frei verkäuflicher Extrakt wird daher auf seine Zusammensetzung und Eignung zur IRI-Gewinnung hin untersucht. Anschließend wird eine semipräparative wie auch präparative Auftrennung durchgeführt.

3.7.1. Analyse der Isoflavonkomposition des *Iris germanica*-Extraktes

Mittels HPLC-DAD/ESI(+)-MS lässt sich für den untersuchten Extrakt ein IF-Spektrum bestehend aus sieben Hauptpeaks erhalten. Die Identifizierung erfolgt anhand der ermittelten protonierten Molekülmassen und UV-Spektren sowie über einen Abgleich mit Literaturdaten. Der ganz überwiegende Anteil der IF liegt demnach in dem unbehandelten Extrakt glucosidisch gebunden vor und eluiert unter Verwendung der in Kapitel 2.3 beschriebenen chromatographischen Bedingungen bei Retentionszeiten

von etwa 12-25 min. In Tabelle 34 sind die bestimmten massenspektrometrischen Daten aufgelistet. Das zugehörige Chromatogramm befindet sich im Anhang (Abbildung A4). Es wird deutlich, dass Irogenin mengenmäßig dominierend ist, und IRI, Irisolidon sowie ein methyliertes Derivat von IRI gleichermaßen enthalten sind. Für alle Peaks ist die Zuordnung über Molmasse und UV-Spektrum in Verbindung mit Literaturdaten eindeutig mit Ausnahme des methylierten

Tabelle 34: Chromatographische und spektrometrische Daten zu den Isoflavonen aus *Iris germanica*. Die Peak-Nummerierung bezieht sich auf die Abbildung im Anhang (Abbildung A4). „Me“: Methyl; „Glc“: Glucosid.

Peak Nr.	Retentionszeit [min]	[M+H] ⁺	UV _{max} [nm]	Name
1	13,5	493	268	Iristectorigenin-glc
2	15,5	475	262	Me-Irilon-glc
3	18,6	523	266	Irogenin-glc
4	19,0	493	266	Iristectorigenin-glc
5	20,9	475	263	Me-Irilon-glc
6	21,9	461	270	Irilon-glc
7	24,1	477	266	Irisolidon-glc
8	43,3	313	265	Me-Irilon
9	47,9	361	266	Irogenin
10	49,9	331	267	Iristectorigenin A/B
11	60,1	299	273	Irilon
12	65,6	315	267	Irisolidon

IRI, für welches die Position der Methylierung in der Literatur strittig ist. Die eindeutige Zuordnung der Substanz 5 zu einer exakten Methylierungsposition im Molekül erfolgt zusätzlich zu der Analyse mittels HPLC-ESI(+)-MS mittels GC-EI-MS nach Trimethylsilylierung. Durch charakteristische Fragmentierungsreaktionen, wie sie in den Kapiteln 3.8.1 und 3.8.2 im Detail beschrieben werden, lässt sich feststellen, dass die betreffende Substanz in Position C-5 und nicht in Position C-4' methyliert ist. Aus dem Chromatogramm wird auch deutlich, dass eine präparative Aufreinigung einzelner Glucoside unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist. Auch eine Modifizierung des Trennprogramms erbringt keine hinreichende Trennung. Ebenso wird deutlich, dass die im ursprünglichen Extrakt in Spuren vorkommenden freien IF besser aufgetrennt werden

können, so dass eine vorgelagerte Hydrolyse der Zuckerkonjugate durchgeführt werden muss.

3.7.2 Säurehydrolytische Spaltung der Glucoside

Zur schnellen und kostengünstigen Deglucosilierung wird dieser Schritt im Gegensatz zum Vorgehen bei der Analyse der IF aus NEM in Kapitel 3.1 mittels Säurehydrolyse durchgeführt. Zur Gewährleistung einer möglichst schonenden, aber trotzdem vollständigen Spaltung werden die Reaktionsbedingungen optimiert und sind im Einzelnen in Kapitel 2.7 angegeben. Wie in Tabelle 34 und im Chromatogramm im Anhang (Abbildung A4) abzulesen, sind die freien IF und insbesondere IRI selbst gut voneinander abgetrennt, so dass auch in größerem Maßstab mit semipräparativer Säule und in einem isokratischen HPLC-Lauf sowohl IRI als auch 5-methyl-IRI in guter Reinheit fraktioniert werden können.

3.8 Strukturuntersuchungen mittels gekoppelter Massenspektrometrie

Die gekoppelte Massenspektrometrie bietet vielfältige Möglichkeiten über spezifische Fragmentierungsreaktionen Hinweise auf die Struktur von unbekanntem Verbindungen zu bekommen. Sowohl die Fragmentierungen in HPLC-ESI(+)-MS wie auch GC-EI-MS liefern Informationen über Substitutionsmuster und metabolismusbedingte chemische Veränderungen von IF. In diesem Abschnitt der Arbeit werden zunächst die bekannten Fragmentierungspfade von IF präsentiert und durch neu gefundene ergänzt. Wie hieraus Strukturinformationen von unbekanntem Verbindungen gewonnen werden können, wird im Folgenden gezeigt. Im Anschluss (siehe Kapitel 3.8.3) wird die Anwendung der entwickelten „Werkzeuge“ anhand der Substanzen, welche in den eigenen Metabolismusstudien (siehe Kapitel zum oxidativen Phase-I-Metabolismus 3.2; zur Glucuronidierung 3.3.4; zum Metabolismus durch HFM 3.4 und

zur Charakterisierung von Rotklee-IF 3.5.2) gebildet werden, demonstriert.

3.8.1 HPLC-ESI(+)-MS

Die Elektronensprayionisierung (ESI) ist die Methode der Wahl sowohl für die qualitative wie auch quantitative Analyse polarer Substanzen wie IF und andere Polyphenole. Aufgrund ihres zumeist leicht sauren Charakters ist die Ionisierung im negativen Modus das etwas sensitivere Verfahren, allerdings zeigen sich einige für die Strukturanalyse notwendige Fragmente nur im positiven Modus (Fabre et al., 2001). Daher wird im Folgenden der Fokus auf den Fragmentierungen im ESI(+)-Modus liegen.

3.8.1.1 Retro-Diels-Alder-Fragmentierungen

a) Klassische retro-Diels-Alder-Fragmentierung

Strukturinformationen über Isoflavonoide mittels ESI(+)-MS zu gewinnen, ist in erster Linie über die retro-Diels-Alder (rDA)-Fragmentierung möglich. Diese basiert auf der Spaltung des IF-Grundgerüsts im C-Ring in zwei charakteristische Fragmente, welche den noch intakten aromatischen A- bzw. B-Ring beinhalten. Das A-Ring-Fragment stellt dabei das „Dien“ und das B-Ring-Fragment die „dienophile“-Komponente im Sinne der rDA-Reaktion dar (Abbildung 31 (A)). Aus den rDA-Fragmenten lässt sich in Verbindung mit der Masse des ehemaligen Moleküls feststellen, wie die Substituenten auf den A- und B-Ring verteilt sind. Eine weitere Differenzierung der genauen Position am jeweiligen Ring ist nicht möglich. Bei der einfachen MS-Analyse ist für die meisten Substanzen eine schwache Bildung des rDA-Fragments aus dem A-Ring zu beobachten, das B-Ring-Fragment bleibt zumeist ungeladen und wird nicht detektiert. Nur durch eine deutliche Erhöhung der Fragmentorspannung werden diese Fragmente verstärkt gebildet. Noch deutlicher lassen sich die rDA-Fragmente durch den Einsatz von Tandem-MS (MS/MS) detektieren. Im MS/MS mit dem Molekülion als Mutterion werden für IF die A-Ring-Fragmente mit 10% relativer Intensität für GLYC bis hin zu 100% bei

GEN, DAI und 3',4',7-Trihydroxy-IF detektiert (Tabelle 35). Für die entsprechenden B-Ring-Fragmente reicht die Spanne der Intensitäten von 4-7% bei den untersuchten Trihydroxy-IF bis zu 40% bei IRI. Der Beitrag dieser Reaktion zur Strukturaufklärung lässt sich gut am Beispiel in den Positionen C-6, C-8 und C-3' monohydroxylierter DAI-Metabolite erklären. Alle Substanzen zeigen das Quasimolekülion $[M+H]^+$ mit $m/z = 271$ amu.

Tabelle 35: Masse/Ladungs-Zahlen der Fragmente aus den HPLC-ESI(+)-MS/MS-Experimenten der untersuchten IF. Die eingeklammerten Zahlen geben die jeweiligen relativen Intensitäten an.): MS/MS-Experiment nicht durchgeführt – angegeben sind die Daten der Untersuchungen im single-MS-Experiment.

Verbindung	$[M+H]^+$	rDA (siehe Abbildung 31)	"nicht-rDA" (siehe Abbildung 31)
GEN	271 (46)	153 (100); 119 (21)	107 (7)
DAI	255 (54)	137 (100); 119 (21)	107 (2)
BioA	285 (77)	153 (38); 152 (100); 133 (17); 118 (32)	107 (5)
FORM	269 (63)	137 (26); 136 (27); 133 (18); 118 (61)	121 (n.d.)
GLYC	285 (52)	167 (10); 119 (5); 118 (20)	121 (11)
IRI	299 (86)	181 (16); 119 (44)	107 (9)
PRUN	285 (100)	167 (96); 119 (13)	107 (6)
6-Hydroxy-GEN	287 (100)	169 (78); 119 (24)	107 (3)
3'-Hydroxy-DAI	271 (40)	137 (100); 135 (7)	123 (1)
6-Hydroxy-DAI	271 (44)	153 (34); 119 (7)	107 (15)
8-Hydroxy-DAI	271 (28)	153 (22); 119 (4)	107 (9)
DHD	257 (n.d.)	137 (42); 121 (40)	107 (100)
DHG	271 (n.d.)	153 (23); 121 (15)	107 (62)
red. IRI-Metabolit	301 (36)	181 (14); 121 (20)	107 (89)
ox. IRI-Metabolit	315 (100)*	181 (19)*)*

Im MS/MS-Experiment mit diesem Mutterion zeigen die Ionen des C-6- sowie des C-8-Metaboliten ein intensives rDA-Signal des A-Ring-Fragments mit $m/z = 153$. Der an Position C-3' hydroxylierte Metabolit weist das Fragment mit $m/z = 137$ auf (Tabelle 35). Eine Unterscheidung der Anzahl an Substituierungen an den Ringen A und B ist somit leicht möglich, eine genaue Lokalisierung kann indes nicht erfolgen.

b) Retro-Diels-Alder-Fragmentierung bei methoxylierten Isoflavonen

Für die in Position C-4' methoxylierten IF BioA und FORM zeigt sich ein Verhalten in der rDA-Fragmentierung, das von dem unter a) beschriebenen Muster abweicht. Es ist für diese IF ein stark ausgeprägtes zusätzliches Signal mit einer um 1 amu reduzierten rDA-Masse des A-Ring-Fragments zu erkennen (Tabelle 35 und Abbildung 31 (B)). Im Falle von BioA stellt dieses Fragment den Basispeak dar, und bei FORM ist es ebenfalls stärker ausgeprägt als das klassische rDA-Fragment. Dieses Doppelsignal tritt im Rahmen der untersuchten IF ausschließlich bei den in C-4'-Position methoxylierten Substanzen auf. Die plausibelste Begründung für diese ungewöhnliche Fragmentierungsreaktion ist die Bildung eines radikalischen Fragments. Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten wurde für die kollisionsinduzierte Spaltung von Flavonoid-Glucosiden von Hvattum und Ekeberg beschrieben (Hvattum and Ekeberg, 2003).

IF wie GLYC oder PRUN, die eine Methoxygruppe in Position C-6 bzw. C-7 aufweisen, zeigen dagegen kein zweites Signal. Ähnliche Unterschiede fanden auch Hvattum und Ekeberg bei ihren Untersuchungen an Glucosiden. Sie erklärten dies mit der unterschiedlichen (Mesomerie-) Stabilisierung der gebildeten Radikale in den verschiedenen Positionen, aus denen der Zucker abgespalten wird. Da ausschließlich in Position C-4' methoxylierte IF diese radikalischen Fragmente bilden, kann diese Fragmentierung neben der Bildung des rDA-Fragments als Indikator für das Vorhandensein einer Methoxygruppe in dieser definierten Position in unbekanntem IF dienen.

Zusätzlich werden für die beiden in Position C-4' methoxylierten IF zwei charakteristische Fragmente mit hoher Intensität ($m/z = 133$ und $m/z = 118$ in Abbildung 31 (B)) detektiert. Bei dem Fragment mit $m/z = 133$ handelt es sich um das klassische rDA-Fragment des B-Rings, während das noch intensiver gebildete leichtere Fragment dem B-Ring-Fragment nach Eliminierung eines Methylradikals aus der Methoxygruppe entspricht.

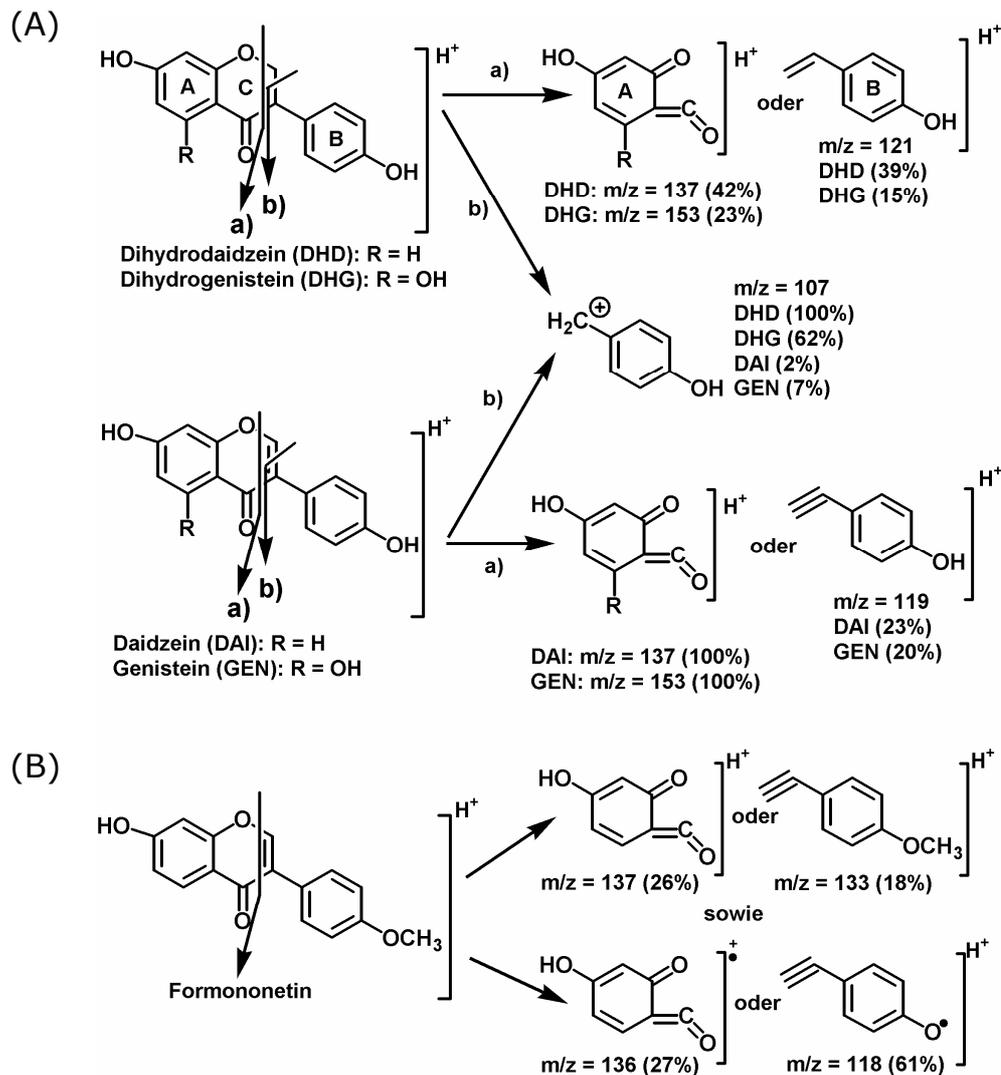


Abbildung 31: rDA- und „nicht-rDA“-Fragmentierungsmuster nicht methylierter IF und Isoflavanone (A), sowie O-methylierter IF (B) in der HPLC-ESI(+)-MS/MS.

c) Retro-Diels-Alder-Fragmentierung bei Isoflavanen und Isoflavanonen

Sowohl Isoflavane wie auch Isoflavanone unterliegen wie die IF der rDA-Fragmentierung. Die untersuchten Isoflavanone DHG und DHD zeigen deutliche Fragmente einer rDA-Spaltung des C-Rings. Durch die hydrierte Bindung zwischen C-2 und C-3 ändert sich die Masse des A-Ring-Fragments nicht, lediglich die Intensität der Fragmente ist - unter ansonsten gleichen Bedingungen - deutlich herabgesetzt (Tabelle 35). So ist das rDA-Fragment bei den IF das intensivste Signal im MS/MS, während für DHD 42% und für DHG nur 23% gefunden werden. Die entsprechenden B-Ring-Fragmente sind in Folge der Hydrierung zwei amu schwerer und können im MS/MS-Modus ebenso detektiert werden. Jüngst

konnte gezeigt werden, dass eine analoge Spaltung auch für das Isoflavan Equol auftritt (Rüfer et al., 2006). Dabei resultiert aufgrund des nach Reduktion fehlenden Sauerstoffatoms an Position C-4 ein um 14 amu leichteres A-Ring-Fragment.

3.8.1.2 „nicht-rDA“-Fragmentierung durch C-Ring-Spaltung

Bei den Untersuchungen der IF-Fragmentierung in der ESI(+)-MS-Analyse wird eine weitere spezifische Fragmentierung gefunden. Da sie zwar aus dem Bruch des C-Ringes resultiert, aber keine rDA-Spaltung ist, wird sie im Folgenden als „nicht-rDA“-Fragmentierung bezeichnet. Für die beiden hier untersuchten Isoflavanone DHD und DHG wird neben dem rDA-Fragment des A-Rings ein intensives zusätzliches Fragment mit $m/z = 107$ detektiert (Abbildung 31 (A)). Dieses wird nur in geringem Maße für IF gefunden (Tabelle 35). Bei der „nicht-rDA“-Fragmentierung werden die Bindungen zwischen den Kohlenstoffen in Position C-2 und C-3 sowie C-3 und C-4 im C-Ring gespalten. Dabei entsteht ein protoniertes 4-Hydroxybenzyl-Kation mit einer Masse von 107 amu. Die Spaltung der Einfachbindung zwischen C-2 und C-3 in Isoflavanonen ist deutlich leichter möglich als bei IF mit einer Doppelbindung zwischen diesen Kohlenstoffen. Entsprechend werden für die IF geringere Intensitäten für das Fragment mit $m/z = 107$ beobachtet (Tabelle 35). Bei dieser „nicht-rDA“-Fragmentierung wird im Gegensatz zu der klassischen rDA-Spaltung dominierend das aus dem B-Ring entstammende Fragment detektiert, d.h. die Ladung wird zumeist auf diese Seite des Moleküls übertragen. Eine analoge Spaltung lässt sich ebenso für das Isoflavan Equol beobachten (Rüfer et al., 2006). Die hier erstmals beschriebene „nicht-rDA“-Fragmentierung von Isoflavanonen und Isoflavanen ermöglicht es, Strukturinformationen über die Substitution des B-Rings zu erhalten. Das charakteristische 4-Hydroxybenzyl-Kation des B-Rings ist nur im ESI(+)-Modus detektierbar und kann im negativen Modus lediglich als „neutral loss“ von 106 amu identifiziert werden.

3.8.2 GC-EI-MS

Bei Polyphenolen handelt es sich aufgrund ihrer Polarität um Substanzen mit einem hohen Siedepunkt. Zur Trennung von beispielsweise Isoflavonoiden mittels GC wird daher in aller Regel zunächst eine Derivatisierung der Analyten zu den Trimethylsilyl (TMS)-Ethern durchgeführt, um eine höhere Flüchtigkeit zu erreichen. Durch die Kopplung der GC mit einem Massenspektrometer wird in vielen Fällen zunächst die Masse $[M]^+$ erhalten. Hieraus lässt sich die Summenformel über das Molekulargewicht ableiten. Zusätzlich werden durch die „electron impact“- (EI)-Ionisierung charakteristische Fragmente gebildet. Anhand dieses „fingerprints“ des Fragmentierungsverhaltens ist eine Identifizierung von GC-Peaks durchführbar. Die TMS-Ether zeigen während der EI-Ionisierung charakteristische Spaltungen des C-Rings analog den für ESI(+)-MS beschriebenen rDA-Fragmentierungen. Darüber hinaus können Reaktionen der TMS-Ethergruppen zur Gewinnung von Strukturinformationen mittels GC-EI-MS genutzt werden. Die Anwendbarkeit vor allem auf Moleküle, die nicht bereits in Spektrenbibliotheken hinterlegt sind, wird in den folgenden Abschnitten anhand ausgewählter Beispiele dargestellt.

Drei wichtige Fragmentierungsreaktionen treten bei TMS-Ethern von Polyphenolen auf. Alle führen zu der Bildung von stabilisierenden Siloxanringen und geben Aufschluss über die Position der Hydroxygruppen im Ausgangsmolekül. Die einzelnen Reaktionen sowie ihre Anwendbarkeit zur Strukturaufklärung werden im Folgenden dargestellt.

a) Abspaltung einer Methylgruppe aus IF mit trimethylsilylierter Hydroxygruppe in Position C-5

Trimethylsilylierte IF, die eine Hydroxyfunktion in Position C-5 tragen, zeigen im EI-MS kein intaktes Molekülion. Stattdessen wird in allen Fällen ein dominierendes Fragment der um 15 amu reduzierten Molekülmasse detektiert (siehe Anhang, Tabelle A7). Das $[M-15]^+$ -Fragment resultiert aus der Abspaltung eines Methylradikals aus der TMS-Gruppe in Position

C-5 und somit β -ständig zu der Keto-Gruppe in Position C-4. Wie in Abbildung 32 gezeigt, läuft diese Fragmentierung vermutlich in zwei Schritten ab. Zunächst wird durch EI ein Elektron aus dem Molekül geschlagen, und ein kationisches Radikal entsteht. Anschließend wird unter Abspaltung einer Methylgruppe aus dem TMS-Ether in Position C-5 ein cyclisches Siloxan gebildet. Durch Ausbildung dieses Sechsrings ist die Ladung über das Molekül delokalisiert, was zu einer Mesomeriestabilisierung des $[M-15]^+$ -Fragments führt. Eine obligate Abspaltung von einer Methylgruppe aus TMS-Ethergruppen in β -Position zu einer Carbonylfunktion wurde zuerst von Smith und Djerassi (Smith and Djerassi, 1971) beschrieben. Zur Gewinnung von Strukturinformationen für IF wurde sie von Creaser et al. (Creaser et al., 1992) sowie Heinonen und Mitarbeitern (Heinonen et al., 2003) verwendet.

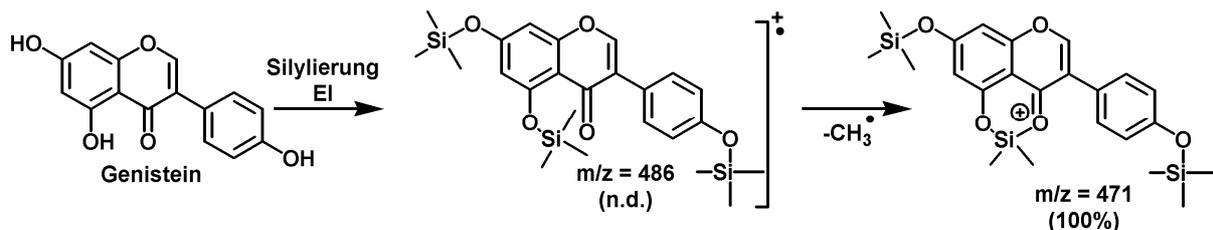


Abbildung 32: Obligater Verlust von 15 amu durch eine Methylradikalabspaltung aus einem TMS-Ether in β -Position zu einer Keto-Gruppe in der GC-EI-MS am Beispiel von GEN.

b) Abspaltung einer Tetramethylsilangruppe aus Isoflavonen mit vicinalen trimethylsilylierten Hydroxygruppen

IF mit zwei vicinalen Hydroxygruppen zeigen im EI-MS in ihrem Fragmentierungsmuster eine charakteristische Abspaltung von 88 amu. Der Verlust dieser 88 amu resultiert aus der Abspaltung einer Tetramethylsilangruppe aus zwei vicinalen TMS-Ethern. Dabei entsteht, wie in Abbildung 33 gezeigt, ein stabilisierender Siloxan-Fünfring, der anders als bei dem zuvor beschriebenen Verlust eines Methylradikals nicht zu einer Mesomeriestabilisierung der durch die EI eingebrachten Ladung führt. Für die betrachteten catecholischen und in Position C-5 unsubstituierten Trihydroxy-IF kann ferner gezeigt werden, dass zusätzlich zu dem $[M-88]^+$ -Fragment ein weiteres Fragment mit

$[M-15-88]^+$ entsteht, welches eine geringfügig höhere Intensität aufweist. Im Falle des 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF liegt nur letztgenanntes Fragment vor, ein $[M-88]^+$ -Fragment wird nicht gefunden (Tabelle A7 sowie Abbildung 33). Dies lässt den Schluss zu, dass die unter a) beschriebene Abspaltung eines Methylradikals eine deutlich vorrangig stattfindende Reaktion darstellt. Eine unspezifische Abspaltung von 15 amu, wie sie für alle IF sichtbar ist, tritt mit steigender Zahl an TMS-Ethergruppen zusätzlich und verstärkt auf. Das etwa gleich starke Auftreten von $[M-88]^+$ - und $[M-15-88]^+$ -Fragmenten der drei nicht in Position C-5

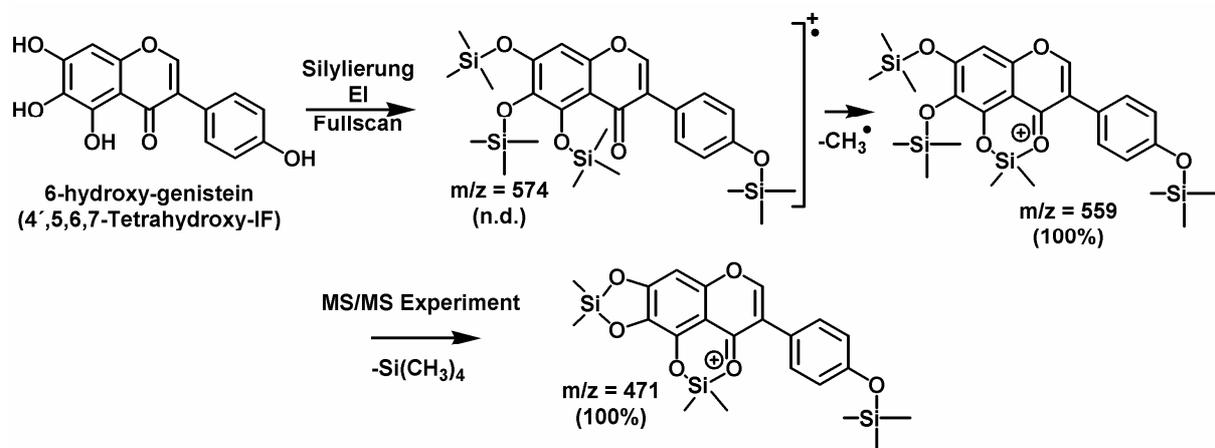


Abbildung 33: Verlust von 88 amu durch Abspaltung einer Trimethylsilangruppe aus zwei vicinalen TMS-Ethergruppen in der GC-EI-MS/MS am Beispiel von 6-Hydroxy-Genistein (4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF).

substituierten catecholischen Trihydroxy-IF zeigt, dass der Verlust von 15 amu unabhängig von der 88 amu-Abspaltung ist. Diese Fragmentierung wurde zuerst von Woodward (Woodward, 1981) und später von Creaser et al. (Creaser et al., 1991) zur Identifizierung von Catecholen beschrieben.

c) Abspaltung von zwei Methylgruppen aus Isoflavonen mit trimethylsilylierter Hydroxygruppe in ortho-Stellung zu einer Methoxyfunktion

IF mit einer Hydroxygruppe in ortho-Stellung zu einer Methoxygruppe zeigen im EI-MS in ihrem Fragmentierungsmuster eine charakteristische Abspaltung von 30 amu. Der Verlust dieser 30 amu resultiert aus zwei

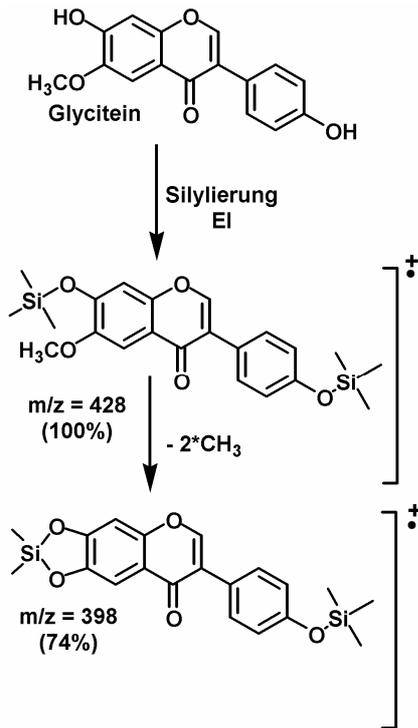


Abbildung 34: Verlust von 30 amu durch Abspaltung von zwei CH_3 -Gruppen aus einer Methoxy-Gruppe in ortho-Stellung zu einer TMS-Ethergruppe in der GC-EI-MS/MS am Beispiel von Glycitein.

aufeinander folgenden Abspaltungen von Methylgruppen aus einer Methoxygruppe und einem benachbarten TMS-Ether. Dabei entsteht, wie in Abbildung 34 am Beispiel von GLYC gezeigt, ein stabilisierender Fünfring entsprechend dem in b) gebildeten Fragment. Von den vier unterschiedlichen in Rotklee und Soja vertretenen Dihydroxy-methoxy-IF zeigen GLYC und CALY ein intensives Auftreten des $[\text{M}-30]^+$ -Fragments, wohingegen für BioA und PRUN das entsprechende Fragment nach vorangegangener Methylradikalabspaltung gemäß Abschnitt a) von $[\text{M}-15-30]^+$ nur in Spuren auftritt. Anhand dieser vier Beispiele ist folglich zu erkennen, dass ein intensiver Verlust von 30 amu nur für die beiden IF auftritt, die eine Methoxygruppe in ortho-Stellung zu einer TMS-Ethergruppe tragen.

Insbesondere zur Detektion von metabolischen Umsetzungen mit COMT, die eine Methylierung von Catecholen katalysiert, ist diese Reaktion hilfreich. Eine analoge Cyclisierung nach Abspaltung von zwei Methylgruppen wurde bereits 1971 von Horman und Viani beschrieben (Horman and Viani, 1971) und kann als diagnostischer Test auf methylierte Catechole dienen (Woodward, 1981).

d) Abspaltung einer COCH_3 -Einheit aus isolierten Methoxygruppen

Für alle IF mit einer isolierten Methoxygruppe im A- oder B-Ring ist eine Abspaltung von 43 amu zu beobachten. Empirisch lässt sich dies an den Beispielen von BioA und PRUN auf der einen Seite und bei GLYC und CALY auf der anderen Seite zeigen. Für die in Position C-5 hydroxylierten IF BioA und PRUN läuft zunächst die obligate Reaktion im Sinne von 3.8.2 a) ab. Im Anschluss kommt es zu dem intensiven Verlust von 43 amu und so

zu einer Bildung eines $[M-15-43]^+$ -Fragments. In den Stellungsisomeren GLYC und CALY liegt die Methoxygruppe jeweils in ortho-Stellung zu einer Hydroxygruppe vor, und eine Abspaltung von 43 amu ist nicht detektierbar. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nur eine isoliert ständige Methoxygruppe komplett unter Ringverkleinerung eliminiert wird (Abbildung 35).

Während im Fullscan-Modus Intensitäten für die Abspaltung von 43 amu von 11% (BioA) und 10% (PRUN) erreicht werden, bildet das entsprechende Fragment im MS/MS-Modus das Hauptfragment für PRUN und BioA. CALY zeigt diese Fragmentierung auch im MS/MS-Experiment nicht und GLYC nur mit einer geringen Intensität von 9%. Die Auflistung der gesamten massenspektrometrischen Daten findet sich in Tabelle 36. Die Abspaltung von 43 amu wird begünstigt durch die vorangegangene Eliminierung eines Methylradikals im Sinne von 3.8.2 a). Für FORM, das auch eine isolierte Methoxygruppe im B-Ring trägt, ist diese Abspaltung nur mit einer relativen Intensität von 12% im MS/MS-Experiment detektierbar. Zusätzlich ist

bemerkenswert, dass die kollisionsinduzierte zweite Fragmentierung von FORM in der GC-Ionenfalle in gleicher Weise, wie es unter 3.8.1.1 b) für die ESI(+)-MS beschrieben wird, offenbar zu radikalischen und nicht radikalischen Produkten nebeneinander führt. Dabei dominiert hier das nicht radikalische Produkt mit $m/z = 296$ mit einer relativen Intensität von 51%. Für BioA und PRUN entstehen analog nicht radikalische Produkte, allerdings nur mit einer relativen Intensität von 19% bzw. 31%. Der Unterschied kann darin begründet liegen, dass das TMS-Etherderivat von

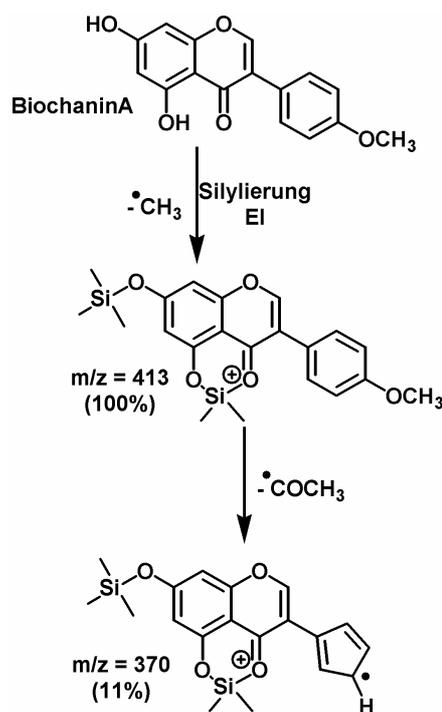


Abbildung 35: Verlust von 43 amu durch Ringverkleinerung bei Eliminierung einer Methoxygruppe in der GC-EI-MS am Beispiel von BiochaninA.

Tabelle 36: Charakteristische Fragmentierungen von IF mit einer Methoxygruppe in der GC-EI-MS und MS/MS. Die eingeklammerten Zahlen geben die jeweiligen relativen Intensitäten an. „-“: Fragment nicht detektiert

IF	Fullscan Modus					MS/MS Modus	
	[M] ⁺	[M-15] ⁺	[M-43] ⁺	[M-15-43] ⁺	[M-30] ⁺	[M-43] ⁺	[M-15-43] ⁺
GLYC	428 (100)	413 (33)	385 (9)	370 (3)	398 (74)	385 (9) 384 (-)	370 (7) 369 (-)
CALY	428 (73)	413 (14)	385 (2)	370 (2)	398 (100)	385 (1) 384 (-)	370 (3) 369 (-)
BioA	428 (-)	413 (100)	385 (-)	370 (11)	398 (7)	385 (-) 384 (-)	370 (100) 369 (19)
PRUN	428 (-)	413 (100)	385 (-)	370 (10)	398 (2)	385 (1) 384 (-)	370 (100) 369 (31)
FORM	340 (100)	325 (37)	297 (2)	282 (5)	310 (4)	297 (12) 296 (51)	282 (11) 281 (10)

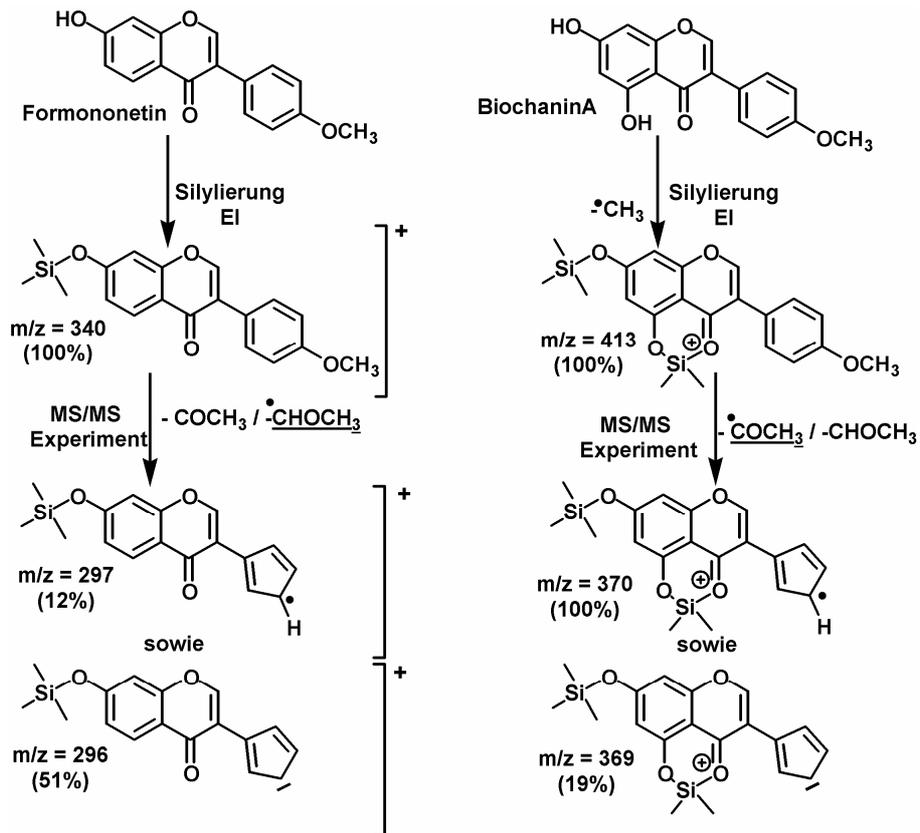


Abbildung 36: Bildung von radikalischen und nicht radikalischen Fragmenten durch kollisionsinduzierte GC-EI-MS/MS-Fragmentierung unter Eliminierung von isolierten Methoxygruppen.

FORM selbst radikalisch ist, die entsprechenden TMS-Etherderivate von BioA und PRUN aber aufgrund der obligaten Methylabspaltung nicht mehr radikalisch sind. In der kollisionsinduzierten MS/MS-Fragmentierung scheint gleichermaßen eine Radikaleliminierung (in Abbildung 36 unterstrichen) bevorzugt zu sein.

Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsionen resultiert somit eine entgegengesetzte Intensitätsverteilung für die Produktfragmente. Der dargestellte Fragmentierungsweg läuft nicht in allen Fällen streng systematisch ab, aber sofern die entsprechenden Doppelsignale vorhanden sind, können sie zur Strukturcharakterisierung mit herangezogen werden.

Die Bildung von Fragmenten durch den Verlust von 43 amu aus isoliertständigen Methoxygruppen wurde bereits für den polyphenolischen Alternariolmonomethylether und seine Metabolite von Pfeiffer et al. (Pfeiffer et al., 2007) beschrieben und zur Strukturaufklärung verwendet.

e) Retro-Diels-Alder-Fragmentierung

Die in Abschnitt 3.8.1.1 für die ESI-MS-Analyse beschriebene rDA-Fragmentierung der IF kann grundsätzlich auch in der EI nach Silylierung stattfinden. Für IF können diese rDA-Fragmente jedoch nur selten und mit geringer Intensität detektiert werden (Tabelle A7). Für die beiden untersuchten Isoflavanonderivate von DAI und GEN, DHD und DHG, ist dieser Fragmentierungsweg von weit größerer Bedeutung. Aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie innerhalb dieser Moleküle (Abbildung

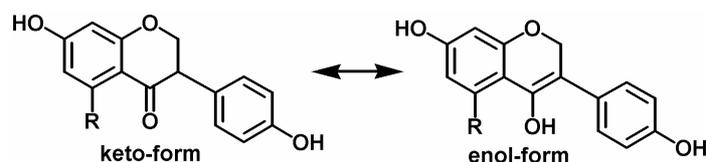


Abbildung 37: Keto-Enol-Tautomerie bei Isoflavanonen.

37) resultieren nach Silylierung in der GC-MS-Analyse jeweils zwei verschiedene Peaks. Für beide Tautomere von DHD und DHG bilden die rDA-Fragmente die Basis-

peaks in der EI-MS-Analyse. Während für DHD in der Keto-Form das Hauptfragment mit $m/z = 192$ aus dem B-Ring entsteht, trägt bei DHG

das A-Ring-Fragment nach der rDA-Spaltung die Ladung ($m/z = 296$) (Abbildung 38). Für die Enol-Tautomeren gehen die Basispeaks mit $m/z = 281$ für DHD bzw. $m/z = 369$ für DHG beide aus dem A-Ring hervor. Ein entsprechendes Fragment des B-Ringes der Enol-Form mit $m/z = 191$ kann jeweils nur mit einer relativen Intensität von weniger als 5% gefunden werden (Tabelle A7). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Heinonen et al. die analoge Fragmente für reduktive Metabolite von FORM untersuchten (Heinonen et al., 2004a). Rüfer et al. beschreiben das B-Ring-Fragment mit einer m/z von 192 für die Fragmentierung von Equol (Rüfer et al., 2006).

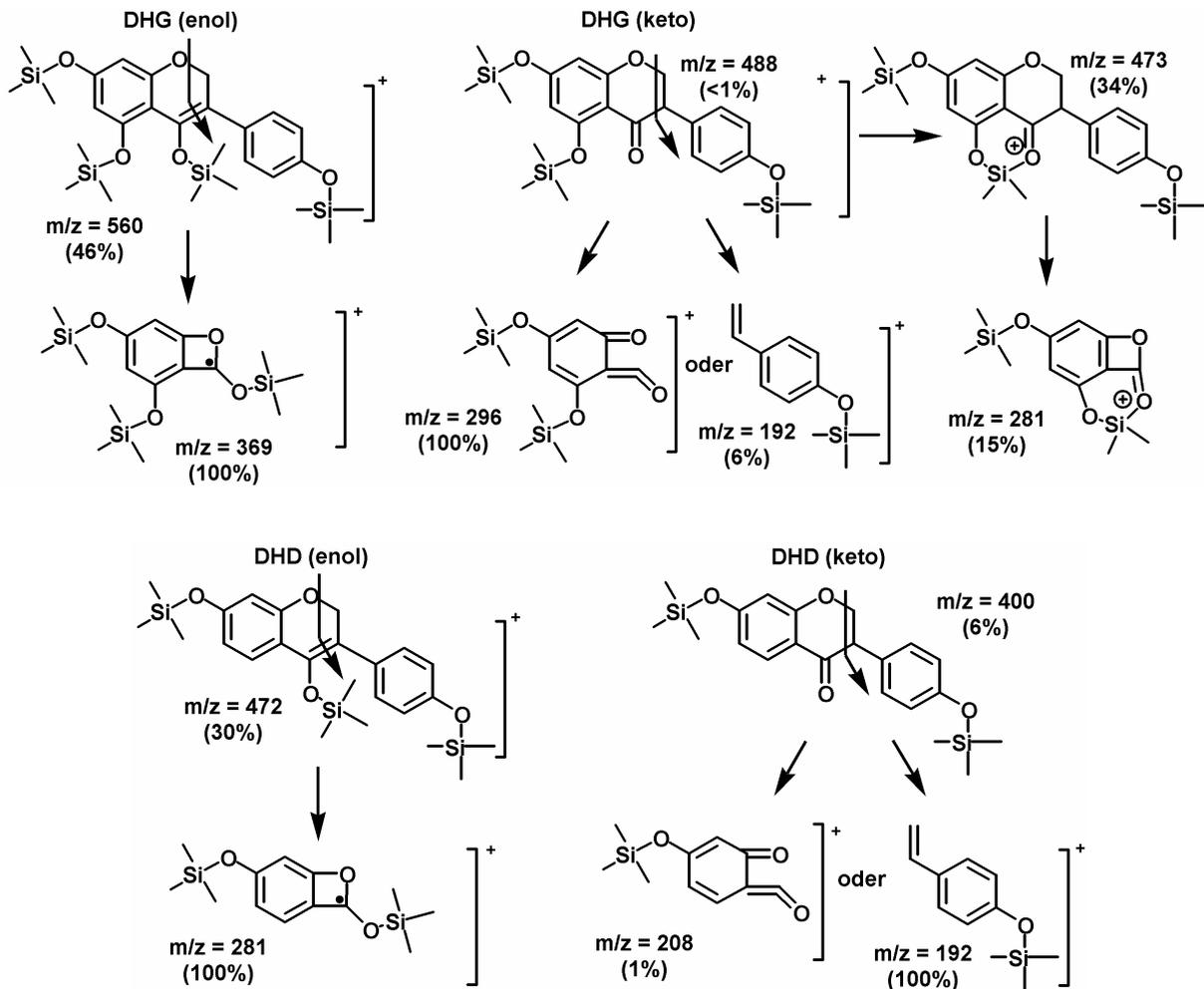


Abbildung 38: Fragmentierungsmuster der Keto- und Enol-Tautomere von Dihydrogenistein (DHG, oben) und Dihydrodaidzein (DHD, unten) nach GC-EI-MS-Analyse.

Aufgrund der bereits unter e) dargestellten Keto-Enol-Tautomerie liegt die ursprüngliche Ketofunktion an Position C-4 partiell als Enol vor. Durch Silylierung der Enol-Gruppe resultieren nach der Derivatisierung zwei Verbindungen, die sich durch GC trennen lassen. So werden für die untersuchten Isoflavanone DHD und DHG nach Trimethylsilylierung und gaschromatographischer Trennung im EI-MS jeweils zwei Peaks beobachtet. Das Keto-Tautomer bildet den dominierenden Peak und zeigt dabei ein mäßiges Signal für das $[M]^+$ für DHD bzw. $[M-15]^+$ für DHG. Den Basispeak bildet das rDA-Fragment entsprechend Kapitel 3.8.2 e). Der jeweils zweite kleinere Peak entstammt dem Enol-Tautomer mit einer Masse für $[M]^+$ von $m/z = 472$ für DHD und $m/z = 560$ für DHG. Der Basispeak entspricht auch für die Enol-Tautomere einem rDA-Fragment. Das Auftreten von zwei mittels GC trennbaren Tautomeren mit der dargestellten charakteristischen rDA-Fragmentierung bietet eine gute Möglichkeit, die Dihydro-Formen von IF zu identifizieren.

3.8.3 Strukturanalyse von Isoflavonen und Isoflavon-metaboliten mittels HPLC-ESI(+)-MS/(MS) und GC-EI-MS/(MS)

In diesem Abschnitt werden die unter 3.8.1 und 3.8.2 dargestellten charakteristischen Fragmentierungsreaktionen kombiniert und zur Strukturanalyse von unbekanntem IF-Derivaten genutzt. Anwendung finden die Fragmentierungsschemata auf die im Zusammenhang mit den Metabolismusstudien in den Kapiteln 3.2, 3.3 und 3.4 aufgetretenen Derivate verschiedener IF. Im Mittelpunkt stehen die IRI-Derivate und -Metabolite.

a) Strukturanalyse der oxidativen Phase-I-Metaboliten von IRI

Wie in Kapitel 3.2 dargestellt, wird IRI im Phase-I-Metabolismus *in vitro* zu mindestens drei Metaboliten umgesetzt. Dazu zählen neben dem 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF (bzw. 6-Hydroxy-GEN), das durch Cochromatographie identifiziert werden kann, zwei monohydroxylierte Derivate unbekannter Struktur. Unter Zuhilfenahme der charakteristischen

Fragmentierungsreaktionen in EI-MS und ESI(+)-MS (3.8.1 und 3.8.2) soll die Position der in IRI eingefügten Hydroxyfunktion bestimmt werden. Anhand von Literaturdaten ist anzunehmen, dass IRI in den Positionen C-4' und C-8 hydroxyliert werden sollte. Die Positionen C-2 und C-2' sind zwar theoretisch möglich, aber aufgrund sterischer Hinderung unwahrscheinlich und für andere IF nur als Minormetabolite beschrieben (Kulling et al., 2000; Rüfer et al., 2007).

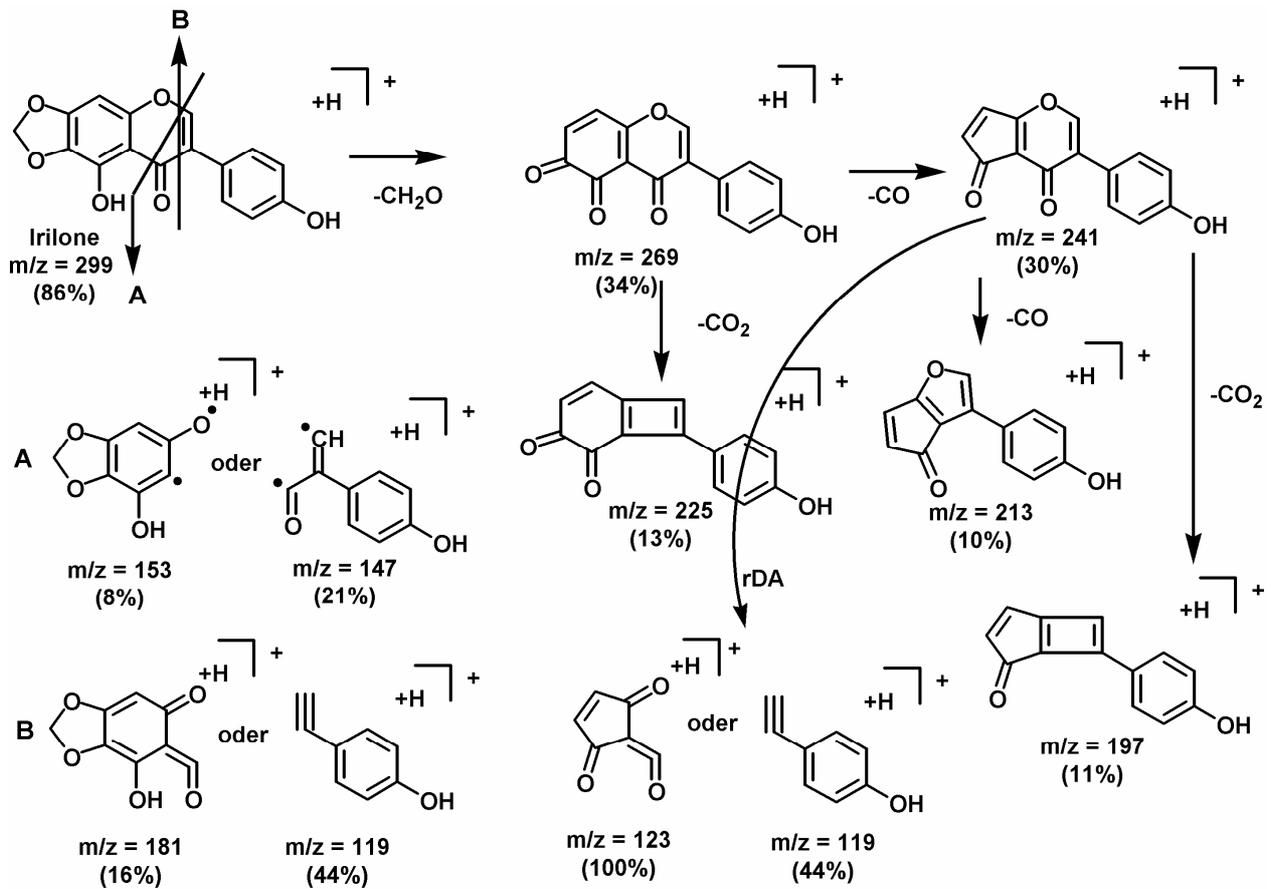


Abbildung 39: Fragmentierungsschema für Irilone in der HPLC-ESI(+)-MS. Das zugehörige Massenspektrum befindet sich im Anhang, Abbildung A5.

Durch **HPLC-ESI(+)-MS**-Analyse ist für beide IRI-Metabolite das Quasimolekül mit m/z = 315 amu dominierend (Spektren im Anhang, Abbildung A6). Für den ersten monohydroxylierten Metaboliten (M2) sind darüber hinaus lediglich unspezifische Abspaltungen von H₂O, CO oder CO₂-Gruppen zu finden. Der zweite monohydroxylierte Metabolit (M3) zeigt zusätzlich ein intensives Signal mit m/z = 181, welches dem rDA-Fragment des A-Rings zuzuordnen ist. Dieses rDA-Fragment wird

identisch auch für IRI selbst gefunden (siehe Abbildung 39). Dies lässt vermuten, dass es sich bei M3 um einen Metaboliten mit unverändertem A-Ring handelt. Weitere strukturanalytische Daten sind mittels ESI(+)-MS nicht zu erhalten.

Durch **GC-EI-MS** Analyse ist für beide Metabolite im Fullscan-Modus deutlich das zu erwartende $[M-15]^+$ -Fragment nach Cyclisierung (3.8.2 a)) zwischen dem TMS-Ether in Position C-5 und der Keto-Gruppe an C-4 mit $m/z = 515$ amu als Hauptpeak zu erkennen. Das im MS/MS-Modus erhaltene Massenspektrum (siehe Anhang, Abbildung A7) zeigt für den Metaboliten M3 ein Fragment mit $m/z = 427$ als Hauptpeak. Dieses entspricht einer Abspaltung von 88 amu und deutet somit klar auf eine catecholische Struktur hin, die nur bei 3'-Hydroxy-IRI vorliegt. Für M2 lassen sich nur unspezifische Abspaltungen beobachten, so dass auch hier keine genaue Aussage über die Position der zusätzlichen Hydroxygruppe möglich ist.

Übereinstimmend weisen HPLC-ESI(+)-MS und GC-EI-MS darauf hin, dass es sich bei M3 um 3'-Hydroxy-IRI handelt. Eine definitive Aussage zur Struktur von M2 ist indes nicht möglich. Aufgrund eines Analogieschlusses auf der Basis mikrosomaler Hydroxylierungen anderer IF ist es aber sehr wahrscheinlich, dass der zweite monohydroxylierte Hauptmetabolit 8-Hydroxy-IRI ist.

b) Strukturanalyse des O-methylierten Irilon-Derivates aus *Iris germanica*

Für einen Pflanzenextrakt aus *Iris germanica* wurde neben einer Vielzahl von verschiedenen IF auch das Auftreten von den beiden möglichen O-methylierten IRI-Derivaten (in Position C-4' und C-5) beschrieben (Atta Ur et al., 2003). In einem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Extrakt kann dem gegenüber nur eines dieser beiden Derivate gefunden werden. Zur Aufklärung der Methylierungsposition werden die unter 3.8.1 und 3.8.2 vorgestellten Fragmentierungswege angewendet: Neben dem Quasimolekülion ($m/z = 313$) des unbekanntes O-methylierten IRI-Derivates sind im **HPLC-ESI-MS/MS**-Spektrum zwei intensive Signale

bei $m/z = 298$ amu und 180 amu zu erkennen (siehe Anhang, Abbildung A9). Das größere Fragment repräsentiert einen Massenverlust von 15 amu zum $[M+H]^+$ -Ion und resultiert aus der radikalischen Spaltung der Methoxygruppe. Eine solche Abspaltung eines Methylradikals ist in der

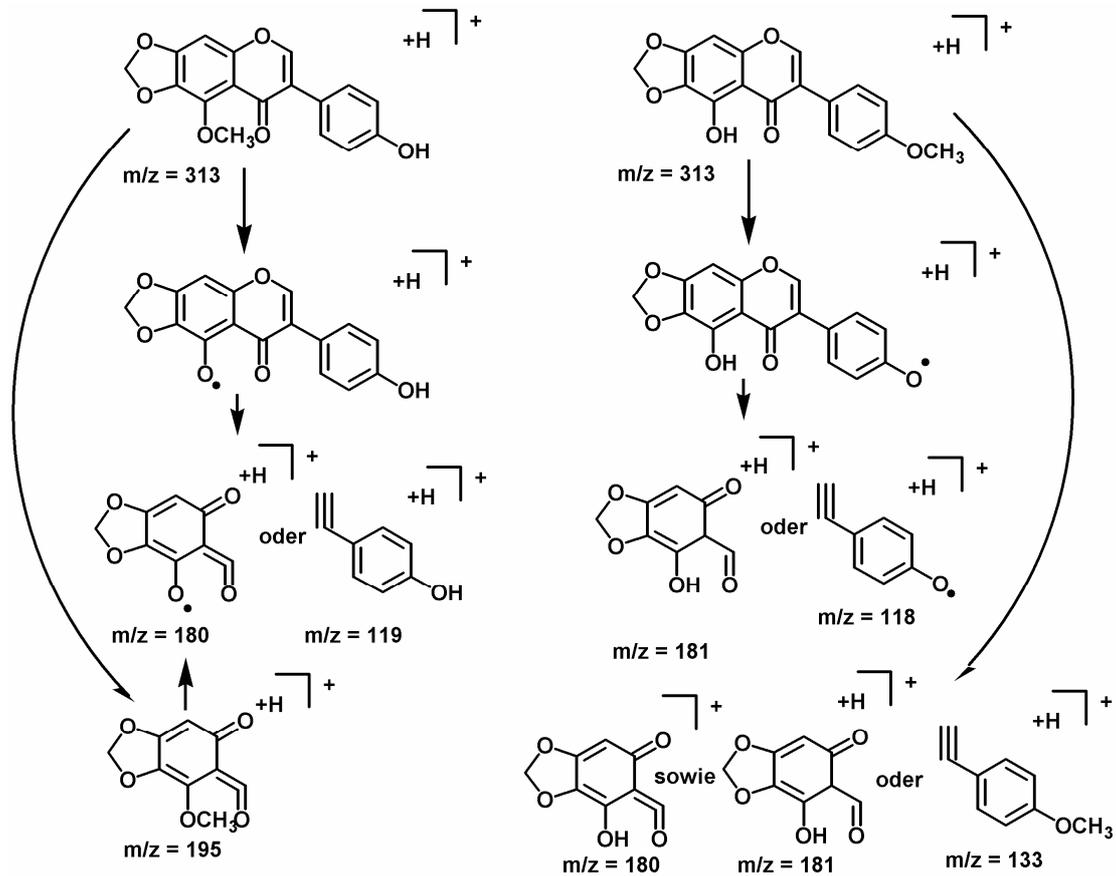


Abbildung 40: Vorgeschlagene Fragmentierungspfade für O-methylierte Irilon-Derivate in der HPLC-ESI(+)-MS.

HPLC-ESI(+)-MS für alle IF mit Methoxygruppe zu beobachten. Hieraus lassen sich keine Strukturinformationen ableiten.

Die Bildung des Fragments mit 180 amu kann über zwei Fragmentierungspfade erklärt werden (Abbildung 40). Der linke Pfad in Abbildung 40 entspricht einer radikalischen Demethylierung mit einer anschließenden klassischen rDA-Spaltung, wie in 3.8.1.1 a) beschrieben. Das dabei auftretende Fragment mit $m/z = 195$ ist ebenfalls schwach ($0,5\%$ relativer Intensität) nachweisbar. Der rechte Pfad in Abbildung 40 entspricht einer rDA-Spaltung für in Position C-4`-methylierte IF unter Bildung eines zusätzlichen radikalischen Fragments. Anders als für BioA

und FORM in 3.8.1.1) gezeigt, würde hier aber das radikalische Fragment bei weitem dominieren und das klassische rDA-Fragment ($m/z = 181$ amu) nur weniger als 10% von dessen Intensität zeigen. Deshalb erscheint eine Bildung auf diesem Wege nicht wahrscheinlich, da IRI eine ähnliche Struktur wie BioA und FORM aufweist. Sehr viel wahrscheinlicher ist, dass das 181 amu-Fragment durch den natürlichen Anteil an ^{13}C hervorgerufen wird und dem Fragment mit 180 amu entspricht. Folglich tritt hier kein klassisches rDA-Fragment auf. Somit ist der linke Pfad in Abbildung 40 die wahrscheinlichere der beiden Fragmentierungen.

Durch **GC-EI-MS**-Analyse ist für die Verbindung im Fullscan-Modus deutlich die Masse des vollständigen silylierten Moleküls $[\text{M}]^+$ mit $m/z = 384$ amu (50% relative Intensität) detektierbar. Wie in Abschnitt 3.8.2 a) dargestellt, zeigen GC-EI-MS Spektren von IF, die in Position C-5 eine TMS-Ethergruppe tragen, das $[\text{M}-15]^+$ -Fragment als dominierendes Ion, und das intakte $[\text{M}]^+$ ist nicht detektierbar. Das $[\text{M}-15]^+$ -Ion wird nur zu einer relativen Intensität von 48% gefunden, im Gegensatz zu IRI selbst, wo dieses Fragment den Basispeak darstellt (siehe Anhang, Abbildung A8). Ebenso wird für das methylierte Derivat das $[\text{M}]^+$ -Ion mit $m/z = 384$ amu mit einer relativen Intensität von 48% detektiert. Somit ist davon auszugehen, dass die Hydroxyfunktion an Position C-5 in dem Derivat methyliert vorliegt und für eine Trimethylsilylierung nicht zugänglich ist.

Sowohl HPLC-ESI(+)-MS² als auch GC-EI-MS belegen, dass es sich bei dem im *Iris germanica* vorkommenden methylierten IRI-Derivat um das 5-O-Methyl-IRI handelt.

c) Strukturanalyse des reduktiven Metaboliten von Irilon

Inkubationen von IRI mit HFM führen, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, zu einem mittels HPLC-ESI(+)-MS detektierbaren Produkt mit einer m/z von 301 amu. Dies entspricht der Masse des Quasimolekülions von DHI, daher wird angenommen, dass es sich um diesen Metaboliten handelt. Zur

Überprüfung dieser Annahme werden weitere Untersuchungen mittels gekoppelter Massenspektrometrie durchgeführt und die Fragmentierungsmuster aus 3.8.1 und 3.8.2 angewendet.

Die **HPLC-ESI(+)-MS/MS**-Analyse des Mutterions zeigt unter anderem deutliche Signale der charakteristischen rDA- (siehe Kapitel 3.8.1.1) und „nicht-rDA“-Fragmente (siehe Kapitel 3.8.1.2) mit $m/z = 181$ amu sowie 107 amu. Diese werden für IRI in deutlich geringerem Maße ebenso gefunden (Tabelle 35). Demzufolge liegt der A-Ring des Metaboliten im Vergleich zu IRI unverändert vor (Abbildung 41). Weiterhin deutet das gegenüber IRI hier viel intensivere 107 amu Fragment auf eine Reduktion des Moleküls zur Dihydroform hin. Entsprechend der in Kapitel 3.8.1.2 beschriebenen „nicht-rDA“-Fragmentierung verstärkt sich dadurch die Bildung dieses Fragments erheblich.

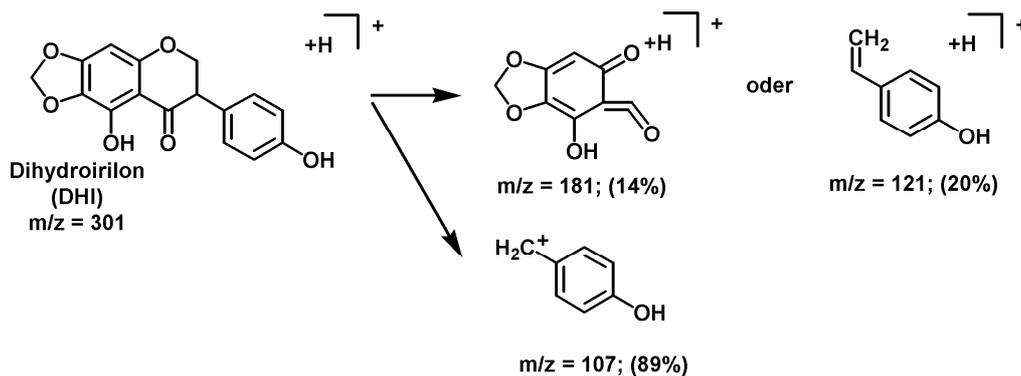


Abbildung 41: Fragmentierungspfade für entstehenden Hauptfragmente des reductiven Irilon Metaboliten Dihydroirilon (DHI) in der HPLC-ESI(+)-MS.

In der **GC-EI-MS**-Analyse treten für den Metaboliten im Fullscan-Modus zwei Peaks auf. Der intensivere Peak zeigt ein $[M]^+$ mit $m/z = 444$ (relative Intensität 2%) und dominierend $[M-15]^+$ mit $m/z = 429$ (relative Intensität 93%), der weniger intensive Peak zeigt ein intensives $[M]^+$ mit $m/z = 516$ (relative Intensität 46%). Dies deutet auf das Vorliegen eines Dihydro-IF hin, da hierfür durch Silylierung die Keto-Enol-Tautomere in zwei durch GC trennbare Derivate überführt werden. Auch die MS-Spektren beider Peaks unterstützen diese Annahme. Sowohl das $[M]^+$ -Ion wie auch der Basispeak des intensiveren GC-Peaks mit $m/z = 252$ amu als rDA-Fragment des A-Rings gemäß Kapitel 3.8.2 e)

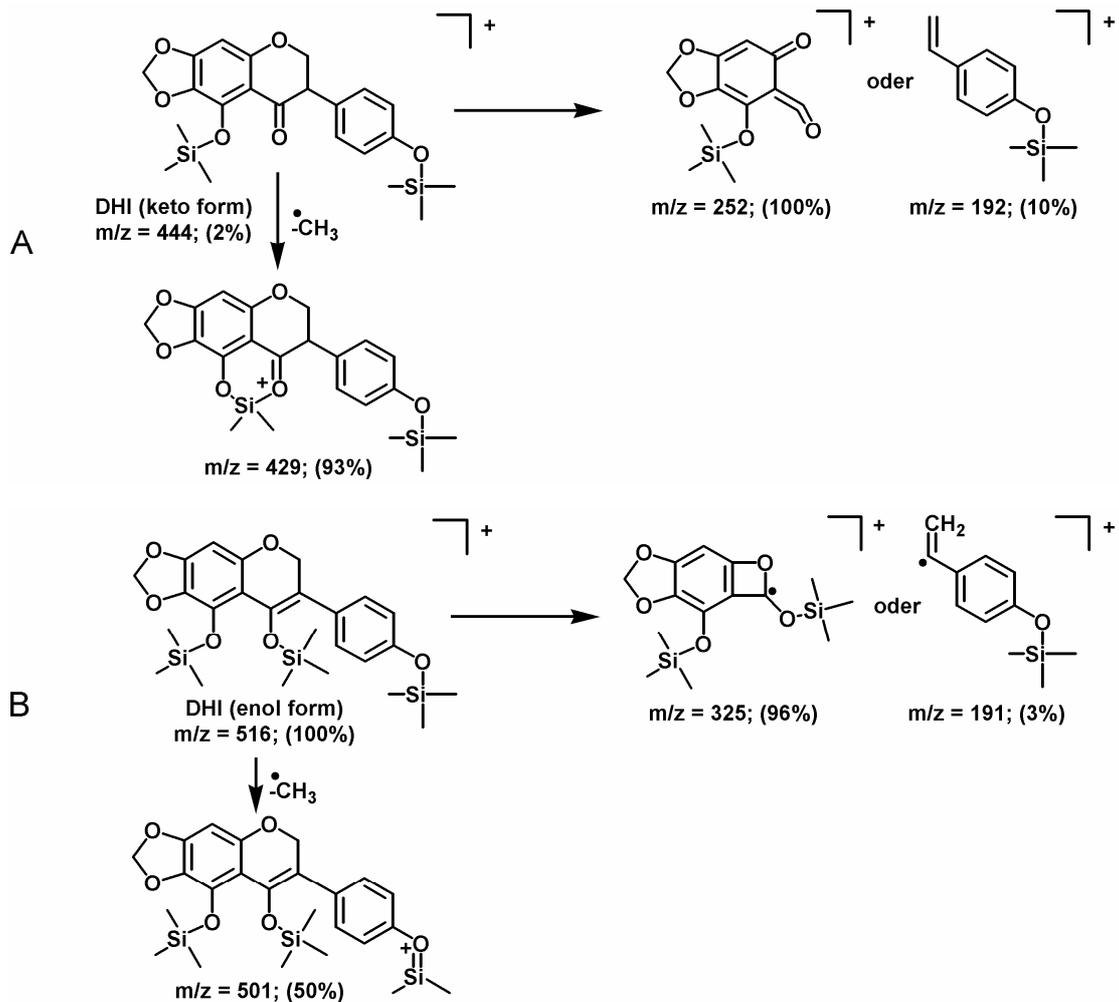


Abbildung 42: Fragmentierungspfade für die entstehenden Hauptfragmente beider Peaks des reduktiven Irilon-Derivates in der GC-EI-MS, resultierend aus der Keto-Form (A) und der Enol-Form (B) von Dihydroirilon (DHI).

entsprechen der Keto-Form von DHI. Der kleinere Peak im Fullscan-Chromatogramm zeigt das $[M]^+$ -Signal der Enol-Form mit 516 amu sowie ein intensives Fragment mit $m/z = 325$ amu, welches aus der in Abbildung 42 dargestellten rDA-Spaltung hervorgeht.

Für den untersuchten reduktiven IRI-Metaboliten lässt sich durch HPLC-ESI(+)-MS/MS- und GC-EI-MS-Analyse übereinstimmend belegen, dass es sich dabei um das erwartete Isoflavanon DHI handelt.

d) Differenzierung zwischen den verschiedenen Trihydroxy-methoxy-IF in Rotklee und Humanplasma

Wie in Kapitel 3.5 dargestellt, beinhaltet sowohl das untersuchte Rotkleepräparat wie auch das nach Aufnahme untersuchte Plasma mehrere monohydroxylierte Derivate von BioA oder PRUN oder dessen Stellungsisomere. Für den oxidativen *in vitro* Phase-I-Metabolismus von BioA konnte die Entstehung dieser Verbindungen und die zugehörigen Fullscan-MS-Spektren bereits gezeigt werden (Kulling, 2001). Aufgrund der geringen Konzentrationen und Probenmengen können hier nur die GC-EI-MS(/MS)-Analysen zur Gewinnung von Strukturinformationen genutzt werden. Während die Messung im Fullscan-Modus für alle dicht beieinander eluierenden Peaks intensiv das $[M-15]^+$ -Fragment der in Position C-5 trimethylsilylierten IF mit $m/z = 501$ amu zeigt, lässt sich erst im MS/MS-Modus zweifelsfrei erkennen, dass es sich um acht Substanzen handelt. Im MS/MS-Experiment mit $m/z = 501$ als Mutterion lässt sich für drei der acht in Frage kommenden Stellungsisomere von Trihydroxy-methoxy-IF (Abbildung 28) das Hauptfragment $[M-15-43]^+$ mit 458 amu detektieren. Die anderen zeigen gleichermaßen Abspaltungen von 15 amu und 30 amu. Der Verlust von 43 amu bei den drei Peaks II, IV und VI (Abbildung 27) weist auf eine isoliertständige Methoxygruppe hin (3.8.2 d)). Folglich lassen sich diese Peaks den Strukturformeln d, f und g (Abbildung 27) zuordnen, da nur diese eine isolierte Methoxygruppe tragen. Die genaue Position der Methoxygruppe im Molekül lässt sich anhand der GC-EI-MS/MS-Spektren nicht bestimmen. Um eine weitergehende Differenzierung vornehmen zu können, wären höhere Konzentrationen und die HPLC-ESI(+)-MS/MS-Analyse notwendig.

e) Überlegungen zum Substitutionsmuster eines unbekanntes Dihydroxy-methoxy-Isoflavons in Rotklee

Neben den für Rotklee bekannten Dihydroxy-methoxy-IF CALY, PRUN, GLYC und BioA wird in der GC-EI-MS-Analyse ein weiteres Stellungsisomer mit einer Retentionszeit von 28,8 min detektiert. Das erhaltene

Fullscan-MS-Spektrum zeigt ein intensives Signal mit $m/z = 428$. Dies deutet darauf hin, dass keine Hydroxylierung in C-5-Position vorliegt, die zu einer obligaten Methylradikalabspaltung führt. Der Basispeak des MS-Spektrums mit $m/z = 398$ entspricht einer doppelten Abspaltung von zwei Methylgruppen, wie sie aus einer Methoxygruppe in Nachbarschaft zu einer TMS-Ethergruppe auftritt. Wenn man berücksichtigt, dass alle bislang beschriebenen IF sowohl in Position C-7 und C-4' substituiert sind, bleiben nur noch vier denkbare Isomere übrig: 4',6-Dihydroxy-7-methoxy-IF, 4',8-Dihydroxy-7-methoxy-IF, 4',7-Dihydroxy-8-methoxy-IF sowie 4',7-Dihydroxy-3-methoxy-IF. Für die GC-EI-MS-Analyse, ist hier eine Grenze erreicht, und HPLC-ESI-MS-Daten fehlen zu diesem Analyten. Über eine rDA-Fragmentierung in der HPLC-ESI(+)-MS wäre letztlich aber auch keine Differenzierung zwischen den drei erstgenannten Verbindungen möglich.

3.9 GC-EI-Quantifizierung von Irilon mit Ionenfallenmassenspektrometer

Die Analyse der IF nach gaschromatographischer Trennung wird mittels eines Ionenfallenmassenspektrometers durchgeführt. Die Verlässlichkeit der Quantifizierung von IRI wird dabei mit zwei analytischen Ansätzen überprüft. Zum einen wird GLYC als interner Standard verwendet und mittels externer Standardlösungen ein spezifischer Korrekturfaktor für IRI ermittelt. Zum anderen wird über eine externe Standardreihe des IRI eine Eingrenzung des optimalen Arbeitsbereiches vorgenommen. Zur Ermittlung der Flächen werden die XIC aus dem Fullscan verwendet. Für IRI wird das Fragment mit $m/z = 427$ verwendet, GLYC wird aus dem XIC der drei Haptionen mit $m/z = 428$, 413 und 398 integriert, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen.

An der Ermittlung des KF zeigt sich deutlich das zentrale Problem der genauen Quantifizierung unter Nutzung einer Ionenfalle. Die Flächen für GLYC und IRI, die an zwei aufeinander folgenden Tagen aus denselben

vier silylierten Standards ermittelt werden, schwanken in einem Maße, dass die daraus ermittelten KF um über 30% differieren (siehe Anhang, Tabelle A8). Aus den ersten vier unabhängigen Messungen lässt sich ein KF von $0,82 \pm 0,14$ berechnen. Die erneute Analyse derselben Standards führt zu einem KF von $0,79 \pm 0,12$. Im Mittel stimmen die beiden erhaltenen KF recht gut überein, aber die sehr hohen relativen Standardabweichungen von 17,6% für die erste Messreihe bzw. 14,6% für die zweite machen deutlich, dass bei der quantitativen Analyse mit Ionenfallen-MS mit beträchtlichen Schwankungen zu rechnen ist. Über alle acht Bestimmungen gemittelt, errechnet sich ein KF von $0,80 \pm 0,12$, mit welchem die folgenden Berechnungen angestellt werden.

Untersuchung von Plasmaproben

Für die Untersuchungen an Plasmaproben ist vor der Derivatisierung eine aufwendige Aufreinigung notwendig. Um eventuelle Substanzverluste dabei aufdecken zu können sowie zur Festlegung eines linearen Arbeitsbereiches, wird eine Matrixkalibrierung erstellt. Es werden aufsteigende IRI-Konzentrationen mit konstanter Menge an GLYC als ISTD mit Leerplasma versetzt und entsprechend der in Kapitel 2.5.2 beschriebenen Arbeitsvorschrift aufgearbeitet.

Die Kalibration liefert über einen Konzentrationsbereich von 0,8-80 µg/mL eine gute Linearität mit einem Regressionskoeffizienten von 0,999 (siehe Anhang, Abbildung A10). Es kann mittels Darstellung der Wiederfindungsfunktion weiter dargestellt werden, dass sowohl im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,008-0,8 µg/mL wie auch bei hohen IRI-Konzentrationen (80-320 µg/mL) keine gute Linearität vorliegt und somit keine Quantifizierungen in diesen Bereichen zulässig sind. Insgesamt zeigt der Verlauf der Kalibrierung einen sigmoiden Verlauf, der in einer logarithmischen Darstellung beider Achsen visuell besonders deutlich wird, da hier der weite Arbeitsbereich gestaucht abgebildet wird (siehe Anhang, Abbildung A10). Dies bedeutet, dass geringe

Konzentrationen gerätebedingt überbewertet und hohe Mengen als zu gering bestimmt werden.

Durch die Korrektur der Aufarbeitungsverluste mittels ISTD kann eine Wiederfindung von 92,9% gegenüber der Analyse der Substanzen ohne Blutplasmamatrix, Inkubation mit β -Glucuronidase und Ethylacetatextraktion in dem linearen Arbeitsbereich erreicht werden.

Damit wird eine Quantifizierung von IRI mittels Ionenfallen-MS in hinreichender Genauigkeit unter Verwendung von GLYC als ISTD möglich und dementsprechend für die Quantifizierung nach Inkubation des IF mit HFM angewendet.

Bei der abschließenden Quantifizierung der *in vivo* Untersuchung zu Resorption und Metabolismus von einem Rotkleeisoflavonpräparat muss aufgrund der fehlenden Sensitivität im Fullscan-Modus des GC-MS auf den deutlich empfindlicheren MS²-Modus zurückgegriffen werden. Die oben ermittelten KF können somit hier nicht verwendet werden. Zu diesem Zweck werden parallel zu den Bestimmungen mittels geringer konzentrierten externen Standards eigene KF für FORM, BioA, DAI und GEN ermittelt. Aufgrund des völlig unterschiedlichen Verhaltens im zweiten Fragmentierungsschritt lassen sich folgende KF bezogen auf GLYC errechnen: FORM 0,72; BioA 0,69; DAI 1,01; GEN 1,57; IRI 0,43. Es ist zu erkennen, dass die IF, die einer starken Fragmentierung in eine Vielzahl verschiedener Tochterionen unterliegen (FORM und IRI), besonders niedrige KF zeigen und dass beispielsweise GEN, das vornehmlich ein einzelnes Tochterion bildet, einen hohen KF besitzt. Dies belegt abermals die Feststellung, dass im Bereich geringer Signalintensitäten die Sensitivität relativ verstärkt abnimmt. Ein einzelnes Tochterion wird so relativ in dieser Bestimmung stärker gewichtet, wohingegen eine Vielzahl an jeweils niedriger konzentrierten Tochterionen summarisch ein schwächeres Gesamtsignal abgibt. Da die Summe der Tochterionen aber zur Berechnung der Peakfläche dient, kommt es zu den stark unterschiedlichen KF.

Trotz der beachtlichen Schwankungen, wie sie oben für den Fullscan-Modus anschaulich gezeigt werden, ist die Verwendung eines ISTD notwendig, da das verwendete Polaris-Q-Ionenfallen-MS in sehr engen Zeitabständen wegen seiner hohen Verschmutzungsanfälligkeit in Ionenquelle und Linsensystem gereinigt werden muss. Dabei sind Veränderungen der Sensitivität von über Faktor zehn durchaus üblich. Diese können dann aber mittels ISTD hinreichend kompensiert werden. Generell liegen die Stärken der Ionenfallen-MS jedoch eher in einer hohem Nachweisempfindlichkeit und ihren Möglichkeiten der Strukturcharakterisierung im MS^n -Modus, wie sie in Kapitel 3.8.2. beschrieben werden.

GC-EI-MS-Analyse des reduktiven Metabolismus von Irlon

Zur Quantifizierung von IRI, das zuvor einem reduktiven Metabolismus durch HFM unterworfen wurde, wird eine andere Vorgehensweise gewählt. Erste Analysen der Proben zeigen, dass nur eine schwache Umsetzung stattgefunden hat, so dass in allen Proben IRI-Konzentrationen erwartet werden, die in gleicher Größenordnung und nahe der hohen Ursprungskonzentration liegen. Für diesen eng gefassten Arbeitsbereich wird über externe Kalibrierung in vierfacher Bestimmung ein KF für IRI gegenüber GLYC nach Fullscan-Messung ermittelt. Mit diesem KF von $0,68 \pm 0,10$ (Messwerte und Berechnung siehe Kapitel 2.4.3) kann so eine verlässliche Quantifizierung von IRI nach Inkubation mit HFM durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Isoflavongehalte in kommerziellen Präparaten

Die Analyse der NEM zeigt deutliche Unterschiede im Spektrum der enthaltenen IF wie auch in der chemischen Form ihres Vorliegens. In Soja werden die erwarteten drei Haupt-IF DAI, GEN und GLYC in vorwiegend glucosilierter Form gefunden, während in Rotklee-NEM neben einer Reihe weiterer IF FORM, BioA und IRI in vornehmlich freier Form vorliegen. Mit Blick auf eine verlässliche Analytik ist vor allem beim Rotklee das Fehlen hinreichend reiner Standardsubstanzen ein Problem. Die verwendeten KF der nicht kommerziell erhältlichen Substanzen wurden als Mittelwert der vorhandenen IF gesetzt. Bei den Aglyconen sind dies IRI, PRA und PBAP. Für IRI hat die nachträgliche Ermittlung des KF mit der dann erhältlichen Referenzsubstanz einen um etwa 30% höheren Wert ergeben, verglichen mit dem KF der zur Quantifizierung verwendet wurde. Es wird deutlich, dass in Anbetracht der um bis zu 15 nm unterschiedlichen UV-Absorptionsmaxima sowie unbekannter molarer Extinktionskoeffizienten dieser IF, das Ergebnis der Quantifizierung mit einer gewissen Vorsicht gewertet werden muss. Am grundsätzlichen Ergebnis, dass IRI quantitativ das drittbedeutendste IF in Rotklee ist, ändert dies allerdings nichts.

4.1.1 Sojapräparate

Vier sojabasierte NEM werden stellvertretend für eine Vielzahl von auf dem Markt befindlichen Produkten auf die Menge und Zusammensetzung der IF-Fraktion hin untersucht. Diese Analyse wird sowohl für einen Acetonitril-Extrakt wie auch nach enzymatischer Hydrolyse durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind dabei nahezu identisch. Um Aussagen zur ursprünglichen Zusammensetzung des Produktes treffen zu können und zur Vermeidung zusätzlicher Arbeitsschritte und somit auch Fehlerquellen, wird bevorzugt die Analyse des Extraktes ohne Hydrolyse diskutiert. Ferner sind diese Daten über eine Quantifizierung mittels ISTD ermittelt

worden und weisen insgesamt geringere Schwankungen auf als die nach enzymatischer Hydrolyse gewonnenen Werte.

Bei den Sojapräparaten werden stark dominierend die 7- β -D-Glucoside der IF DAI, GEN und GLYC gefunden. Zusätzlich werden die 6''-O-Acetyl- sowie 6''-O-Malonylglucoside detektiert. Freie Aglycone liegen in den Präparaten kaum vor.

Bezüglich der quantitativen Untersuchung der NEM zeigt sich in zwei Fällen eine gute Übereinstimmung der ermittelten Werte mit den vom Hersteller angegebenen Daten. In einem Fall liegt der IF-Gehalt aber nur bei etwa 50% der angegebenen Menge. Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch Nurmi et al., die eine größere Anzahl von Präparaten des finnischen Marktes untersuchten (Nurmi et al., 2002). Hier wird diskutiert, dass sich die Herstellerangabe auf den Gehalt an IF-Glucosiden beziehen könnte, was auch im Fall des Präparates Nr. 3 gut denkbar ist. Für das Präparat Nr. 4 wird seitens des Herstellers keine Angabe zum IF-Gehalt gemacht. Dies macht schon bei Betrachtung von nur vier stichprobenartig ausgewählten Soja-NEM auf zwei generelle Probleme aufmerksam:

1. Einige Hersteller geben den Gehalt an IF nicht an.
2. Wenn der Gehalt an IF deklariert ist, ist die Deklaration häufig missverständlich oder fehlerhaft.

4.1.2 Rotkleepräparate

Im Gegensatz zu den Sojapräparaten liegt in den Rotklee-NEM der weit überwiegende Teil der IF als Aglycone vor. Der relative Aglyconanteil schwankt dabei zwischen 76% (Präparat Nr. 3) und 98% (Präparat Nr. 7). Ebenso gibt es deutlich Unterschiede im Verteilungsmuster der IF. Diese Schwankungen zwischen den einzelnen Präparaten sind allerdings nicht unerwartet, da bereits bekannt ist, dass sowohl klimatische Faktoren (Wu et al., 2003) wie auch das Wachstumsstadium (Booth et al., 2006) einen deutlichen Einfluss auf das IF-Verteilungsmuster haben.

Bei den acht untersuchten NEM auf Rotkleebasis wird nur in zwei Fällen eine gute Übereinstimmung zwischen den analysierten Daten und der

Herstellerangabe festgestellt. In den Präparaten 1, 2 und 5 liegt der tatsächliche Gehalt zwischen 20% und 50% über dem angegebenen Wert. Eine Abweichung von 20% wie in Präparat Nr. 5 lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass hier von Seiten des Herstellers lediglich die beiden Haupt-IF BioA und FORM bestimmt sowie summiert und die gesamten Minor-IF vernachlässigt wurden. In diesem Präparat bilden die Haupt-IF in Summe 80% der gesamten IF-Menge, dies entspricht auch der Angabe auf der Verpackung. Für Präparat Nr.8 (Promensil) sind bereits Angaben über die enthaltene IF-Menge publiziert. Setchell et al. beschreiben einen Gehalt von 42 mg pro Kapsel (Setchell et al., 2001), dabei werden aber lediglich die Haupt-IF (hier DAI, GEN, BioA und FORM) aus Rotklee und Soja quantifiziert und die Minor-IF vernachlässigt. Addiert man zu den Daten von Setchell et al. die Minor-IF, die in diesem NEM nach eigenen Daten (siehe Tabelle 18) rund 12% des Gesamt-IF-Gehaltes ausmachen, erhält man einen Gehalt von 47 mg IF pro Kapsel, was gut mit dem hier festgestellten Wert von $49,7 \pm 1,7$ mg/Kapsel korrespondiert. Ein solcher Vergleich ist jedoch nur mit Vorsicht zu ziehen, da unterschiedliche Chargen analysiert wurden, und setzt voraus, dass ähnliches Ausgangsmaterial bei der NEM-Herstellung verwendet wurde.

Phytoestrogenhaltige NEM werden mit Aussagen beworben, welche dem Verbraucher Wirkungen suggerieren, die pharmazeutischer Natur sind. Dem steht die mißverständliche bis fehlerhafte Deklaration der IF als vermeintliche Wirkkomponenten, entgegen. Es wird weder angegeben, welche IF im Einzelnen enthalten sind, noch wird zwischen den enthaltenen Glucosiden und freien Aglyconen unterschieden. Weiterhin weicht in den Fällen, bei denen ein IF-Gesamtgehalt angegeben wird, dieser häufig um mehr als 20% vom tatsächlichen Gehalt ab. Aufgrund der aus *in vitro* und tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesenen zum Teil sehr unterschiedlichen physiologischen Wirkungen einzelner IF ist aber auch ein korrekt bestimmter Gesamtgehalt nicht ausreichend. Um die Unbedenklichkeit von Phytoestrogenpräparaten zu gewährleisten, wäre eine umfassende Prüfung der bioaktiven Inhaltsstoffe, analog des

Verfahrens, das für Arzneimittel vorgeschrieben ist, notwendig. Dies trifft auf rotkleebasierte Mittel im Besonderen zu, da Rotklee nicht Teil der üblichen menschlichen Nahrung ist. Dies unterscheidet Rotklee deutlich von Soja, denn im Falle von Rotklee gab zwar eine Verwendung in der sogenannten „Volksmedizin“, in der Tee und Auszüge aus Rotklee im Einzelfall als Mittel gegen Erkältungen oder Durchfall beschrieben werden (vergleiche Homepage "University of Michigan Health System"), eine Aufnahme der Pflanze über einen längeren Zeitraum im Sinne eines Lebensmittels kann indes nirgends belegt werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der IF in Wasser ist, wie Setchell und Mitarbeiter zeigen konnten, bei einem Tee zudem nicht von einer nennenswerten IF-Aufnahme auszugehen (Setchell et al., 2001).

4.2 Phase-I-Metabolismus von Irilon *in vitro*

Der oxidative Phase-I-Metabolismus von IRI wird durch mikrosomale Inkubationen mit unterschiedlichen MIKs und rekombinanten CYP-Enzymen untersucht. Dabei entsprechen die für IRI gebildeten Metabolite qualitativ dem erwarteten Spektrum. So werden im Fall von IRI mono- und dihydroxylierte Derivate gebildet, wie sie auch für andere bereits untersuchte IF beschrieben wurden (Kulling et al., 2001; Heinonen et al., 2004a; Morandi et al., 2005). Mit dem in Position C-3' hydroxylierten Produkt wird einer der aus sterischen Gründen begünstigten Metabolite identifiziert. Der zweite Metabolit ist sehr wahrscheinlich in Position C-8 hydroxyliert, eine definitive Absicherung mittels MS war aufgrund fehlender charakteristischer Fragmente nicht durchführbar. Daten zur Metabolisierung von IF, die über ein MDP-Strukturelement verfügen, fehlen bisher. Für andere Naturstoffe mit einer MDP-Gruppe wurde eine vergleichbare Ringöffnung unter Demethylierung beispielsweise von Kumagai et al. bei Sesamol (Kumagai et al., 1992) und Ioannides et al. bei Safrol (Ioannides et al., 1981) beschrieben. Diese kann auch für IRI gezeigt und das Produkt,

6-Hydroxy-GEN, durch MS-Analyse und Kochromatographie identifiziert werden.

Die Tatsache, dass für Sprague-Dawley- und Wistar-RLM keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auftreten, überrascht nicht, da dies den Ergebnissen aus *in vitro* wie *in vivo* Studien an anderen IF entspricht, für die keine Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Metabolisierung gefunden wurden (Heinonen et al., 2003; Rüfer et al., 2007).

Deutliche Unterschiede können jedoch im Profil der gebildeten Metabolite sowohl zwischen den verschiedenen RLM als auch besonders im Vergleich von RLM und HLM gefunden werden. Während für Sprague-Dawley-RLM keine Metabolitenbildung detektiert werden kann, zeigen Wistar- und Lewis-RLM die Bildung 3'-Hydroxy-IRI und 6-Hydroxy-GEN als Hauptmetabolite. Bei Inkubation mit HLM sind genau diese Metabolite nicht nachweisbar. Stattdessen wird 8-Hydroxy-IRI als einziges Produkt gefunden. Obwohl RLM in der Literatur häufig als Modellsystem für den humanen Metabolismus verwendet werden, muss für den Phase-I-Metabolismus von IRI festgestellt werden, dass RLM kein geeignetes Modell darstellen.

Von den untersuchten CYPs zeigt überraschend nur das Enzym 1A1 eine Aktivität zur Umsetzung von IRI. Durch CYP 1A1 werden dabei beide monohydroxylierten Derivate wie auch 6-Hydroxy-GEN in etwa gleichem Maße gebildet. Dies ist ungewöhnlich, da für den Metabolismus anderer IF durch rekombinante CYP-Enzyme zumeist nur ein dominierendes Produkt beschrieben ist (Hu et al., 2003). Dass CYP 1A1 als einziges untersuchtes CYP-Enzym eine Metabolitenbildung katalysiert, ist zudem interessant, da es vornehmlich extrahepatisch exprimiert wird und neben anderen Organen auch in den Darmenterocyten vorkommt (Roberts et al., 2004). Daher ist direkt nach der Resorption eine Metabolisierung von IRI durch dieses CYP möglich. Bei CYP 1A1 handelt es sich allerdings um ein nicht konstitutiv exprimiertes Enzym. Das bedeutet, dass eine verstärkte Bildung des Enzyms erst durch vorhandene Substrate induziert wird, so dass eine Metabolisierung von IRI ohne erfolgte Induktion langsamer

abläuft, als die Verstoffwechslung jener IF, die Substrate der konstitutiven CYPs sind.

Die Ergebnisse des CYP-Screenings können nicht erklären, warum HLM eine relativ hohe Aktivität im Bezug auf die Umsetzung von IRI zeigen. Obwohl mit den eingesetzten CYPs ein Großteil von etwa 70% der humanen hepatischen Enzyme abgedeckt wird (Shimada et al., 1994), ist keines dieser Enzyme gegenüber der IRI-Umsetzung aktiv. Zwar wurden die einzelnen CYPs nicht mit den jeweiligen spezifischen Substraten auf ihre Aktivität untersucht, die Tatsache, dass andere parallel untersuchte IF metabolisiert wurden, lässt aber auf eine grundsätzliche Funktionsfähigkeit schließen. Es muss folglich angenommen werden, dass unter den nicht betrachteten hepatischen Minor-CYPs noch weitere für die Umsetzung von IRI aktive Enzyme zu finden sind.

Ungewöhnlich ist die geringe Wiederfindung für IRI und seine Metabolite nach den mikrosomalen Umsetzungen. Aufgrund der UV-spektrometrischen Analyse über die Peakflächenanteile bei 260 nm ist die Berechnung der „Wiederfindung“ methodisch mit einem geringen Fehler behaftet. Die UV-Spektren von IRI und den Metaboliten sind aber zu ähnlich, um den hohen Substanzverlust an IRI erklären zu können. Da in den Kontrollwerten ohne Cosubstratzugabe die Wiederfindungen für IRI deutlich höher sind, muss eine Bindung angenommen werden, welche durch die reduzierte Form der CYPs in den MIKs ausgeübt wird. Für eine spezifische Bindung an das CYP-Protein spricht weiterhin, dass ein besonders ausgeprägter „Verlust“ auftritt, sobald in den Umsetzungen eine detektierbare Metabolitenbildung vorliegt. Dies ist für die anderen untersuchten IF BioA und FORM nur in geringem Maße der Fall. Am Beispiel der Umsetzungen mit RLM ist zu beobachten, dass bei den Sprague-Dawley-RLM, welche keine Metabolitenbildung für IRI zeigen, die Wiederfindung um 90% liegt, während sie für Wistar- und Lewis-RLM nur bei etwa 63% bzw. 71% liegt. Sowohl für BioA wie auch FORM ist im Gegensatz dazu in allen Fällen eine 85-98%ige Wiederfindung zu beobachten, unabhängig von der Intensität der Metabolitenbildung. Die

Untersuchungen mit den rekombinanten CYPs zeigen ein entsprechendes Ergebnis. Bei Umsetzung mit dem katalytisch sehr aktiven CYP 1A1 ist die Wiederfindung an IRI mit unter 70% gering, während bei den anderen CYPs, die IRI nicht metabolisieren, eine gute Wiederfindung detektierbar ist. Auch bei HLM, die IRI gut verstoffwechseln, zeigt sich eine geringe Wiederfindung. Im Gegensatz zu allen anderen Versuchen, führen für HLM auch die Inkubationen mit FORM und BioA zu verringerten Wiederfindungsraten im Vergleich zu den Kontrollinkubationen. Dieser Befund lässt sich nicht schlüssig erklären.

Bei der Umsetzung von IRI mit induzierten RLM ist die Wiederfindung so gering, dass IRI und die Metabolite fast vollständig „verschwinden“. Derartige Effekte wurden bisher für IF nicht beschrieben, aber die Resultate sprechen dafür, dass die Ausbildung eines Komplexes zwischen IRI und CYPs die Ursache der geringen Wiederfindung ist. Durch die Behandlung der Ratten mit Aroclor[®] enthalten die MIKs eine um bis zu vier Zehnerpotenzen höhere Konzentration vor allem an CYP 1A1 (Meredith et al., 2003), die dann zu einer verstärkten Bildung der MI-Komplexe (Kapitel 1.4.6) führen kann. Die Ausbildung eines MI-Komplex (siehe Abbildung 4) ist bereits für verschiedene andere Substanzen mit einem MDP-Strukturelement beschrieben (Murray, 2000; Usia et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass auch IRI, anders als die anderen bisher untersuchten IF ohne MDP-Strukturelement, zu der Ausbildung von einem MI-Komplex fähig ist. Geeignete Inkubationsbedingungen wurden durch das mitgeführte GLYC als Positivkontrolle sichergestellt. Qualitativ entspricht das für die Inkubation von GLYC mit induzierten RLM detektierte Metabolitenprofil sehr gut dem, welches bereits beschrieben wurde (Rüfer et al., 2007). Auch in den IRI-Kontrollinkubationen kommt es zu keinem „Verlust“ an eingesetztem Substrat, was mit Untersuchungen an anderen Substanzen mit einer MDP-Gruppe übereinstimmt, die eine Bindung an die CYPs nur in Anwesenheit von NADPH als Cosubstrat finden konnten (Schalk et al., 1998; Chatterjee and Franklin, 2003). Über die Relevanz der

MI-Komplexbildung durch IRI *in vivo* kann nur spekuliert werden. Die Tatsache, dass mit CYP 1A1 ein vornehmlich extrahepatisches Enzym diese Bindung einzugehen scheint, legt nahe, dass dies Enzym bereits im Gastrointestinaltrakt inaktiviert bzw. inhibiert werden könnte.

Verschiedene Autoren beschreiben ferner die Induktion einzelner CYPs durch Substanzen mit einem MDP-Strukturelement wie z.B. Safrol (Ioannides et al., 1981; Cook and Hodgson, 1985; Adams et al., 1993). Vor allem das Enzym 1A2 wird vermehrt durch MDP-Substanzen induziert, wohingegen 1A1 nicht beeinflusst wird (Lewandowski et al., 1990). Andererseits führt die irreversible Bindung von MDP-Substanzen an CYPs zu einer Hemmung dieser Enzyme (Ueng et al., 2005; Usia et al., 2005).

Grundsätzlich ist weder eine Induktion noch eine Inhibierung von CYPs als eindeutig positiv oder negativ zu bewerten. Bereits 1971 wurde für die MDP-Verbindung Piperonylbutoxid eine biphasische Modulierung der schädlichen Wirkung von Insektiziden auf Mäuse beschrieben. Bei gleichzeitiger Gabe von Piperonylbutoxid und dem Insektizid ist die akut toxische Wirkung verstärkt, wohingegen die toxische Wirkung 48 h nach der Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid deutlich gesenkt ist (Kamienski and Murphy, 1971). Insbesondere für nicht konstitutive CYPs wie 1A1 ist dieser Verlauf damit zu erklären, dass zunächst eine Enzymhemmung stattfindet, so dass eine Verstoffwechslung des Insektizids langsamer abläuft, mit einer zeitlichen Verzögerung von 48 h aber eine Induktion von CYP eintritt und so das Insektizid deutlich effektiver verstoffwechselt wird. Andererseits ist CYP 1A1 aber auch für die biologische Aktivierung von chemischen Kanzerogenen wie z.B. Benzo[a]pyren verantwortlich, so dass eine Induktion von diesem Enzym als ein Beitrag zur Giftung von Xenobiotika gesehen wird (Harrigan et al., 2006).

In der Literatur werden hemmende wie auch induzierende Effekte von Flavonoiden auf CYPs beschrieben. Insbesondere wird über eine mögliche krebspräventive Wirkung von jenen Substanzen spekuliert, die CYPs hemmen, die in ihrer aktiven Form Xenobiotika in toxische Verbindungen transformieren (Zhai et al., 1998). Dem gegenüber steht eine Studie, die

gerade das MDP-Strukturelement als Auslöser für eine Induktion von CYP-Enzymen in primären Rattenhepatozyten aus einer Reihe von untersuchten Substanzen ermittelt haben (Sidhu et al., 1998). In einem aktuellen Übersichtsartikel fasst Murray unter anderem auch die inhibitorischen Effekte von MDP-Verbindungen in der Nahrung auf die CYP-Aktivität zusammen (Murray, 2006). Sowohl *in vitro* wie auch im Rattenmodell ist eine Inhibierung von CYPs durch MDP-Verbindungen wie Safrol (Ronis et al., 2001; Ueng et al., 2005) oder Piperin (Velpandian et al., 2001) zu belegen. Detaillierte Daten über Interaktionen mit einzelnen CYPs fehlen allerdings noch weitgehend. Dennoch scheint die Tatsache, dass MDP-Verbindungen grundsätzlich in der Lage sind sowohl eine Enzym-Induktion wie auch eine Hemmung von CYP-Enzymen gleichermaßen verursachen zu können, gesichert (Murray, 2000). Auch sind sogenannte *drug-drug*-Interaktionen denkbar, d.h. IRI könnte durch seinen Einfluss auf das CYP-Spektrum auch das Wirkverhalten von Medikamenten verändern.

Die Untersuchung der Kinetik der Umsetzung von IRI mit CYP 1A1 zeigt einen leicht sigmoiden Verlauf bei der Auftragung nach Michaelis-Menten (Substratkonzentration gegen Aktivität aufgetragen) und gibt so einen Hinweis auf eine autoaktivierte Kinetik. Da aufgrund der geringen Wiederfindung nicht die gebildete Metabolitmenge, sondern die Abnahme des Substrates betrachtet wird, sind die errechneten enzymkinetischen Parameter nur als eine Näherung zu betrachten. Der sigmoide Kurvenverlauf bei Auftragung der Substratkonzentration gegen die Aktivität ist bereits für unterschiedliche CYP-katalysierte Reaktionen beschrieben worden (Korzekwa et al., 1998; Houston and Kenworthy, 2000). Der ermittelte Hill-Koeffizient als Maß für die Sigmoidität des kinetischen Verlaufes der Umsetzung von IRI durch CYP 1A1 liegt mit $n = 1,6$ relativ niedrig, was eine nur schwache Autoaktivierung anzeigt. Die weiteren ermittelten enzymkinetischen Kenndaten ($V_{\max} = 1,5 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $k = 8,6 \text{ } \mu\text{M}$) liegen sehr nah an denen, die für andere IF beschrieben sind. So finden z.B. Hu et al. für die durch

CYP 1A2 katalysierte Demethylierung von BioA zu GEN einen $k_m = 7,8 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 0,9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Hu et al., 2003). Ein direkter Vergleich der nach Michaelis-Menten verlaufenden Umsetzung, wie sie von Hu und Mitarbeitern beschrieben ist, mit der hier ermittelten schwach autoaktivierten Kinetik ist jedoch unzulässig. Da der Wert „ k “ als Maß der Enzymaffinität von CYP 1A1 gegenüber IRI relativ hoch liegt und zudem ein sigmoider Verlauf vorliegt, ist eine Vorhersage für physiologisch relevante Konzentrationen, die *in vivo* etwa eine Zehnerpotenz niedriger liegen, schwierig. Es muss aber von einer relativ geringen Umsetzung von IRI zu seinen Metaboliten ausgegangen werden.

Die Umsetzungen von BioA und FORM mit den CYPs und MIKs verlaufen für die Demethylierung als dominierende Reaktion sehr ähnlich. Für beide Substrate katalysieren alle eingesetzten Enzympräparationen diese Reaktion. Für **BioA** werden in einem Screening der CYPs 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 keine weiteren Metabolisierungsvorgänge neben der Demethylierung detektiert. CYP 2E1 zeigt für diese Reaktion aber eine deutlich höhere Aktivität als die anderen CYPs. Dies liegt in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tolleson et al., die für verschiedene Enzyme (hauptsächlich für die CYPs 1A2, 2C9, 2D6 und 2E1) zusätzlich zur Demethylierung aber auch eine Hydroxylierung detektieren konnten (Tolleson et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit kann auch die Bildung eines monohydroxylierten Metaboliten (aufgrund des Retentionsverhaltens sehr wahrscheinlich 3'-Hydroxy-BioA) durch CYP 1A1, das von Tolleson et al. nicht untersucht wurde, gefunden werden. Für CYP 2E1 ist allerdings keine Hydroxylierung von BioA wie sie von Hu et al. für die Umsetzung von GEN beschrieben wird (Hu et al., 2003), detektierbar. Im Gegensatz zu allen verwendeten MIKs und CYPs ist für die Inkubationen mit HLM eine geringe Gesamtwiederfindung erkennbar.

Für die Umsetzung von **FORM** wird für die CYPs 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 analog zu BioA ausschließlich eine Demethylierung zu DAI detektiert. Bei Inkubation mit CYP 1A1 bilden sich neben DAI mit den in Position C-6 und

C-3' hydroxylierten FORM-Derivaten zwei weitere Metabolite. Die Zuordnung der detektierten Peaks zu den beiden IF ist über einen Vergleich mit der Arbeit von Kulling aufgrund nahezu identischer chromatographischer Bedingungen möglich (Kulling, 2001).

Auch für den FORM-Metabolismus zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tolleson et al., die für die gleichen CYP-Enzyme teils zusätzlich eine Hydroxylierung detektieren konnten (Tolleson et al., 2002). Die eigenen Ergebnisse der Umsetzung mit den MIKs zeigt anders als für BioA in allen Fällen zusätzlich zu der Demethylierung auch in ähnlicher Intensität die Hydroxylierung in Position C-6. Im Gegensatz zu allen verwendeten MIKs und CYPs ist für die Inkubation mit HLM die Bildung des in C-8 hydroxylierten Metaboliten nachweisbar. Darüber hinaus ist bei der Umsetzung von FORM durch CYP 1A1 und HLM eine geringe Gesamtwiederfindung erkennbar.

Über die bisher bekannte hepatische Demethylierung hinaus (Tolleson et al., 2002), die hier bestätigt werden kann, zeigt CYP 1A1 eine starke Aktivität zur Umsetzung von BioA und FORM. Dies lässt schließen, dass eine oxidative Demethylierung direkt nach Resorption der IF im Dünndarm stattfindet, da CYP 1A1 in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben, in relativ hohem Maße auch intestinal, exprimiert werden kann (Nishimura et al., 2003). Dies bedeutet, dass für die in C-4'-Position methoxylierten IF zusätzlich zur reduktiven Demethylierung durch die Mikrobiota des Dickdarms ein zweiter Weg für diese Umwandlung vorliegt, bevor die Metabolite über die Pfortader zur Leber transportiert werden können. Dies erklärt gut, warum sowohl BioA als auch FORM - wenn überhaupt - nur in geringer Menge im Plasma detektiert werden. Dennoch zeigen die eigenen Daten (siehe Kapitel 3.5.1), dass auch eine Resorption der nicht verstoffwechselten IF stattfindet.

Im Zusammenhang mit den entstehenden IF-Metaboliten muss auch eine potenziell toxische Wirkung der Umsetzungsprodukte berücksichtigt werden, da insbesondere für IRI die Entstehung von 6-Hydroxy-GEN zu beobachten ist. Dieser Metabolit weist durch drei benachbarte phenolische

Hydroxygruppen eine Pyrogallol-Struktur auf, die als besonders reaktiv anzusehen ist. Als möglicher Wirkmechanismus von Catecholen kommt eine enzymatische Oxidation (z.B. durch Cytochrom P450-abhängige Oxidasen oder Peroxidasen) der vicinalen Hydroxylgruppen zum Semichinonradikal und *ortho*-Chinon in Frage. Derartige Reaktionen sind bereits für die catecholischen Metabolite von Estradiol (Roy and Liehr, 1999) sowie für einige Flavonoide wie z.B. Quercetin und Apigenin gezeigt worden (Metodiowa et al., 1998; Galati et al., 1999). Chinone können im „Redox-Cycling“, bei dem es sich um einen reversiblen Redoxprozeß handelt, wieder durch Reduktasen wie die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase oder die NADH-Cytochrom-b5-Reduktase zu einem Semichinonradikal reduziert werden. Dieses überträgt bei der sich anschließenden Autoxidation ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül. Dabei wird zum einen das Chinon regeneriert, zum anderen entsteht ein Superoxidradikalanion. Durch enzymatische und schwermetallkatalysierte Reaktionen werden andere reaktive Sauerstoffspezies, beispielsweise Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal, gebildet. Für die chinoiden Metabolite von Estradiol ist die Bildung von kovalenten DNA-Addukten sowie die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch „Redox-Cycling“ beschrieben worden (Roy and Liehr, 1999). Daher sind die chinoiden Metabolite als reaktive Metabolite zu sehen, deren Bildung und biologische Aktivität von hoher toxikologischer Relevanz ist.

Durch Coinkubation von IRI und FORM mit CYP 1A1 konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Beeinflussung der Umsetzung von FORM durch IRI vorliegt. Der direkte Vergleich der FORM-Inkubation mit und ohne IRI im Inkubationsansatz zeigt deutlich den Rückgang des Umsatzes von FORM um den Faktor vier bis sieben bei Coinkubation. Dies lässt sich nur damit erklären, dass die Affinität von IRI zum Enzym deutlich höher ist als jene von FORM oder dass CYP 1A1 durch IRI inhibiert wird und somit nicht mehr für die Umsetzung von FORM zur Verfügung stehen. Eine Beeinflussung der Umsetzung anderer Substrate durch IRI sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden, um Hinweise auf mögliche

drug-drug-Interaktionen zu bekommen. Die Beeinflussung des FORM-Metabolismus durch IRI kann auch für die Bewertung und Vergleichbarkeit von *in vitro* und *in vivo* Studien von Bedeutung sein. So könnte aus einer Inhibierung von CYPs durch IRI eine gesteigerte Plasmakonzentration von FORM nach Aufnahme eines kompletten Rotklee-NEM verglichen mit der isolierten Gabe von FORM resultieren.

Zusammenfassung des oxidativen Phase-I-Metabolismus der

Rotklee-Isoflavone

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die drei untersuchten Rotklee-IF einer teils intensiven Phase-I-Metabolisierung unterliegen. Im Falle von BioA wird in der Hauptsache GEN als Metabolit gebildet, während für FORM zusätzlich zum Demethylierungsprodukt DAI auch hydroxylierte FORM-Metabolite gebildet werden. IRI wird durch RLM zu 3'-Hydroxy-IRI und 6-Hydroxy-GEN verstoffwechselt, die Bildung dieser Metabolite wird durch HLM nicht katalysiert. Durch HLM findet ausschließlich die Hydroxylierung in Position C-8 statt. Auch für FORM wird durch die eingesetzten HLM eine deutlich stärkere Bildung des in Position C-8 hydroxylierten Metaboliten festgestellt, als dies für die RLM der Fall ist. Das für diese Umsetzung verantwortliche CYP-Enzym konnte nicht identifiziert werden. Die deutlichen Unterschiede im Metabolitenspektrum der untersuchten IF durch HLM und RLM zeigen, dass die Verwendung von RLM als *in vitro* Modell für den Humanmetabolismus nicht ideal ist.

Ferner ist bei den Umsetzungen von IRI für alle aktiven Enzymsuspensionen eine geringe Wiederfindung an Metaboliten, ausgelöst durch eine irreversible MI-Komplexbildung zwischen CYP-Enzym und MDP-Strukturelement, festzustellen. Diese Komplexbildung zeigt bei Coinkubation vermutlich auch einen Einfluss auf den Metabolismus anderer Substrate wie z.B. FORM. Ähnliche Effekte sind auch für andere Substanzen mit MDP-Strukturelement, wie z.B. Piperin (Velpandian et al., 2001) und Safrol (Adams et al., 1993), beschrieben und aus pharmakologischer und toxikologischer Sicht als nicht unkritisch zu beurteilen. Aufgrund von derartigen inhibitorischen Effekten kann es zu

verlangsamten Metabolisierungsraten auch für andere Xenobiotika oder Pharmazeutika kommen. Dies würde gegebenenfalls die Wirkweise von Medikamenten im Sinne einer „*drug-drug*“-Interaktion beeinflussen.

4.3 *In vitro* Phase-II-Metabolismus von Irilon

Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass IRI einer intensiven Umsetzung durch verschiedene UGTs und alle betrachteten MIKs unterliegt. Dabei werden beide möglichen Monoglucuronide, nicht aber Diglucuronide nachgewiesen. Bislang sind nur wenige Studien publiziert, die sich mit der Kinetik von IF-Glucuronidierungen befassen haben. Einzig die Gruppe um Chen und Wang hat für sechs ausgewählte IF die enzymkinetische Parameter der Umsetzung durch Leber- sowie Dünndarm-MIKs ermittelt (Chen et al., 2005b; Wang et al., 2006). In dieser Studie konnten signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Parametern der Glucuronidierungen der sechs IF sowie auch zwischen den unterschiedlichen verwendeten MIKs für ein und dasselbe Substrat gezeigt werden. Für V_{\max} konnten Werte zwischen $0,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (PRUN mit Rattenkolon-MIKs) und $3,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (GEN mit Ratten-MIKs aus dem Jejunum) sowie k_m -Werte zwischen $0,6 \text{ } \mu\text{M}$ und $13,0 \text{ } \mu\text{M}$ ermittelt werden. Die in dieser Arbeit ermittelten enzymkinetischen Parameter für die mikrosomale Umsetzung von IRI zu dem 5-O-Glucuronid liegen mit k_m -Werten zwischen ca. $10 \text{ } \mu\text{M}$ (HLM) und $34 \text{ } \mu\text{M}$ (RLM) sowie V_{\max} -Werten von etwa $0,26 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (SLM) bis $1,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (RLM) in einem ähnlichen Bereich. Die Bildung vom C-4'-Konjugat ist aufgrund der verzögerten Bildung nicht gut auswertbar und daher schlecht vergleichbar, tendenziell liegen die Werte aber ähnlich. Inwiefern die eigenen Daten überhaupt mit den genannten Literaturdaten vergleichbar sind, ist fraglich, da zwar der Proteingehalt der MIKs von den Autoren angegeben wird, aber keine weiteren Angaben über die Aktivität der Enzyme gemacht werden.

Die Intensität der Bildung der beiden Glucuronide durch die unterschiedlichen UGTs variiert stark, abhängig sowohl vom eingesetzten Enzym, wie auch von der gewählten Substratkonzentration. Der Ort der Glucuronidierung ist nicht näher einzugrenzen, da sowohl die Leber-MIKs und einzelne in der Leber exprimierte UGTs (hier 1A1 und 1A8) das Substrat umsetzen wie auch das UGT 1A10, das vornehmlich in Dünndarmgewebe vorhanden ist.

Bemerkenswert sind die großen Unterschiede in der Kinetik für die Bildung der beiden Glucuronide. Während für die Konjugation in Position C-5 überwiegend eine substratinhibierte Bildung zu detektieren ist, die bei hohen IRI-Konzentrationen durch einen deutlichen Abfall der Aktivität charakterisiert ist, ist für die Glucuronidierung in Position C-4' eine sigmoid verlaufende Autoaktivierungskinetik zu erkennen. Houston und Kenworthy haben 2000 genau dieses Problem für MIKs und rekombinante CYPs untersucht (Houston and Kenworthy, 2000) und konnten zeigen, dass eine Substrathemmung im niedrigen Konzentrationsbereich nur sehr geringe Auswirkungen auf die katalytische Effizienz hat. Ähnlich interpretieren dies auch Pfeiffer et al., die ein analoges Phänomen bei der Glucuronidierung von Estradiol und seinen catecholischen Metaboliten beschreiben (Pfeiffer et al., 2006). Sie vernachlässigen die Substratinhibition bei der Berechnung der Clearance und wenden die Berechnung für eine Michaelis-Menten-Kinetik an. Eine Autoaktivierung, wie sie ebenfalls von Pfeiffer et al. bei der Glucuronidierung von Estradiol durch HLM gezeigt wird, kann allerdings nur gemäß Formel (5) in Kapitel 6.1 beurteilt werden. Ebenso wird für RLM von Alkharfy und Frye bei der Umsetzung von Estradiol das Auftreten von zwei unterschiedlichen Kinetiken bei der Bildung von zwei Konjugaten aus einem Substrat beschrieben (Alkharfy and Frye, 2002). Sie konnten zeigen, dass die Konjugation an Position C-3 einer Autoaktivierung entspricht, während die Glucuronidierung in Position C-17 der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

Es ist für die vorliegenden Ergebnisse davon auszugehen, dass jene Produkte, deren Bildung einem sigmoiden Verlauf folgt, *in vivo* von geringer Bedeutung sind, da die Konzentrationen an Substrat, die für eine nennenswerte Bildung notwendig wären, selten erreicht werden. Dies betrifft in besonderem Maße das durch HLM und RLM gebildete C-4'-Glucuronid von IRI. Für die Bildung des C-5-Glucuronids kann ebenso angenommen werden, dass die inhibitorischen Effekte *in vivo* zu vernachlässigen sind, da diese weder für die UGTs noch für MIKs in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich auftreten. Mit Plasmakonzentrationen von über 5 μM ist bei normaler Ernährungsweise nicht zu rechnen, da von Richelle et al. (Richelle et al., 2002) sowie von King und Bursill (King and Bursill, 1998) einhellig eine maximale Plasmakonzentration von 4-5 μM Gesamt-IF nach Aufnahme einer „üblichen Dosis“ von etwa 1 mg IF pro kg Körpergewicht ermittelt wurde. Bei einer außerordentlich hohen Zufuhr von rund 10 mg GEN pro kg Körpergewicht konnten Maximalkonzentrationen von über 16 μM gefunden werden (Takimoto et al., 2003). Zwar gibt es noch keine gesicherten Erkenntnisse über die erreichbaren Plasmalevel für IRI, dennoch lassen die ebenfalls in dieser Arbeit präsentierten ersten Daten zur Bioverfügbarkeit den Schluss zu, dass durch Aufnahme von NEM auf Rotkleebasis keine Konzentrationsbereiche zu erwarten sind, die von einer Substratinhibition beeinflusst werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse zeigt sich noch ein weiteres methodisches Problem bei der Ermittlung und Auswertung enzymkinetischer Daten. Die gängigen Modelle zur Berechnung können nur unzureichend eine Umsetzung beschreiben, bei der aus einem Substrat zwei verschiedene Produkte entstehen. Für die drei Fälle, in denen genau ein Produkt entsteht (UGTs 1A7, 1A9 und 1A10), sind die Daten eindeutiger auswertbar und liegen für alle angewendeten Verfahren dicht beisammen. Dabei ist es unerheblich, in welcher Position IRI glucuronidiert wird. Dies legt den Schluss nahe, dass auch eine

gegenseitige Beeinflussung bei der Bildung von zwei Produkten in der gleichen Inkubation stattfindet.

Die Tatsache, dass UGT 1A1 und 1A8 erst ab relativ hohen IRI-Konzentrationen das C-4' konjugierte Produkt bilden, zeigt sehr gut, dass ein Ignorieren der atypischen Kinetik in diesen Fällen zu falschen Ergebnissen führt. Zwingt man die Daten in eine lineare Lineweaver-Burk-Darstellung, sind durchaus die enzymkinetischen Parameter k_m und V_{max} abzulesen. Sie stehen dann aber im deutlichen Widerspruch zu der realen Situation, denn die Substrataffinität für die Bildung des C-4'-Glucuronids ist rechnerisch höher als für das C-5-Glucuronid. Wäre das zutreffend, ist ein dominierendes Auftreten des C-5-Glucuronids schon bei geringer Substratkonzentration theoretisch nicht möglich. Ein vergleichbarer k_m -Wert kann für diese Autoaktivierungskinetik aufgrund des abweichenden Kurvenverlaufs nicht berechnet werden.

Interessant ist auch die unterschiedliche Intensität, mit welcher die SLM gegenüber HLM und RLM die beiden Glucuronide bilden. Hier wird deutlich, wie wenig vergleichbar Säugerspezies untereinander sind – selbst RLM, die häufig als *in vitro* Modell auch für den humanen Metabolismus Verwendung finden, weichen in den enzymkinetischen Parametern um den Faktor zwei von den erhaltenen Daten für HLM ab. Legt man die Erkenntnisse aus dem Übersichtsartikel von King und Mitarbeitern (King et al., 2000) zugrunde, wurden im Verlauf der Untersuchungen zum konjugativen Phase-II-Metabolismus hier alle relevanten UGTs auf ihre Aktivität gegenüber IRI überprüft. Damit sollte die Bildung des C-4'-Glucuronids durch HLM nahezu ausschließlich auf das UGT 1A1 zurückzuführen sein, da 1A10 nur extrahepatisch gebildet wird (Tukey and Strassburg, 2000) und die weiteren UGTs die Bildung dieses Konjugates nicht katalysieren. Ein humanes Isoenzym, das überwiegend das C-4'-Glucuronid bildet, konnte nicht gefunden werden. Damit lässt die dominierende Bildung dieses Produktes durch SLM nur zwei mögliche Schlussfolgerungen zu: entweder weist die Enzymausstattung von Schweinen eine ganz grundlegend unterschiedliche Aktivitäts- und

Affinitätsverteilung gegenüber IRI auf oder hier sind zusätzliche UGT-Enzyme vorhanden, die im Zuge dieser Studie nicht betrachtet wurden. Eine detaillierte Gegenüberstellung der Enzymausstattungen von Schwein und Mensch, die diese Frage beantwortet, ist jedoch nicht publiziert. In jedem Fall zeigt dieses Ergebnis aber, dass SLM als *in vitro* Modell für die Simulation des Phase-II-Metabolismus im Menschen ungeeignet sind.

Dass UGTs, insbesondere UGT 1A1, der Ratte und des Menschen Ähnlichkeiten in der Substratspezifität aufweisen, zeigen King et al. (King et al., 1996), die Glucuronidierungen mit verschiedenen Substraten aus den Substanzklassen der Estrogene, Flavonoide und anderer Verbindungen durchgeführt haben. UGT 1A1 beider Spezies zeigte auch eine ähnliche enzymatische Aktivität in Bezug auf die untersuchten Komponenten. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, die eine gute Vergleichbarkeit von RLM und HLM zeigen. Geringe Unterschiede sind indes immer zu erwarten und finden sich auch innerhalb einer Spezies, da die Enzymausstattung sowohl genetisch wie auch durch die individuellen Lebensumstände beeinflusst ist.

Von Bedeutung für eine Vorhersage der *in vivo* Metabolisierung von Xenobiotika ist vor allem die Cl_{int} sowie der Ort, an dem sich die entsprechenden Enzyme befinden. Für den Metabolismus von IRI lässt sich anhand der erhaltenen Ergebnisse davon ausgehen, dass eine größere Menge an aufgenommenen IRI direkt nach Resorption im Dünndarm durch die dort verorteten intestinalen Enzyme UGT 1A1 und 1A8 glucuronidiert wird. Generell sollte eine gute Konjugierbarkeit des IRI auch ohne vorgeschalteten Phase-I-Metabolismus vorliegen. Dies ist für die Soja-IF bereits grundsätzlich bekannt (Doerge et al., 2000; Shelnutt et al., 2002; Zhang et al., 2003). Daten zur Umsetzung von DAI oder GEN mit rekombinanten humanen UGTs liegen aber nicht vor, so dass ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nicht möglich ist. Insbesondere Wang et al. zeigen aber auf, dass keine gute Vergleichbarkeit von mikrosomalen *in vitro* Modellen mit der tatsächlichen

Ausscheidung von IF gegeben ist, da vor allem aktive Transportvorgänge außer Acht gelassen werden. Dennoch sind wertvolle Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen abzuleiten (Wang et al., 2006).

4.4 Reduktiver Metabolismus von Irlon

IRI wird nur in sehr geringem Maße durch HFM verstoffwechselt, wobei nur ein einziger Metabolit gebildet wird. Entsprechend der Strukturanalyse, die in Kapitel 3.8.3 dargestellt ist, wird dieser Metabolit durch GC-EI-MS- und HPLC-ESI(+)-MS-Untersuchungen eindeutig als DHI identifiziert. Nur drei der sieben FP zeigen eine nachweisbare DHI-Bildung. Nach den Inkubationen mit den anderen FP werden überhaupt keine Metabolite detektiert. Eine nachweisbare Bildung findet durch FP8 bereits innerhalb von vier Stunden Inkubationszeit statt und nimmt nach einer Inkubationszeit von acht Stunden nicht weiter zu. Bei FP7 und FP14 ist die DHI-Bildung sowohl mittels HPLC-ESI(+)-MS wie auch mittels GC-EI-MS erstmals in dem nach acht Stunden entnommenen Aliquoten detektierbar und zeigt im Verlauf der weiteren Inkubation ebenso keine weitere Zunahme der DHI-Konzentration. Wahrscheinlich ist in FP7 und FP14 die nach vier Stunden gebildete Menge an DHI so gering, dass sie nicht oberhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Bildung von DHI mit dem Inkubationsverlauf und das Fehlen des Metaboliten in den Kontrollen lassen keinen Zweifel daran, dass es sich bei DHI um einen durch die fäkale Mikroflora gebildeten IRI-Metaboliten handelt. Trotz der Bildung des Metaboliten bleibt die gemessene IRI-Konzentration im Verlauf der Inkubationen nahezu konstant. Infolge dessen ist die Quantifizierung nach HPLC-Trennung problematisch, da der Extrakt nach der Inkubation in sehr wenig Lösungsmittel aufgenommen wird, um den Metaboliten überhaupt detektieren zu können. In diesem geringen Volumen an Lösungsmittel ist die Grenze der Löslichkeit von IRI erreicht, was zu erheblichen Schwankungen bei den für IRI in HPLC-UV-ESI(+)-MS/MS detektierten Signalen führt. Aus diesem Grund wird IRI ausschließlich über GC-MS

bestimmt. Der Metabolit DHI ist nicht betroffen, und die Peakflächen zeigen nur geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IRI keiner nennswerten Verstoffwechslung durch HFM unterliegt. Damit unterscheidet sich IRI deutlich von allen anderen bisher untersuchten IF. So wird GEN als mitgeführte Positivkontrolle in den Inkubationen in hohem Maße umgesetzt und z.T. vollständig zu dem Hauptmetaboliten DHG, 6'-Hydroxy-*O*-desmethylangolensin und 2-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure umgesetzt. Dies entspricht den Ergebnissen von Coldham und Mitarbeitern (Coldham et al., 2002). Das Vorliegen von für die Umsetzung ungeeigneten Reaktionsbedingungen lässt sich somit als Ursache für den geringen Umsatz von IRI ausschließen.

Mit DHI entsteht durch reduktiven Metabolismus mit nur drei von sieben FP eine Substanz, die auch den Erwartungen entspricht. Für GEN als Kontrolle wird mit DHG ebenso ein Derivat, dessen Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 zur Einfachbindung reduziert wird, als Hauptmetabolit gebildet. Dies entspricht den Ergebnissen aus der Literatur, die für DAI und GEN aus Soja wie auch FORM und BioA aus Rotklee diese Hydrierung der ungesättigten Bindung als ersten Reduktionsschritt beschreiben (Kelly et al., 1993; Chang and Nair, 1995; Heinonen et al., 2004a). Die Tatsache, dass vier von sieben FP keine detektierbare Metabolitenbildung katalysieren sowie dass die drei anderen FP eine deutlich unterschiedliche Intensität der Bildung zeigen, deckt sich mit den interindividuellen Schwankungen, die bezüglich der Aktivität von HFM beispielweise von Atkinson et al. oder Heinonen et al. gezeigt wurden (Atkinson et al., 2004; Heinonen et al., 2004b). Eine genaue Quantifizierung des entstehenden DHI ist mangels Referenzsubstanz nicht möglich. Bezogen auf die Peakflächen in der GC-EI-MS-Analyse liegt die DHI-Konzentration aber bei maximal 0,5% des eingesetzten IRI. Für das strukturell ähnliche IF DAI findet im Gegensatz dazu eine intensive reduktive Umsetzung durch Mikroorganismen des Dickdarms statt, die mit einer Bioaktivierung einhergeht. Für die gebildeten reduktiven Metabolite,

allen voran das Isoflavan Equol, werden biologische Aktivitäten im Bezug auf die Rezeptoraffinität zu den Estrogenrezeptoren gefunden, die deutlich höher sind als die der Ausgangsverbindungen (Setchell et al., 2002c). Zusätzlich werden auch signifikante Unterschiede der durch die Reduktion im Heterozyklus neu entstandenen chiralen Isomere gezeigt (Setchell et al., 2002c). Zusätzlich konnte für DAI und Equol von Setchell und Mitarbeitern 2005 gezeigt werden, dass durch HFM nur das S-Enantiomer gebildet wird, welches auch die im Rezeptorassay estrogenwirksame Substanz darstellt (Setchell et al., 2005). Allerdings konnte in keinem bekannten Fall durch Reduktion eine Bioaktivierung detektiert werden, die so stark ist, dass eine so geringe physiologische Exposition, wie sie für DHI zu erwarten ist, einen biologischen Effekt haben sollte. Somit scheint es für IRI aufgrund der extrem geringen Bildungsintensität von DHI auch von untergeordneter Bedeutung zu sein, welches Enantiomer das dominierende ist.

4.5 *In vivo* Metabolismus nach Aufnahme eines Rotkleepräparates

Qualitative Auswertung

Die Untersuchung des verwendeten Rotkleepräparates zeigt, dass neben den bereits mittels HPLC-DAD-MS identifizierten IF weitere Minor-IF enthalten sind. Dies bestätigt die Daten von Tsao et al. und Polasek et al. (Polasek et al., 2006; Tsao et al., 2006), die bereits 3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF als Komponente benannt hatten, sowie von Klejdus und Wu et al. (Klejdus et al., 2001; Wu et al., 2003), die CALY und Konjugate als Rotkleeinhaltsstoffe beschreiben. Insbesondere CALY, welches bei den eigenen Untersuchungen der NEM mittels HPLC-DAD nur in Spuren detektiert wurde, war in der GC-EI-MS-Analyse deutlich besser nachweisbar. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass noch weitere IF enthalten sind. Besonderes Augenmerk gilt in diesem Zusammenhang den catecholischen IF wie 3',4',5,7-Tetrahydroxy-IF und 3',4',7-

Trihydroxy-IF, für die von Murata und Mitarbeitern ein DNA-schädigendes Potenzial beschrieben wurde (Murata et al., 2004). Zu einigen weiteren identifizierten tri- und tetra-hydroxylierten IF fehlen toxikologische Daten vollständig. Lehmann und Mitarbeiter konnten für in Position C-6 hydroxyliertes DAI eine geringere Genotoxizität zeigen als für das in C-3' hydroxylierte Derivat. Darüber hinaus geben mehrere Studien Grund zu der Annahme, dass vor allem eine Hydroxyfunktion in Position C-5 einen verstärkenden Einfluss auf genotoxische Eigenschaften von IF hat (Lehmann et al., 2005). Während derartige IF in Soja nur aus dem IF GEN hervorgehen und nicht als Metabolite von DAI entstehen (Kulling et al., 2002), zeigen unsere Untersuchungen an Rotklee(-präparaten) eine Vielzahl von Quellen für C-5 hydroxylierte IF. Ferner sind diese IF in relevanten Mengen auch im Plasma nach Resorption des NEM zu finden. Dass eine Assoziation von Genotoxizität und einer Hydroxylierung in Position C-5 nicht zwingend ist, zeigt aber die Studie von Tsutsui et al., die belegt, dass zwar von BioA und GEN, nicht aber von PRUN ein solcher Effekt ausgeht (Tsutsui et al., 2003). Letztlich scheint eine Untersuchung aller einzelnen Komponenten unumgänglich, um gesicherte Aussagen treffen zu können.

Die strukturelle Charakterisierung der Minor-IF gestaltet sich schwierig, da eine große Zahl an Stellungsisomeren denkbar ist. Daher ist eine sichere Zuordnung zu einer definierten chemischen Struktur nicht in allen Fällen möglich. Dennoch können über die Intensität des Auftretens sowie über Analogien zu bekannten Verbindungen Hinweise gewonnen werden. So kann für das sowohl im Präparat wie auch im Plasma auftretende Dihydroxy-methoxy-IF mit der Retentionszeit von 19,0 min in der GC-MS-Analyse zwar kein exaktes Substitutionsmuster angegeben werden, es kann aber für dieses IF-Derivat festgestellt werden, dass es im Plasma relativ gesehen stärker vertreten ist als im Präparat. Dies lässt vermuten, dass es zusätzlich zum natürlichen Vorkommen in Rotklee auch im humanen Metabolismus gebildet wird, da für IF mit einer Methoxyfunktion schon vor Resorption eine sehr weitgehende

Demethylierung im reduktiven Metabolismus zu erwarten ist. Als Bildungsweg ist eine durch die COMT katalysierte Methylierung eines catecholischen Vorläufers wahrscheinlich. Hier kommen die drei catecholischen 3',4',7-Trihydroxy-, 4',6,7-Trihydroxy- und 4',7,8-Trihydroxy-IF in Frage, die sowohl im Plasma als auch im Präparat gefunden wurden. Im Vergleich dazu ist CALY (3,7-Dihydroxy-4'-methoxy-IF) im NEM selbst noch deutlich vertreten, im Plasma dann aber kaum mehr nachweisbar. Die Gegenüberstellung dieser beiden Stellungsisomere macht deutlich, wie notwendig die Untersuchung von Bioverfügbarkeit und Metabolismus für eine Abschätzung der physiologischen Wirkung ist. Das Spektrum der IF, die tatsächlich die Zielgewebe im Körper erreichen, kann stark von dem abweichen, was im NEM vorliegt. Aufgrund der Dominanz des 3',4',7-Trihydroxy-IF, entsprechend der demethylierten Form von CALY, ist es wahrscheinlich, dass die COMT in „umgekehrter Richtung“ verstärkt zum in C-3' methylierten Derivat 4',7-Dihydroxy-3'-methoxy-IF umsetzt.

Anders als für diese beiden methylierten IF-Derivate stellt sich die Situation von FORM, BioA und PRUN dar. Die im Plasma detektierten Mengen können ausschließlich aus direkter Resorption resultieren, da eine Methylierung durch COMT nur bei vicinalen Hydroxyfunktionen stattfindet. Über das Verhältnis von BioA zu PRUN lässt sich ableiten, dass die Demethylierung in Position C-4' - also von BioA - gegenüber der Demethylierung in Position C-7 deutlich bevorzugt ist. Während im NEM noch die Konzentration von BioA deutlich überwiegt, kehrt sich dieses Verhältnis für die im Plasma detektierten Mengen um. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits beim Vergleich von Glycitin, FORM und BioA gemacht. Auch dieser zeigt, dass das Ausmaß einer Demethylierungsreaktion im Metabolismus stark von der Position der Methoxygruppe abhängt (Setchell et al., 2001). Allerdings wurde hier der Vergleich zwischen in Position C-4' methoxylierten IF und dem in Position C-6 methoxylierten und zusätzlich glucosylierten GLYC gezogen. Dennoch

zeigt sich eine deutlich bevorzugte Demethylierung in Position C-4' (Rüfer et al., 2007).

Die *in vitro* identifizierten monohydroxylierten IRI-Derivate entstehen nachweislich auch im Körper nach Aufnahme eines rotkleebasierten NEM. Die Absicherung der Identität von 3'- und 8-Hydroxy-IRI über den Retentionszeitvergleich mit den Phase-I-Umsetzungsprodukten von HLM und RLM mit IRI ist in diesem Fall notwendig, da der zweitgenannte Metabolit nur eine sehr geringe Signalintensität selbst im MS/MS-Experiment zeigt. Eine zuverlässige Identifizierung ausschließlich über das Fragmentierungsmuster in der Analyse des Plasmas ist hier nicht mehr durchführbar. Der Vergleich der Inkubationen von IRI mit HLM und RLM zeigt, dass sowohl durch HLM *in vitro* als auch in der Pilotstudie *in vivo* 3'-Hydroxy-IRI als oxidativer Metabolit dominiert, während durch RLM bevorzugt 8-Hydroxy-IRI gebildet wird. Über die *in vivo* Umsetzung von IRI zu dem durch Abspaltung der Methylendioxyfunktion entstehenden 4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF ist wenig aus der *in vivo* Studie abzuleiten. Der gleiche Metabolit entsteht beispielsweise auch aus BioA zunächst über eine Demethylierung durch mikrobielle oder Phase-I-Umsetzung und eine anschließende Monohydroxylierung durch CYP-Enzyme (Kulling et al., 2001).

Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der durchgeführten Pilotstudie mit sieben ProbandInnen umfasst die Haupt-IF BioA, FORM, IRI, GEN und DAI und gibt Auskunft über deren Plasmaspiegel sechs Stunden nach Aufnahme des Präparates. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist nur eingeschränkt möglich, da die Plasmaspiegel von Rotklee-IF bislang nur in zwei Studien beschrieben wurden (Setchell et al., 2001; Howes et al., 2002). Dabei handelt es sich bei der Studie von Howes et al. um eine Langzeitstudie mit einer täglichen Aufnahme von ca. 80 mg IF über 14 Tage, während die Untersuchung von Setchell et al. auf der einmaligen Gabe einer Kapsel Promensil (41,7 mg IF) an nur einen männlichen Probanden basiert.

Bei einmaliger Blutentnahme, wie sie von uns durchgeführt wurde, kann kein direkter Vergleich zum Maximalwert einer aufgenommenen Kinetik gezogen werden. Die Ergebnisse pharmakokinetischer Studien zeigen aber, dass die maximalen Plasmakonzentrationen von IF 3 bis 8 h nach Aufnahme erreicht werden (Setchell et al., 2001; Howes et al., 2002; Rüfer et al., 2008). Die Größenordnung unserer ermittelten Werte stimmt

Tabelle 37: Gegenüberstellung der eigenen ermittelten Plasmaisoflavongehalte mit den Studien von Howes (Howes et al., 2002) und Setchell (Setchell et al., 2001). „n.a.“: nicht analysiert, „C_{6h}“: Plasmakonzentration sechs Stunden nach Aufnahme, „C_{max}“: maximale gefundene Plasmakonzentration

Isoflavon		Eigene Studie (C _{6h})	Howes Studie (C _{max})	Setchell Proband (C _{max})
Formononetin	Plasmakonz. [nM]	111 ± 52	42 ± 7	9
	Aufnahme [mg]	37,8	31,4	14,3
BiochaninA	Plasmakonz. [nM]	14 ± 7	168 ± 18	18
	Aufnahme [mg]	17,4	52,4	23,7
Daidzein	Plasmakonz. [nM]	385 ± 144	248 ± 35	55
	Aufnahme [mg]	2,6	0,9	0,8
Genistein	Plasmakonz. [nM]	63 ± 22	422 ± 111	120
	Aufnahme [mg]	0,4	2,6	1,6
Irilon	Plasmakonz. [nM]	351 ± 156	n.a.	n.a.
	Aufnahme [mg]	7,6	n.a.	n.a.

mit den Ergebnissen der Howes-Studie überein, liegt allerdings im Schnitt um etwa Faktor drei über den Ergebnissen von Setchell. Dies zeigt Tabelle 37, dabei ist allerdings auch zu berücksichtigen, dass in den Studien von Howes und Setchell jeweils ein sehr BioA-reiches Präparat verwendet wurde, wohingegen in unserer Studie ein FORM-reiches verwendet wurde. In keiner der beiden Studien wurde IRI quantifiziert, so dass bis dato keine Literaturwerte zu diesem IF existieren.

Die eigenen Untersuchungen der Rotklee-NEM konnten bereits die starken Unterschiede im IF-Spektrum zwischen den auf dem Markt befindlichen Präparaten zeigen (siehe Kapitel 3.1.2). Der obige Vergleich der *in vivo* Untersuchungen zeigt noch einmal, dass diese Unterschiede folgerichtig auch deutliche Auswirkungen auf die IF-Verteilung im Plasma haben. Es kann angesichts der Gegensätze anhand der Untersuchung mit nur einem speziellen Präparat nicht von „dem Plasmaisoflavonspektrum“, das aus der Aufnahme von Rotklee-NEM resultiert, gesprochen werden.

Für die durchgeführten GC-MS-Untersuchungen wurde GLYC als interner Standard verwendet, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass GLYC in Plasmaproben per se nur in Spuren vorliegt. Dies war auch nicht anders zu erwarten, da bereits im Präparat selbst der GLYC-Gehalt mit etwa 0,6 mg pro Kapsel sehr gering ist und durch reduktiven Metabolismus durch Darmbakterien wie auch durch oxidativen Phase-I-Metabolismus ein Abbau zu 4',6,7-Trihydroxy-IF sowie Dihydro-GLYC stattfindet (Rüfer, 2005). Da sich selbst strukturell sehr ähnliche IF bei der Aufarbeitung anders verhalten können, als die Analyte, sollten bei Durchführung einer detaillierten Studie zur Resorption der Rotklee-IF aber deuterierte oder ¹³C-markierte Standards verwendet werden.

Folgerungen und Bewertung

Die Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit der Rotklee-IF gibt eine Momentaufnahme der im Plasma vorhandenen IF nach 6 h wieder. Zur Bestimmung der biokinetischen Daten und Metabolismuswege sind wiederholte Blutentnahmen über einen Zeitraum von mindestens 48 h notwendig. Der hier durchgeführte Vergleich des IF-Spektrums im Präparat mit der Zusammensetzung der IF-Fraktion im Plasma gibt aber einen ersten verlässlichen Hinweis auf die *in vivo* Situation beim Menschen unter vergleichsweise einfachen Versuchsbedingungen.

Zusammenfassend kann als gesichert angesehen werden dass zum einen IRI nach Aufnahme von Rotklee-NEM Plasmakonzentrationen erreicht, die denen der Haupt-IF entsprechen und somit auch von einer physiologischen Wirkung von IRI auszugehen ist. Zum anderen ist festzustellen, dass eine Vielzahl, häufig catecholischer IF im Plasma detektierbar ist, deren toxikologische Bewertung noch aussteht.

4.6 Estrogenes Potenzial der Rotkleeisoflavone

Die *in vitro* Untersuchungen zur Fähigkeit der Rotklee-IF an ER α zu binden zeigen deutlich, dass weder FORM, BioA noch IRI eine nennenswerte Bindungsaffinität haben. Selbst bei einer IF-Konzentration von 10 μ M

zeigen diese Substanzen nur eine schwache Verdrängung von Coumestrol aus der ER α -Bindung als Maß für ihre potenzielle estrogenische Wirkung. Sowohl GEN als auch Equol, die als Positivkontrollen mitgeführt wurden, zeigen bereits in einer Konzentration von 0,1 μ M eine Verdrängung von Coumestrol aus der Rezeptorbindung. Morito et al. zeigen, dass GEN eine wesentlich höhere Affinität zu ER α besitzt als FORM und BioA und erklären dies mit der Position der Hydroxyfunktionen von GEN in den Positionen C-4' und C-7 die einen sehr ähnlichen Abstand aufweisen, wie jene in Estradiol (Morito et al., 2002). Die Rotklee-IF die in Position C-4' methyliert sind, zeigen in dem von Morito et al. verwendeten Assay erst in einer um Faktor zehn bis 100 größerer Konzentration eine dem GEN vergleichbare Wirkung. Weiterhin zeigt die Studie, dass die Affinität der IF gegenüber ER β durchschnittlich um den Faktor fünf bis zehn größer ist als gegenüber ER α . Eine ER β -Bindungsstudie wurde für IRI allerdings bisher noch nicht durchgeführt. Für FORM und BioA wird von Kuiper et al. gezeigt, dass sie für keinen der beiden Rezeptoren eine Verdrängung des natürlichen Substrates bewirken (Kuiper et al., 1998). Auch für IRI ist aufgrund der fehlenden freien Hydroxygruppe in Position C-7 nicht davon auszugehen, dass eine nennenswerte Affinität zu ER β besteht.

Für die Minor-IF sowie die potenziellen Metabolite muss das estrogenische Potenzial separat untersucht werden. Insbesondere die Untersuchung der durch die intestinale Mikrobiota gebildeten reduktiven Derivate von FORM und BioA (Heinonen et al., 2004b), muss hier noch erfolgen. Der entsprechende DAI-Metabolit S-Equol besitzt eine hohe Estrogenität und wird daher als eine zentrale Ursache für die Wirksamkeit von IF-NEM diskutiert (Setchell et al., 2002a). Für die entsprechenden IRI-Derivate kann dies aufgrund des zu vernachlässigenden intestinalen mikrobiellen Metabolismus entfallen.

4.7 Isolierung von Isoflavonen aus *Iris germanica*-Extrakt

Für den verwendeten *Iris germanica*-Extrakt konnte mit Hilfe einer optimierten Säurehydrolyse eine schnelle und einfache Aufarbeitungsmethode etabliert werden, die eine anschließende semipräparative HPLC-Trennung sowie eine Isolierung im präparativen Maßstab mittels CCC ermöglicht. Die Spaltung der Glucoside mittels 2,75 M ethanolischer Salzsäure bietet gegenüber der Spaltung mit β -Glucosidase den Vorteil einer schnelleren Methode, die zudem leichter hoch zu skalieren ist. Für den vorliegenden Extrakt konnte ferner mittels gekoppelter HPLC- und GC-MS zweifelsfrei gezeigt werden, dass das 5-Methyl-IRI als einziges methyliertes IRI-Derivat vorliegt. Erst die Identifizierung und Isolierung dieser Verbindung ermöglichte die Zuordnung der Produkte des Phase-II-Metabolismus von IRI, wie er in Kapitel 3.3.2 beschrieben wird.

4.8 Strukturuntersuchungen mittels gekoppelter Massenspektrometrie

Durch die Verbindung von massenspektrometrischen Daten aus HPLC-ESI(+)-MS- und GC-EI-MS-Analysen konnten diverse IF-Derivate, die zumeist im Metabolismus entstehen oder bei denen es sich um zuvor nicht charakterisierte Inhaltsstoffe von Pflanzenextrakten handelt, zweifelsfrei identifiziert werden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits seit den 70er Jahren die GC-EI-MS in Verbindung mit spezifischen Fragmentierungsreaktionen der TMS-Ethergruppen zur Strukturanalyse von Naturstoffen genutzt (Horman and Viani, 1971; Smith and Djerassi, 1971). Der Einsatz von HPLC-ESI-MS zur Strukturcharakterisierung von Polyphenolen erfolgt ebenso bereits seit einem Jahrzehnt. Die Strukturanalyse durch MS ist jedoch letztlich dadurch limitiert, dass sich zumeist lediglich die Summenformel ableiten

lässt. Einige der beschriebenen charakteristischen Fragmentierungen erlauben darüber hinaus eine Aussage über spezielle Strukturelemente, die im Zielmolekül enthalten sind. Eine wirkliche Strukturaufklärung ist daher bei Anwendung einer einzelnen MS-Analysentechnik nicht möglich. Zusätzlich zu den durchgeführten massenspektrometrischen Analysen wäre natürlich die Aufnahme von NMR-Spektren wünschenswert, aber die dafür benötigte Reinheit und Menge an Substanz ist gerade bei Minor-Metaboliten häufig nicht zu erreichen. Dies ist ein weiterer großer Vorteil der Kombination zweier gekoppelter MS-Analysetechniken. In Konzentrationsbereichen, in denen bislang über ein einzelnes Verfahren vielfach nur eine Summenformel herausgefunden werden konnte, sind so durch die Kombination zweier unabhängiger Techniken auch ohne Aufreinigung und Aufkonzentrieren verlässliche Strukturanalysen möglich.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Metabolismus von Isoflavonen (IF) aus Rotklee sowie deren Vorkommen in Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) eingehend untersucht. Im besonderen Fokus stand die Biotransformation des IF Irlon (IRI), dessen Metabolismus zuvor in der Literatur noch keine Daten vorlagen.

Bei der Untersuchung von acht frei verkäuflichen NEM auf Rotkleebasis wurde ein Anteil an IRI zwischen 5% und 10% des Gesamtisoflavongehaltes festgestellt. Damit stellt IRI in diesen Produkten das am drittstärksten vertretene Isoflavon (IF) nach Formononetin (FORM) und BiochaninA (BioA) dar. Diese beiden Haupt-IF des Rotklees zeigen in ihrem Verhältnis zueinander starke Schwankungen, repräsentieren aber zusammen über 70% der enthaltenen IF. Dabei liegen in den Rotklee-NEM, anders als in den Präparaten auf Sojabasis, über drei Viertel der IF nicht als Zuckerkonjugate, sondern in Form der Aglycone vor.

In vitro Untersuchungen zum reduktiven Metabolismus durch die humane Mikrobiota zeigten, dass IRI sehr stabil gegenüber enzymatischer Umsetzung durch diese Mikroorganismen ist. So wurde nach Umsetzung mit acht Fäzesproben unterschiedlicher Spender keine nennenswerte Bildung eines Metaboliten, wie sie z.B. für Daidzein (DAI) gefunden.

Bei den *in vitro* Untersuchungen zum Phase-I-Metabolismus von IRI waren in allen Fällen ausgeprägte Substanzverluste zu beobachten, die sehr wahrscheinlich auf die Bildung von Metabolit-Intermediat (MI)-Komplexen mit den metabolisierenden Cytochrom-P450-Enzymen (CYP) zurückzuführen sind. MI-Komplexe mit CYPs sind für andere Substanzen mit MDP-Strukturelement bekannt. Als Phase-I-Metabolite von IRI wurden vor allem die in Position C-3' und C-8 monohydroxylierten Derivate sowie 6-Hydroxygenistein, das durch Öffnen der MDP-Struktur resultiert, identifiziert. Insbesondere letztgenannter Metabolit ist aufgrund seiner Pyrogallolstruktur als ein besonders reaktives Catechol zu betrachten,

welches durch „Redox-Cycling“ zu oxidativen Zellschäden führen könnte. Coinkubationen von IRI und FORM mit CYP 1A1 zeigen, dass eine deutliche Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus von FORM durch IRI stattfindet. So wurde die Umsetzung von FORM durch äquimolare Zugabe von IRI um 80% reduziert.

Mikrosomale Untersuchungen des Phase-II-Metabolismus zeigten, dass IRI in hohem Maße durch humane rekombinante Uridin-diphosphoglucuronyltransferasen (UGT) sowie durch Human-, Schweine- und Rattenlebermikrosomen zu ein bzw. zwei Glucuroniden umgesetzt wird. Dabei handelt es sich um die in Position C-4' und C-5 verknüpften β -O-Glucuronide, die enzymabhängig mit unterschiedlichen Kinetiken (substratinhibiert oder autoaktiviert) gebildet werden. Für alle Säugerleber-MIKs resultiert eine ähnliche intrinsische Clearance (Cl_{int}) zwischen 51 und 69 $mL \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$. IRI wird dabei insbesondere durch die UGT-Isoformen 1A1, 1A8, 1A9 und 1A10 umgesetzt. Hierbei wurde eine sehr hohe Aktivität auch für extrahepatische Isoformen wie 1A10 (Cl_{int} : 77 $mL \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$) und 1A8 (Cl_{int} : 19 $mL \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$) gezeigt. Somit ist von einer raschen Konjugation des aufgenommenen IRI auszugehen.

Die Bioverfügbarkeit von IRI wurde in einer Pilotstudie mit sieben Probanden untersucht. Hierbei wurden neben den Demethylierungsprodukten DAI und GEN der Hauptrotklee-IF ein, bezogen auf die aufgenommene Menge überproportional hoher Anteil an IRI im Blutplasma aller ProbandInnen detektiert. Der IRI-Gehalt des Plasmas nach Aufnahme der empfohlenen Tagesdosis eines handelsüblichen NEM lag bei über 0,3 μM , entsprechend einer Konzentration, die von den Haupt-IF DAI und Geinistein nach Aufnahme eines Soja-NEM erreicht wird.

Da IRI in einer initialen Rezeptorbindungsstudie an ER α nur eine sehr schwache Affinität zeigte, ist eine Bezeichnung von IRI als Phytoestrogen als fragwürdig anzusehen.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass Rotkleepräparate nur sehr eingeschränkt mit den besser untersuchten

Soja-NEM vergleichbar sind. Zwar bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass nach oraler Aufnahme in beiden Fällen dominierend DAI und GEN im Plasma vorliegen, allerdings wurde bislang IRI als „Minor-IF“ unterschätzt. Die biologischen Eigenschaften der Rotklee-IF unterscheiden sich, wie die Untersuchungen vor allem des Phase-I-Metabolismus von IRI zeigen, deutlich von anderen IF.

Folglich ist auch von einer anderen physiologischen Wirkung der Rotklee-NEM im Vergleich zu den Sojapräparaten auszugehen. Eine Einstufung als NEM ist kritisch zu sehen, da toxikologische Untersuchungen bis heute weitgehend fehlen und Rotklee auch nicht als gewöhnliches Lebensmittel verzehrt wird.

6. Anhang

6.1 Formeln

(1) Ermittlung eines Korrekturfaktors zur Quantifizierung mittels internen Standards:

$$KF(Analyt) = \frac{\text{area Analyt} \times c_{\text{ISTD}}(\text{ng/Ansatz})}{\text{area ISTD} \times c_{\text{Analyt}}(\text{ng/Ansatz})}$$

(2) Berechnung des CYP-P450-Gehaltes von Mikrosomensuspensionen

$$c(\text{CYP})[\text{nmol} / \text{mL}] = \frac{\Delta E_{450} - \Delta E_{490} \times VF}{\varepsilon \times d}$$

mit:

ΔE_{450} = Differenz der Extinktion des CYP-CO-Komplex zum freien CYP bei 450 nm

ΔE_{490} = Differenz der Extinktion des CYP-CO-Komplex zum freien CYP bei 490 nm

VF = Verdünnungsfaktor der MIK-Lösung

ε = Extinktionskoeffizient des CYP-CO-Komplex [$0,091 \text{ nmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke der Küvette

(3) Berechnung der Enzymaktivität (V):

$$V(\text{nmol} * \text{mg}^{-1} * \text{min}^{-1}) = \frac{n_{\text{Produkt}}(\text{nmol})}{\text{Enzymmenge}(\text{mg}) * \text{Inkubationszeit}(\text{min})}$$

(4) Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V_{\text{max}} * S}{k_m + S}$$

(5) Berechnung der maximalen Clearance bei autoaktivierter Kinetik:

$$Cl_{\text{max}} = \frac{V_{\text{max}}}{S_{50}} * \frac{(n-1)}{n * (n-1)^{\frac{1}{n}}}$$

(6) Stoffmenge des gebildeten Glucuronids (n_{Gluc}):

$$n_{Gluc} (nmol) = \frac{n_{Substrat} (nmol) * Fläche_{Glucuronid} (Skt)}{Fläche_{gesamt} (Skt)}$$

(7) Mathematische Anpassung einer autoaktivierten Kinetik:

$$V = \frac{V_{max} * S^n}{S_{50}^n + S^n}$$

(8) Mathematische Anpassung einer substratinhibierten Kinetik:

$$V = \frac{V_{max} * S}{k_m + S * (1 + \frac{S}{k_s})}$$

6.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Geräte

6.2.1 Chemikalien

1,4-Dithioreitol	Fluka
4-(Trifluoromethyl)umbelliferone-Glucuronid (4-MUG)	Sigma
7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (7-HFC)	Gentest, BD Biosciences
Acetonitril	Acros Organics
Alamethicin	Fluka, (≥90% HPLC)
Ameisensäure	Merck
Bovine Serum Albumine	Sigma
Chloroform	Merck
Coomasie Serva Blue G	Serva
Dichlormethan	Roth
Diethylether	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid	Fluka
Di-Natrium-EDTA*2H ₂ O	Merck
D-Saccharsäure-1,4-Lacton*H ₂ O	Sigma
Essigsäure (100%)	Roth
Ethanol	Merck
Ethylacetat	Fluka
Glycin	Merck
HEPES	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kohlenmonoxid	Linde
Magnesiumchlorid	Fluka
Methanol	Roth

NADPH	Roth
Natriumchlorid	Merck
n-Hexan	Merck
Phosphorsäure (85%)	Merck
Salzsäure (37%)	Merck
Schwefelsäure (95-97%)	Merck
Silyl 991 (BSTFA-TMCS: 99:1)	Machery-Nagel
TMCS	Lancaster
Triethylamin	Fluka
Triethylamin	Fluka
Trifluoressigsäure	Lancaster

Isoflavone/Isoflavanone

3',4',7-Trihydroxy-IF	APIN Chemicals
4',5,6,7-Tetrahydroxy-IF	Plantech
4',6,7-Trihydroxy-IF	APIN Chemicals
4',7,8-Trihydroxy-IF	Chess GmbH
Biochanin A	Fluka
Daidzein	LC-Laboratories
Dihydrodaidzein	Plantech
Dihydrogenistein	APIN Chemicals
Formononetin	Fluka
Genistein	LC-Laboratories
Irilon	Chromadex
Prunetin	Fluka
Pseudobaptigenin	Apin Chemicals

6.2.2 Enzyme

β -Glucuronidase (aus <i>Helix pomatia</i>)	Fluka Biochemica
β -Glucosidase (aus Mandeln)	Fluka Biochemka

6.2.3 Puffer und Medien

6.2.3.1 Mic-II Puffer

Komponenten des Mic-II Puffers

Einwaage	Substanz	Endkonzentration
5,96 g	HEPES	25 mM
558 mg	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	1,5 mM
154 mg	1,4-Dithiothreitol	1 mM
5,84 g	NaCl	100 mM

Die Feststoffe werden in Wasser gelöst, mit Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt und nach Zugabe von 115 mL Glycerin mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

6.2.3.2 Puffer und Reagenzien für die Phase-II-Umsetzungen

Phosphatpuffer (pH 7,4)

Eine 100 mM K_2HPO_4 -Lösung wird mit einer 100 mM KH_2PO_4 -Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Diese Lösung ist jeden Tag frisch anzusetzen.

Magnesiumchlorid, 0,1 M in bidestilliertem Wasser

Alamethicin (100 μ g/mL) in Methanol vorlösen und mit Phosphatpuffer auffüllen.

D-Saccharsäure-1,4-Lacton Monohydrat (Saccharo-Lacton), 100 mM in Phosphatpuffer

UDPGA-Natriumsalz, 4,0 mM in Phosphatpuffer

Glycin-HCl-Puffer (pH 1,2)

0,7 M Glycin in bidestilliertem Wasser, der pH-Wert wird mit 10 M HCl eingestellt

6.2.3.3 ST-Medium

ST-Medium (Gehalte angegeben pro Liter Medium):

9 g tryptisch verdautes Rindfleischpepton

1 g Proteosepepton

3 g Rindfleischextrakt

4 g Hefeextrakt

6 g Glucose

3 g NaCl

2 g Na_2HPO_4

0,5 mL Tween 80

0,25 g L-Cystein*HCl

0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

3,4 mg $MnSO_4 \cdot 2H_2O$

Das wässrige Medium wird im Anschluss an die Herstellung autoklaviert und hat einen pH-Wert von 6,8 bis 7,1.

6.2.3.4 Enzymatische Behandlung mit β -Glucosidase/ β -Glucuronidase

Zur Spaltung der IF-Glucoside aus pflanzlichem Ursprungsmaterial sowie der IF-Glucuronide aus Plasma werden folgende Enzymaufbereitungen suspendiert in Natriumacetatpuffer (0,15 M, pH 5,0) verwendet.

β -Glucosidase aus Mandeln, lyophilisiertes Puder, ≥ 6 U/mg

β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*, Type H-1, teilweise aufgereinigtes Puder, 498.800 U/g

6.2.4 Geräte

Für alle Probenvorbereitungen werden laborübliche Geräte verwendet, lediglich für die Plasmaaufarbeitungen der *in vivo* Probandenstudie werden silanisierte Glasgeräte verwendet. Die Verwendung von Kunststoffgefäßen kann aufgrund eines Restmonomergehaltes zu Problemen bei der abschließenden Silylierung für die gaschromatographische Analyse der Proben führen, und unbehandelte Glasgefäße zeigen häufig „aktive Stellen“, die zur Anhaftung von Probenmaterial führen können. Zur Silylierung wird eine 5%ige Lösung von Dimethyldichlorsilan in Toluol verwendet. Die zu passivierenden Glasgeräte werden mit dieser Lösung befüllt und über Nacht stehen gelassen. Im Anschluss werden sie entleert, mehrfach gründlich mit Toluol nachgespült und getrocknet.

6.3 Tabellen

Tabelle A1: Für die Quantifizierung der IF mittels UV-Detektion bei 260 nm ermittelte Korrekturfaktoren (KF) bezogen auf 4',5-Dihydroxy-7-methoxyflavon als internem Standard. Für grau hinterlegte, nicht kommerziell erhältliche Substanzen werden gemittelte KF angegeben.

Gruppe	Substanz	[M+H] ⁺	KF
Glucoside	Daidzin	417	0,76
	Glycitin	447	0,76
	Genistin	433	0,76
	Pseudobaptigenin-Glucosid	445	0,76
	Formononetin-Glucosid	431	0,76
	Irilon-Glucosid	461	0,76
	Bio A-Glucosid	447	0,76
	Prunetin-Glucosid	447	0,76
Acetylglucoside	Acetyldaidzin	459	1,07
	Acetylglycitin	489	0,91
	Acetylgenistin	475	0,54
	Formononetin-Acetylglucosid	473	0,84
	Irilon-Acetylglucosid	525	0,84
Malonylglucoside	Malonyldaidzin	503	0,84
	Malonylglycitin	533	0,84
	Malonylgenistin	519	0,84
Aglycone	Glycitein	285	0,58
	Daidzein	255	0,68
	Pratensein	301	0,49
	Pseudobaptigenin	283	0,49
	Formononetin	269	0,53
	Genistein	271	0,38
	Irilon	299	0,49
	Prunetin	285	0,41
	Bio A	285	0,38

Tabelle A2: Retentionszeiten in der HPLC-DAD-Analyse für die in den Präparaten identifizierten Isoflavone und Isoflavonkonjugate.

Peak Nr.	IF-Derivat	Retentionszeit
1	Daidzin	RT 10,3 min
2	Glycitin	RT 11,3 min
3	Genistin	RT 18,4 min
4	Pseudobaptigenin-Glucosid	RT 18,6 min
5	Malonyldaidzin	RT 20,1 min
6	Malonylglycitin	RT 20,8 min
7	Formononetin-Glucosid (Ononin)	RT 21,5 min
8	Acetyldaidzin	RT 23,8 min
9	Acetylglycitin	RT 25,2 min
10	Irilon-Glucosid	RT 28,9 min
11	Malonylgenistin	RT 29,2 min
12	BiochaninA-Glucosid	RT 32,7 min
13	Prunetin-Glucosid	RT 34,7 min
14	Acetylgenistin	RT 35,0 min
15	Glycitein	RT 36,9 min
16	Formononetin-Acetylglucosid	RT 36,9 min
17	Daidzein	RT 41,6 min
18	Irilon-Acetylglucosid	RT 43,8 min
19	Pseudobaptigenin	RT 54,6 min
20	Pratensein	RT 56,1 min
21	Formononetin	RT 57,1 min
22	Genistein	RT 57,6 min
23	Irilon	RT 59,1 min
24	Prunetin	RT 62,8 min
26	BiochaninA	RT 66,4 min

Tabelle A3: Ergebnisse der Inkubationen von Irilon (IRI) mit verschiedenen MIKs sowie CYP 1A1 (50 nmol/mL). Umsatzraten in [%] bezogen auf die Fläche von IRI im Kontrollwert. „nn“: Metabolit nicht nachweisbar

[%]	6-Hydroxy- GEN	3'-Hydroxy- IRI	8-Hydroxy- IRI	IRI	Summe
SD-RLM weibl.	nn -	nn -	nn -	93,7 (89,5- 99,3)	93,7 (89,5-99,3)
SD-RLM männl.	nn -	nn -	nn -	84,8 (79,1- 90,5)	84,8 (79,1-90,5)
WIS-RLM weibl.	1,5 (1,3-1,7)	1,8 (1,8-1,9)	nn -	61,6 (61,2- 62,7)	64,9 (64,3-66,3)
WIS-RLM männl.	1,4 (1,3-1,6)	1,5 (1,4-1,7)	nn -	57,7 (57,5- 58,5)	60,6 (60,4-61,5)
LEW-RLM männl.	1,7 (1,3-1,9)	6,7 (5,5-8,1)	nn -	63,1 (55,3- 67,7)	71,5 (62,7-77,1)
HLM	nn -	nn -	3,1 (2,9-3,2)	54,9 (47,8- 63,8)	58,0 (50,7-67,0)
CYP1A1	5,3 (2,0-7,1)	4,8 (0,5-8,6)	3,7 (3,5-4,2)	29,4 (24,6- 30,5)	43,3 (35,8-53,7)

Tabelle A4: Ergebnisse der Inkubationen von BioA mit verschiedenen MIKs sowie CYP 1A1 und 2E1 (50 nmol/mL). Umsatzraten in [%] bezogen auf die Fläche von BioA im Kontrollwert. „nn“: Metabolit nicht nachweisbar

[%]	BioA hydroxyliert	Genistein	Biochanin A	Summe
SD-RLM weibl.	nn	4,21 (2,76-5,04)	94,07 (88,14-99,79)	98,27 (90,90-104,83)
SD-RLM männl.	nn	4,97 (4,65-5,31)	84,73 (83,32-86,49)	89,7 (88,27-91,14)
WIS-RLM, weibl.	0,92 (0,88-0,95)	8,47 (7,53-9,23)	82,61 (73,13-89,38)	92,0 (81,59-99,55)
WIS-RLM männl.	0,69 (0,56-0,84)	8,68 (6,01-10,13)	75,78 (75,39-76,26)	85,15 (82,83-86,36)
LEW-RLM männl.	0,41 (0,25-0,49)	8,74 (8,33-9,36)	77,27 (72,47-80,23)	86,42 (81,05-90,07)
HLM	nn	20,68 (18,45-23,37)	38,78 (33,96-43,45)	59,46 (52,41-66,81)
CYP1A1	3,08 (2,77-3,41)	20,37 (19,75-20,78)	71,97 (70,24-75,09)	95,42 (93,11-99,07)
CYP2E1	nn	23,13 (21,11-24,79)	68,71 (66,30-72,44)	91,84 (87,41-95,93)

Tabelle A5: Ergebnisse der Inkubationen von FORM mit verschiedenen MIKs sowie CYP 1A1 und 2E1 (50 nmol/mL). Angaben in [%] bezogen auf die Kontrollwertfläche.

[%]	FORM M1 hydroxyliert	FORM M2 hydroxyliert	Daidzein	FORM M4 hydroxyliert	FORM	Summe
SD-RLM weibl.	0,35 (0,33-0,37)	0,34 (0,33-0,36)	1,86 (1,81-1,93)	1,49 (1,39-1,57)	88,42 (86,25-91,62)	92,46 (90,48-95,48)
SD-RLM männl.	nn	nn	2,23 (2,02-2,43)	1,45 (1,22-1,69)	83,59 (82,03-85,32)	87,28 (85,72-88,57)
WIS-RLM weibl.	nn	0,63 (0,59-0,69)	5,38 (4,79-5,91)	2,5 (2,11-2,79)	84,33 (79,72-87,15)	92,83 (87,55-95,77)
WIS-RLM männl.	0,5 (0,44-0,55)	0,51 (0,51-0,52)	6,63 (5,93-7,06)	2,94 (2,51-3,19)	82,92 (76,50-87,63)	93,49 (86,01-98,82)
LEW-RLM männl.	0,93 (0,71-1,31)	0,76 (0,68-0,90)	7,56 (6,92-8,64)	2,23 (1,90-2,42)	76,13 (75,18-77,04)	87,6 (86,91-88,80)
HLM	1,68 (0,75-2,50)	nn	13,64 (12,39-14,43)	8,6 (5,99-12,12)	51,62 (51,28-51,97)	75,53 (72,49-78,24)
CYP1A1	nn	2,9 (2,50-3,12)	22,38 (22,07-22,73)	4,63 (3,33-5,46)	37,32 (36,51-38,24)	67,23 (66,76-68,11)
CYP2E1	nn	nn	1,6 (1,59-1,60)	nn	97,98 (93,81-102,55)	99,59 (95,42-104,16)

Anhang

Tabelle A6: Ergebnisse der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit der Rotkleeisoflavone.

Verbindung	Retentionszeit [min]	m (IF)[ng/vial]	Vorläuferion [amu]	Tochterionenscan [amu]	area	Korrekturfaktor
FORM	20,8	50,0	340	170-340	829636	0,72
BioA	22,4	36,6	413	206-413	585786	0,69
DAI	23,5	63,5	398	199-398	1490520	1,01
GEN	24,7	50,0	471	235-471	1815821	1,57
IRI	27,3	48,0	427	213-427	473062	0,43
ISTD	30,6	48,1	428	214-428	1114097	1

Isosflavongehalte in den Plasmaproben

m (IF)[ng/Vial]

	Probandin 1	Probandin 2	Probandin 3	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
FORM	29,0	13,7	7,0	37,7	28,2	16,7	23,9
BioA	4,5	2,1	2,0	2,2	5,6	2,9	1,8
DAI	66,2	73,4	30,1	94,0	112,8	84,6	51,6
GEN	16,1	10,5	7,3	11,7	19,0	15,9	8,6
IRI	44,0	55,9	40,0	131,6	88,0	112,6	76,9

Plasmaisoflavongehalte in μM

	Probandin 1	Probandin 2	Probandin 3	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
FORM	0,144	0,068	0,034	0,187	0,140	0,083	0,119
BioA	0,021	0,010	0,009	0,010	0,026	0,014	0,008
DAI	0,347	0,385	0,158	0,493	0,592	0,444	0,271
GEN	0,079	0,052	0,036	0,058	0,094	0,079	0,043
IRI	0,197	0,250	0,179	0,589	0,394	0,504	0,344

	Ø weiblich		Ø männlich		Ø gesamt	
	c (IF) μM	$\pm \mu\text{M}$	c (IF) μM	$\pm \mu\text{M}$	c (IF) μM	$\pm \mu\text{M}$
FORM	0,082	0,056	0,132	0,044	0,111	0,052
BioA	0,013	0,007	0,015	0,008	0,014	0,007
DAI	0,297	0,122	0,450	0,134	0,385	0,144
GEN	0,056	0,022	0,068	0,023	0,063	0,021
IRI	0,209	0,037	0,458	0,110	0,351	0,156

Anhang

Tabelle A7: Übersicht über die mittels GC-EI-MS(/MS) erhaltenen Fragmentierungen. Die Werte in Klammern geben die relativen Intensitäten der Fragmente an. „n.d.“: Fragment wurde nicht detektiert.

Verbindung	[M]⁺	[M-15]⁺	rDA (A-ring / B-ring)	[M-88]⁺ / [M-15-88]⁺	[M-30]⁺ / [M-15-30]⁺
GEN	486 (n.d.)	471 (100)	296 (n.d.); 190 (<1)	398 (n.d.); 383 (n.d.)	456 (n.d.); 441 (n.d.)
DAI	398 (100)	383 (70)	208 (n.d.); 190 (2)	310 (<1); 295 (<1)	368 (n.d.); 359 (n.d.)
BioA	428 (n.d.)	413 (100)	296 (n.d.); 132 (n.d.)	340 (2); 325 (n.d.)	398 (7); 383 (<1)
FORM	340 (100)	325 (37)	208 (4); 132 (10)	252 (<1); 237 (1)	310 (4); 295 (1)
GLYC	428 (100)	413 (33)	238 (1); 190 (n.d.)	340 (n.d.); 325 (5)	398 (74); 383 (13)
IRI	442 (n.d.)	427 (100)	252 (<1); 190 (<1)	354 (1); 339 (n.d.)	412 (<1); 397 (1)
PRUN	428 (n.d.)	413 (100)	238 (n.d.); 190 (n.d.)	340 (2); 325 (n.d.)	398 (2); 383 (1)
6-Hydroxy-GEN	574 (n.d.)	559 (100)	296 (n.d.); 190 (n.d.)	486 (n.d.); 471 (16)	544 (n.d.); 529 (n.d.)
3'-Hydroxy-DAI	486 (100)	471 (92)	208 (n.d.); 278 (n.d.)	398 (9); 383 (12)	456 (1); 441 (<1)
6-Hydroxy-DAI	486 (100)	471 (70)	296 (3); 190 (n.d.)	398 (11); 383 (15)	456 (1); 441 (1)
8-Hydroxy-DAI	486 (100)	471 (88)	296 (2); 190 (n.d.)	398 (6); 383 (15)	456 (1); 441 (n.d.)
DHD					
Keto form	400 (6)	385 (5)	208 (1); 192 (100)	n.d.	370 (n.d.); 355 (n.d.)
Enol form	472 (30)	457 (46)	281 (100); 191 (5)	n.d.	442 (<1); 427 (<1)
DHG					
Keto form	488 (<1)	473 (34)	296 (100); 192 (6)	n.d.	458 (<1); 433 (n.d.)
Enol form	560 (46)	545 (19)	369 (100); 191 (2)	n.d.	530 (n.d.); 515 (n.d.)
red. IRI Metabolit					
Keto form	444 (2)	429 (93)	252 (100); 192 (10)	n.d.	414 (<1); 399 (1)
Enol form	516 (100)	501 (49)	325 (96); 191 (3)	n.d.	486 (<1); 471 (2)
ox. IRI Metabolit	530 (2)	515 (100)	340 (<1); 252 (<1)	442 (n.d.); 427 (6)	500 (1); 485 (1)

Tabelle A8: Für die GC-EI-MS-Analyse von IRI mit GLYC als internem Standard an zwei aufeinander folgenden Tagen ermittelte KF.

	Fläche IRI	Fläche GLYC	KF
27.10.07 - 16,0µg/mL IRI (a)	33467532	2493998	0,672
27.10.07 - 16,0µg/mL IRI (b)	26289105	1830224	0,720
27.10.07 - 80,0µg/mL IRI (a)	213842073	2392294	0,896
27.10.07 - 80,0µg/mL IRI (b)	219432861	2255708	0,975
Mittelwert		2243056	0,816
STABW		292024	0,143
rel. STABW in %		13,02	17,55

	Fläche IRI	Fläche GLYC	KF
28.10.07 - 16,0µg/mL IRI (a)	37726969	2869775	0,659
28.10.07 - 16,0µg/mL IRI (b)	37318006	2178428	0,858
28.10.07 - 80,0µg/mL IRI (a)	250788816	3431345	0,732
28.10.07 - 80,0µg/mL IRI (b)	237499123	2609465	0,912
Mittelwert		2772253	0,790
STABW		523781	0,116
rel. STABW in %		18,89	14,63

6.4 Ergänzende Abbildungen

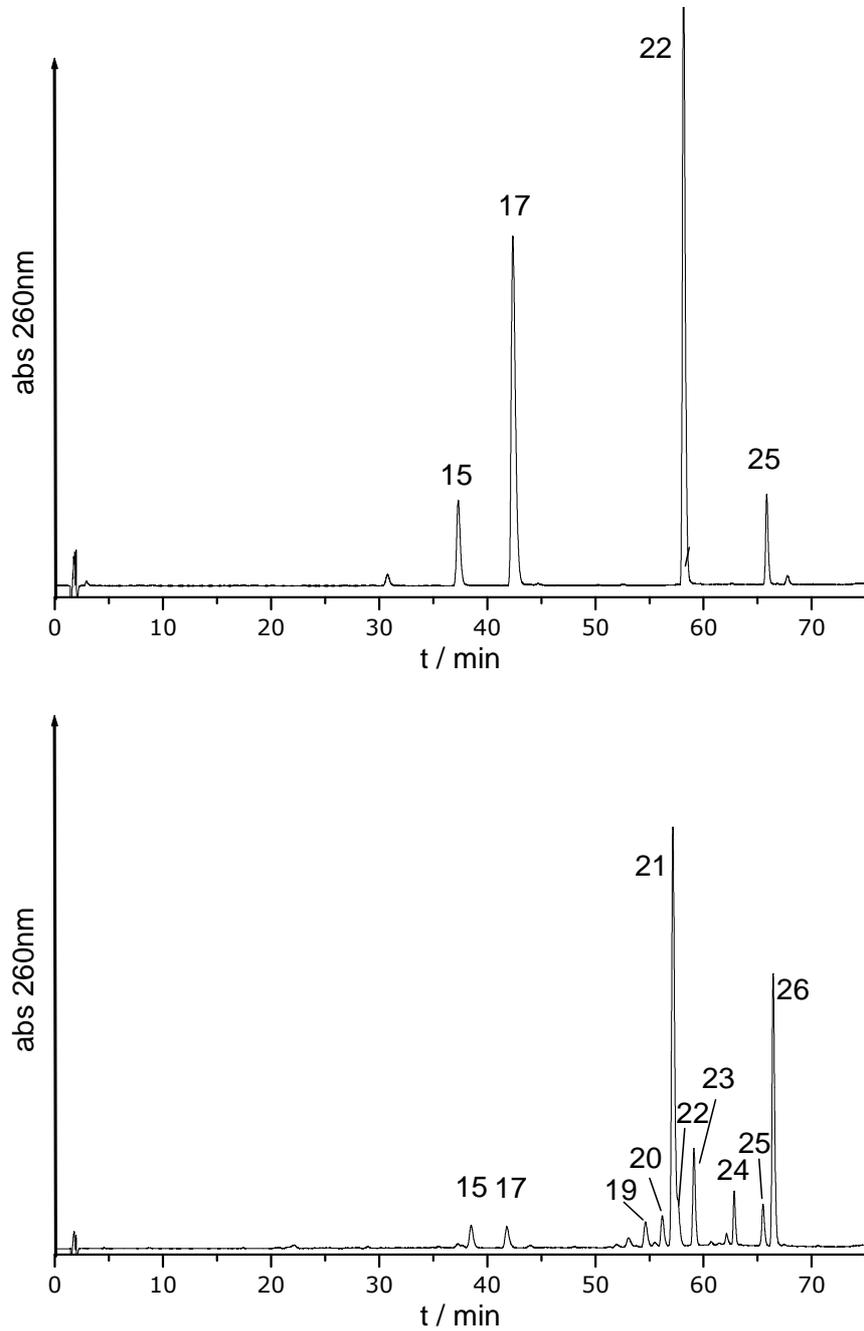


Abbildung A1: HPLC-DAD-Chromatogramme eines sojabasierten (oben) und eines rotkleebasierten (unten) NEM nach enzymatischer Hydrolyse. 15: Glycitein; 17: Daidzein; 19: Pseudobaptigenin; 20: Pratensein; 21: Formononetin; 22: Genistein; 23: Irlon; 24: Prunetin; 25: BiochaninA; 26: interner Standard

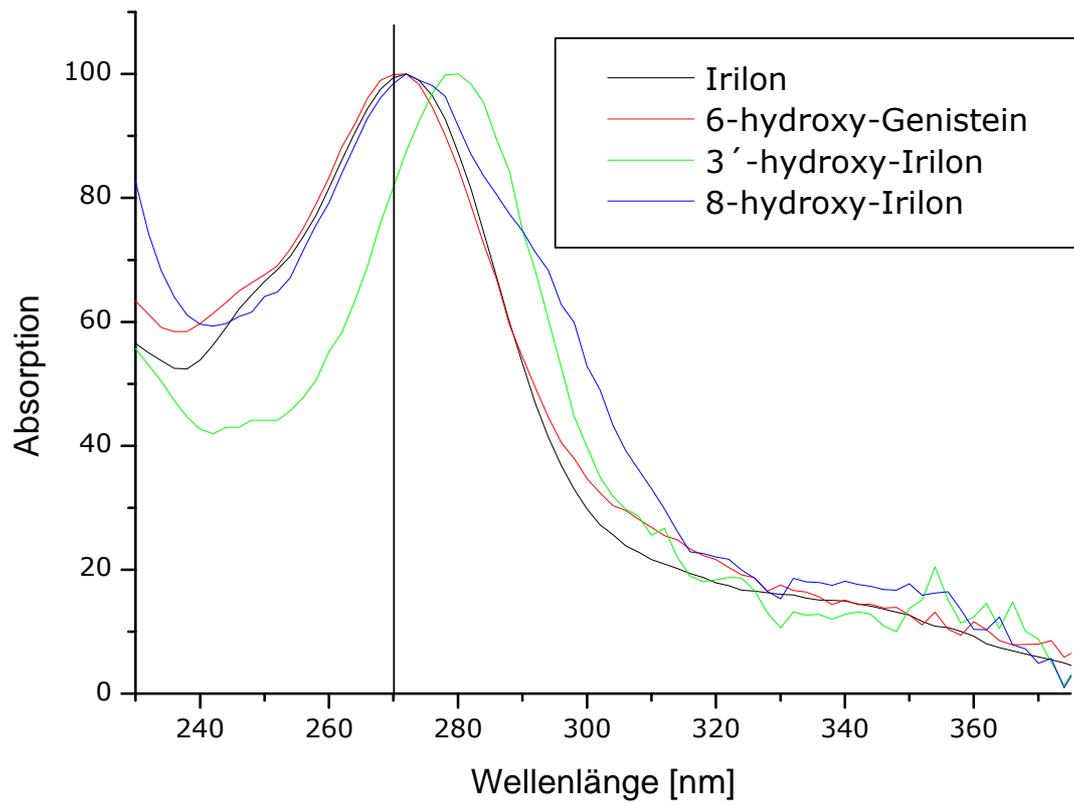


Abbildung A2: UV-Spektren der drei Hauptmetabolite der oxidativen Umsetzung von Irimon.

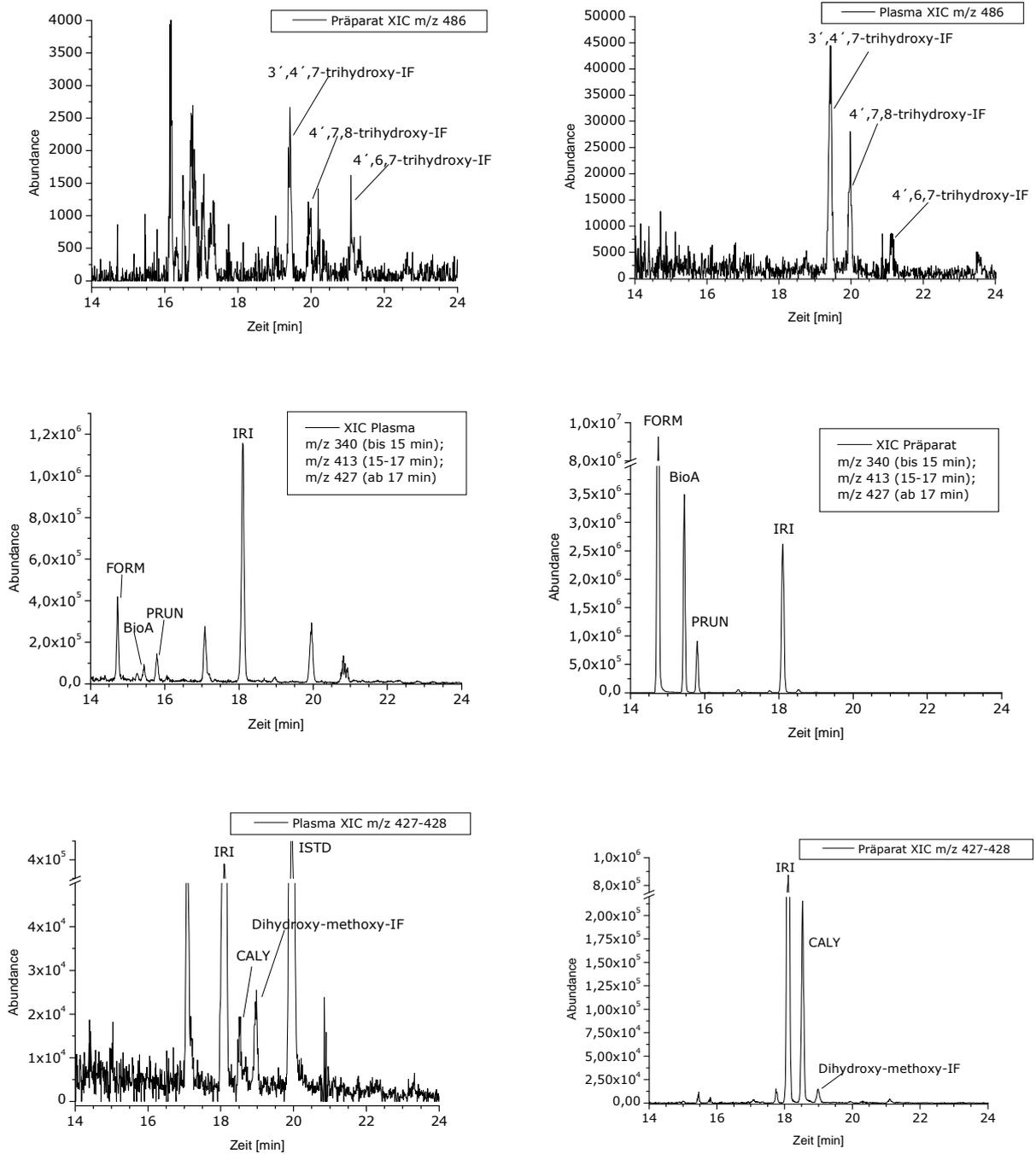


Abbildung A3: Gegenüberstellung der GC-MS Extracted-Ion-Chromatogramme (XIC) der verschiedenen Isoflavone im aufgenommenen Präparat und im Plasma.

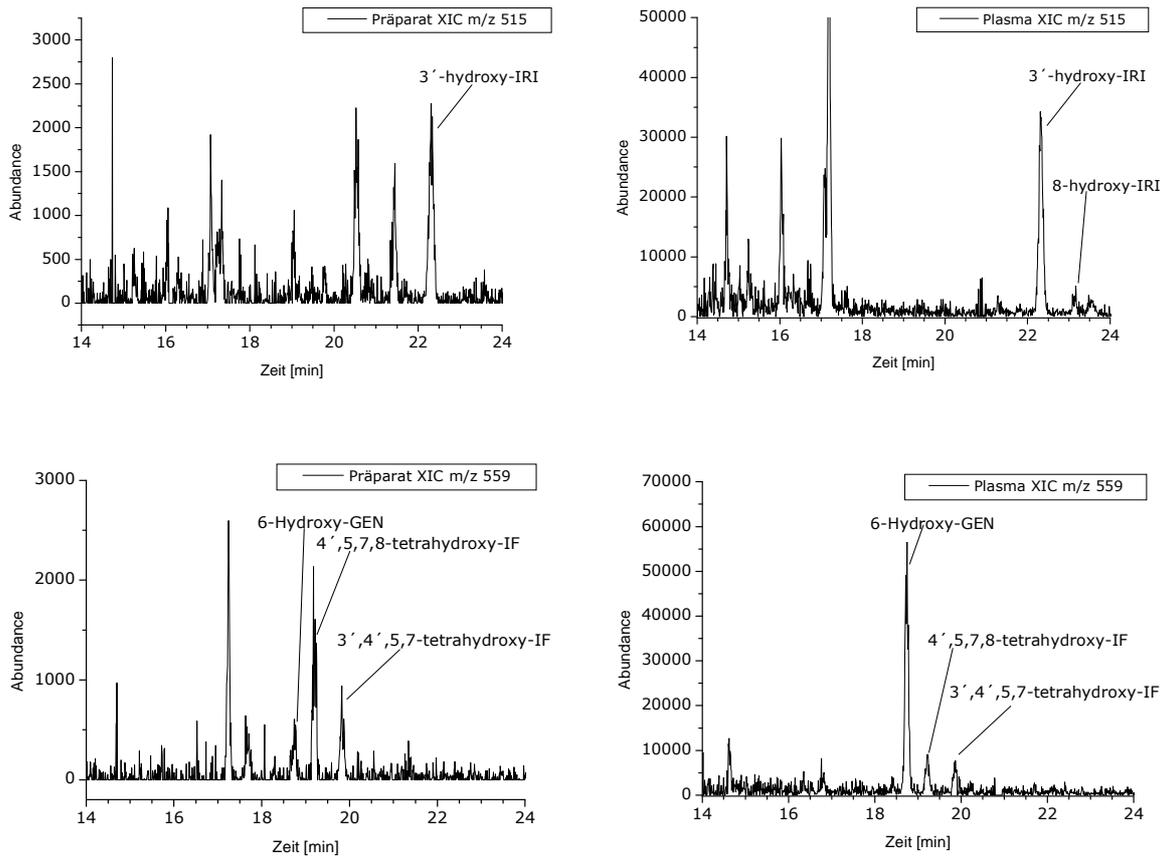


Abbildung A3 (Fortsetzung): Gegenüberstellung der GC-MS Extracted-Ion-Chromatogramme (XIC) der verschiedenen Isoflavone im aufgenommenen Präparat und im Plasma.

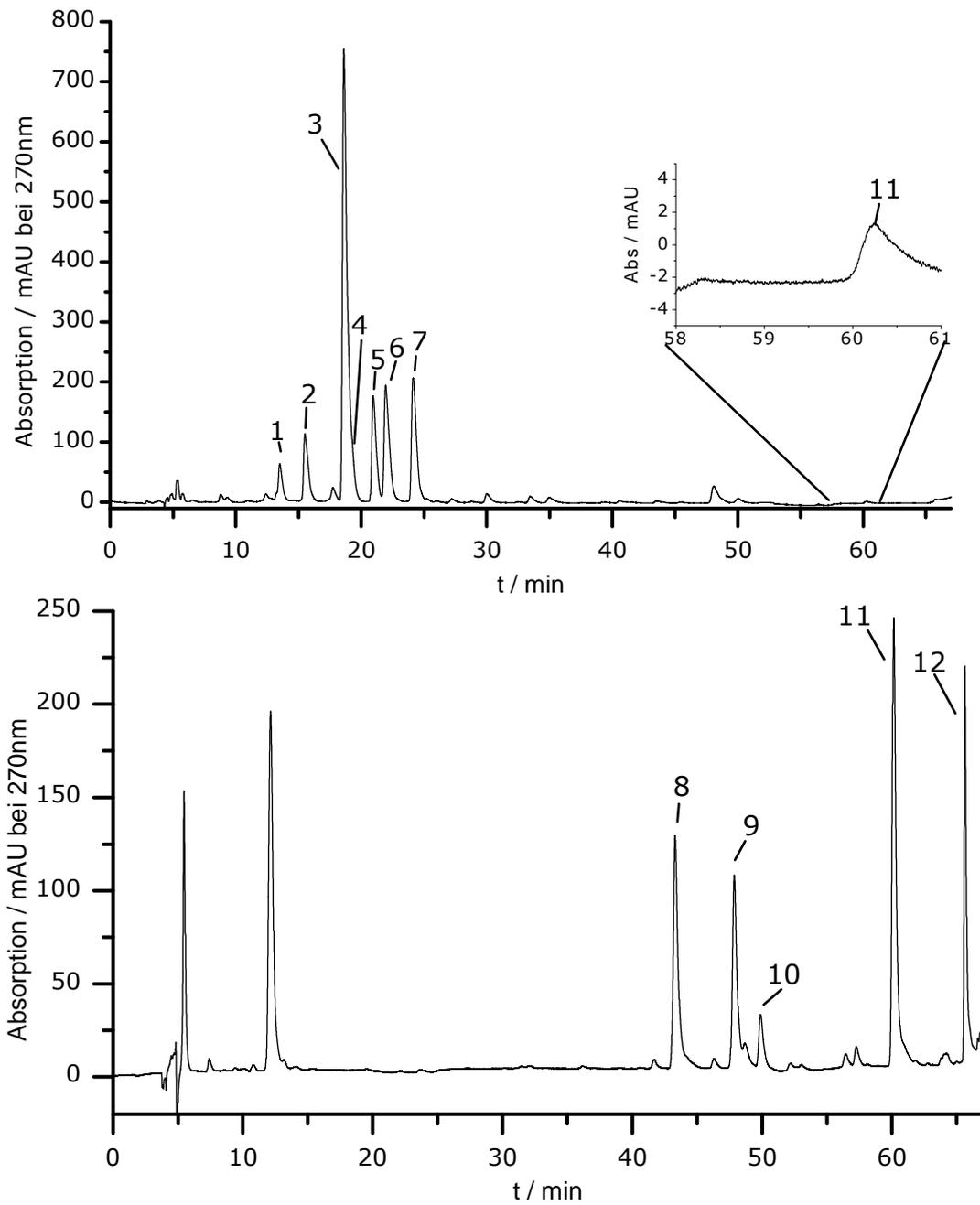


Abbildung A4: HPLC-UV-Chromatogramm des *Iris germanica*-Extraktes vor (oben) und nach (unten) Säurehydrolyse. Die Peaknummern beziehen sich auf Tabelle 34.

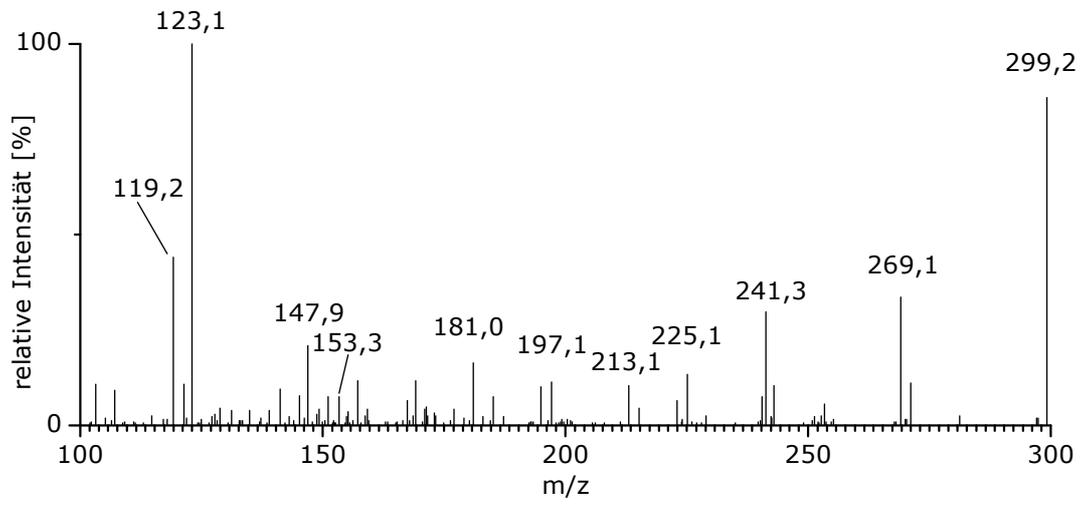


Abbildung A5: LC-ESI(+)-MS/MS-Spektrum von Irilon.

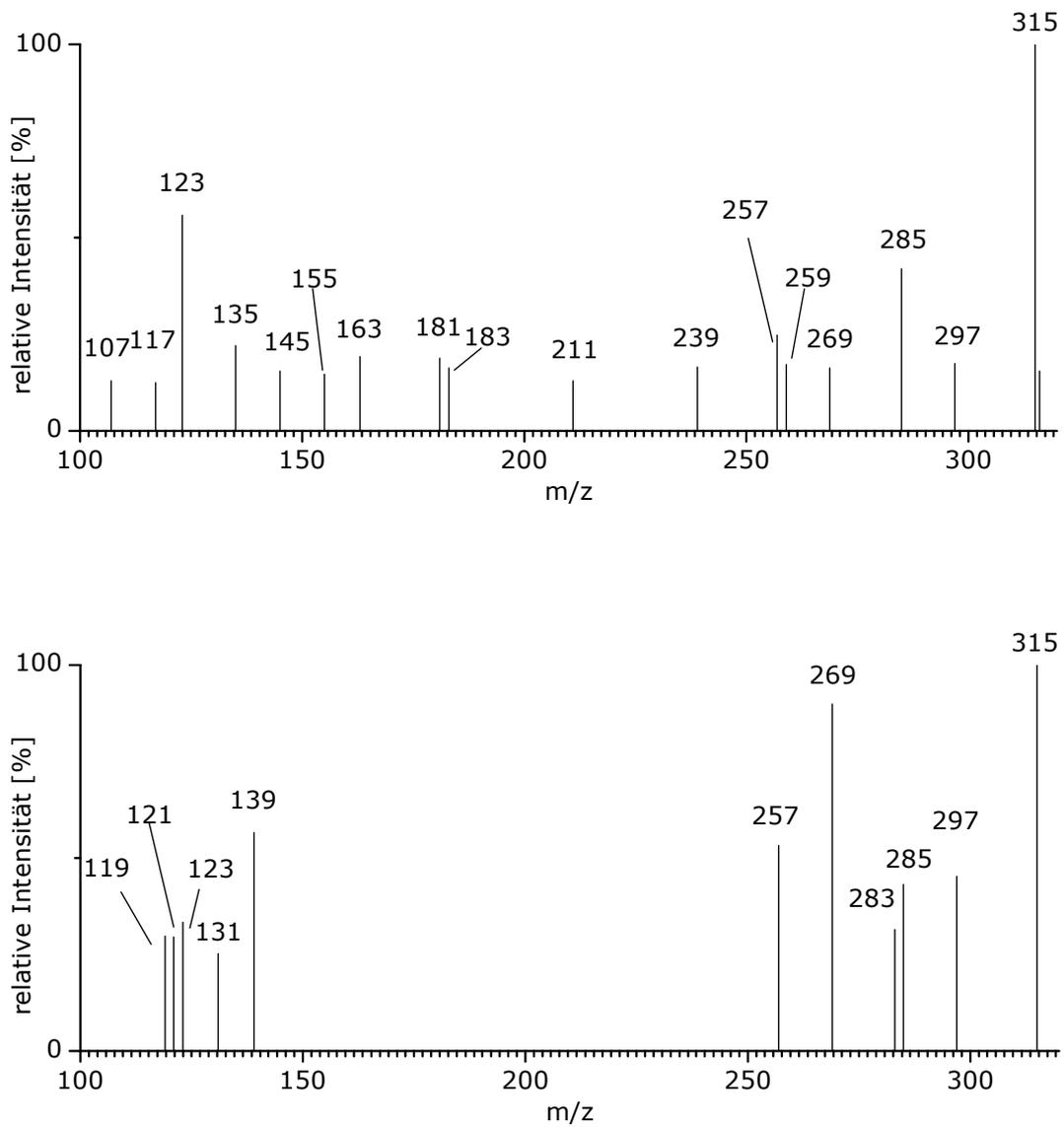


Abbildung A6: HPLC-ESI(+)-MS-Spektrum der oxidativen Irilonmetaboliten M2 (8-Hydroxyirilon, oben) und M3 (3'-Hydroxyirilon, unten).

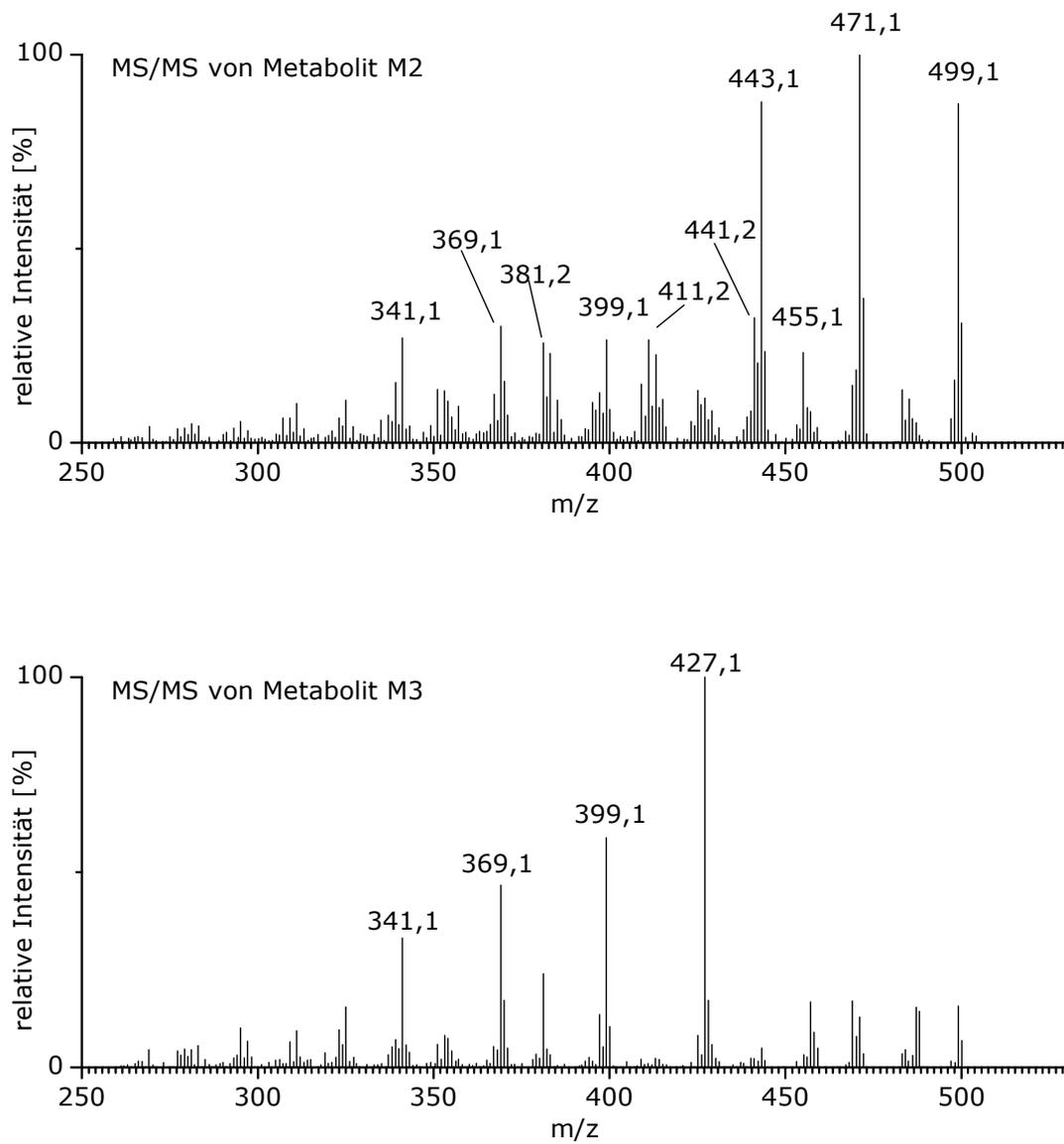


Abbildung A7: GC-EI-MS/MS-Spektrum der oxidativen Irilonmetaboliten M2 (8-Hydroxyirilon, oben) und M3 (3'-Hydroxyirilon, unten) mit dem gemeinsamen Mutterion mit $m/z = 515$.

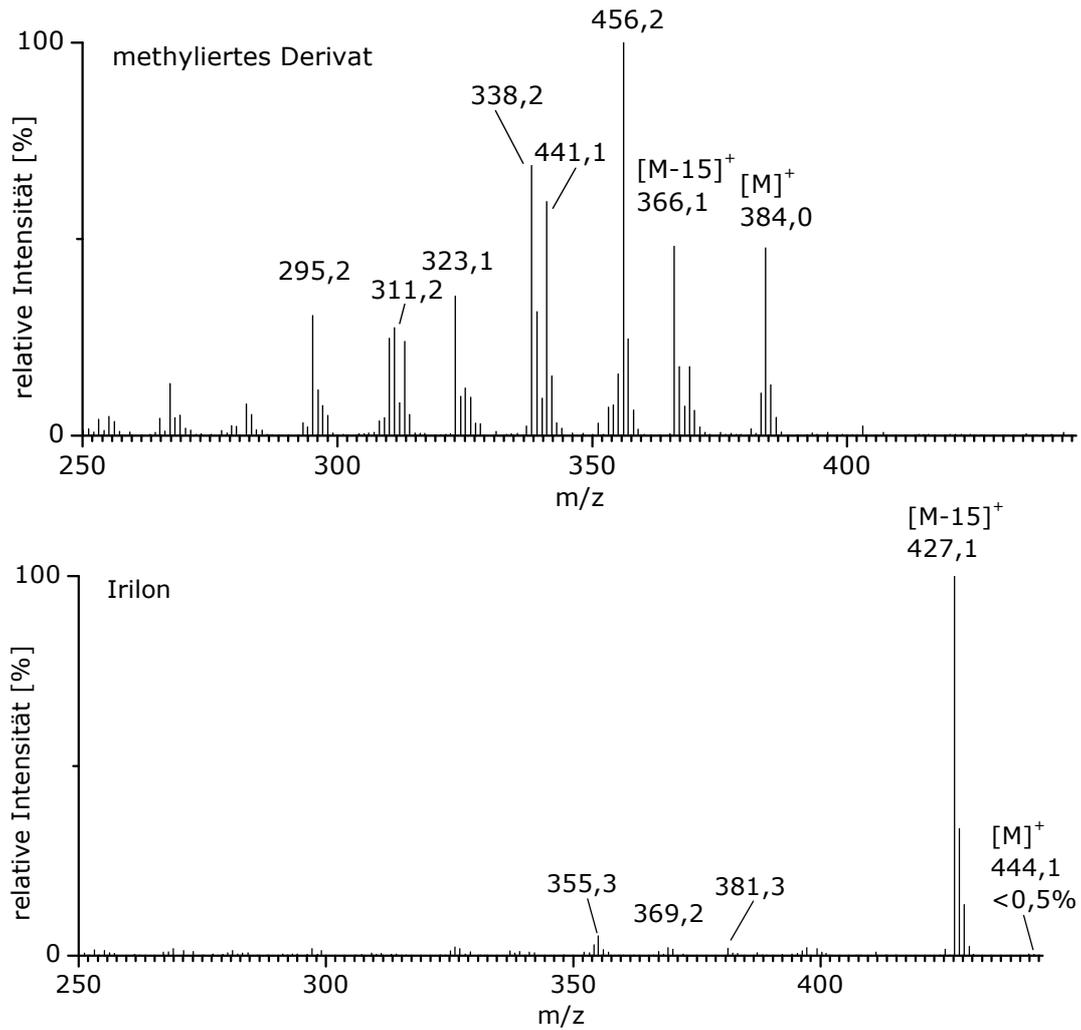


Abbildung A8: GC-EI-MS Spektren des methylierten Irilonmetaboliten (oben) sowie von Irilon (unten) in Fullscan Modus.

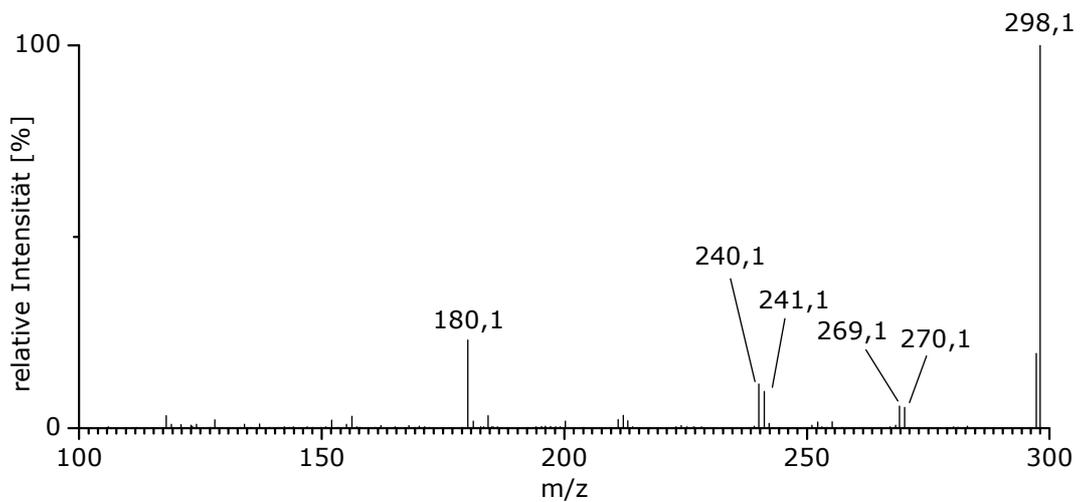


Abbildung A9: HPLC-ESI(+)-MS/MS-Spektrum des methylierten Irilonmetaboliten mit dem Vorläuferion [M]⁺ mit m/z = 313 amu

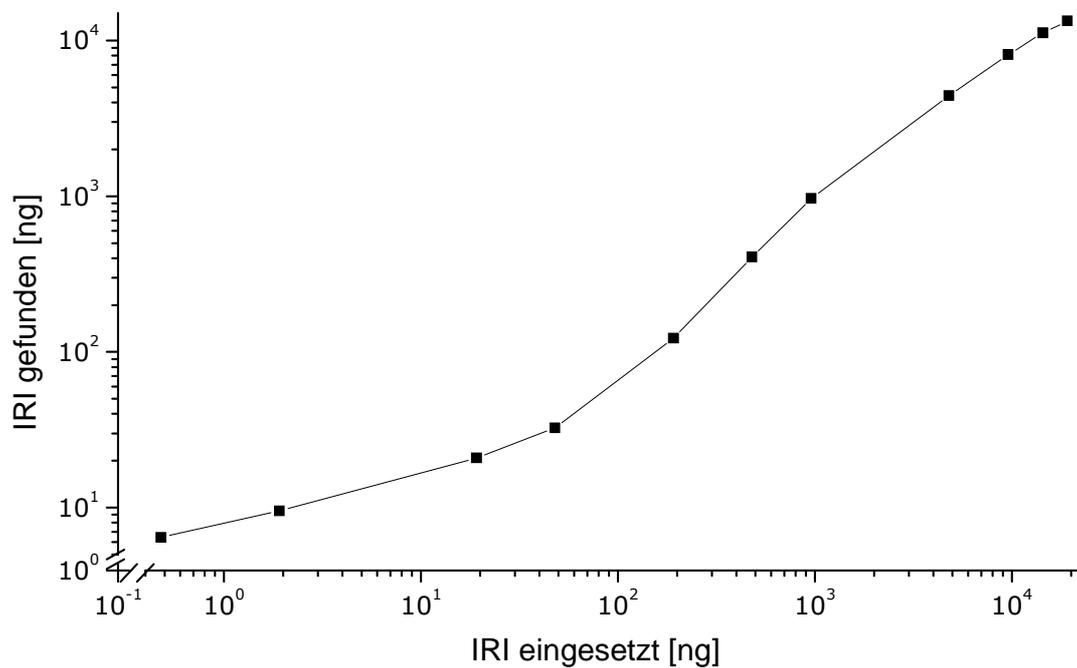
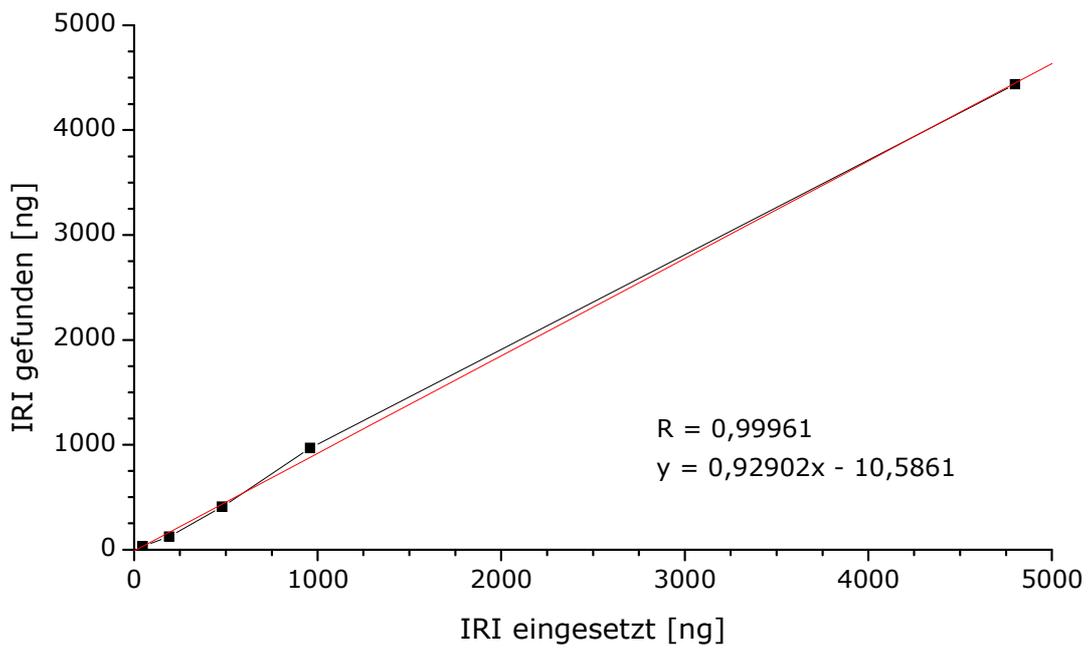


Abbildung A10: Wiederfindungsfunktionen von Irilon in der GC-EI-MS-Analyse. Linearer Bereich (oben) und logarithmische Auftragung des gesamten Arbeitsbereiches.

7. Literatur

- Adams NH, Levi PE and Hodgson E (1993) Differences in induction of three P450 isozymes by piperonyl butoxide, sesamex, safrole, and isosafrole. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **46**:15-26.
- Adlercreutz CHT, Goldin BR, Gorbach SL, Hoeckerstedt KAV, Watanabe S, Haemaelaeninen EK, Markkanen MH, Maekelae TH, Waehaelae KT and et al. (1995a) Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *Journal of Nutrition* **125**:1960.
- Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT, Jr. and Vickery LE (1993a) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **44**:147-153.
- Adlercreutz H, Markkanen H and Watanabe S (1993b) Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet FIELD Full Journal Title:Lancet* **342**:1209-1210.
- Adlercreutz H, van der Wildt J, Kinzel J, Attalla H, Waehaelae K, Maekelae T, Hase T and Fotsis T (1995b) Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **52**:97-103.
- Albertazzi P (2006) A review of non-hormonal options for the relief of menopausal symptoms. *Treatments in Endocrinology* **5**:101-113.
- Alkharfy KM and Frye RF (2002) Sensitive liquid chromatographic method using fluorescence detection for the determination of estradiol 3- and 17-glucuronides in rat and human liver microsomal incubations: formation kinetics. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **774**:33-38.
- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM and Helferich WG (2001) Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Research* **61**:5045-5050.
- Allred CD, Twaddle NC, Allred KF, Goepfinger TS, Churchwell MI, Ju YH, Helferich WG and Doerge DR (2005) Soy processing affects metabolism and disposition of dietary isoflavones in ovariectomized Balb/c mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:8542-8550.
- Arora A, Nair MG and Strasburg GM (1998) Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**:133-141.
- Atkinson C, Berman S, Humbert O and Lampe JW (2004) In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *Journal of Nutrition* **134**:596-599.
- Atkinson C, Frankenfeld CL and Lampe JW (2005) Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental Biology and Medicine* **230**:155-170.

- Atta Ur R, Nasim S, Baig I, Ara Jahan I, Sener B, Orhan I and Choudhary MI (2002) Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **50**:1100-1102.
- Atta Ur R, Nasim S, Baig I, Jalil S, Orhan I, Sener B and Choudhary MI (2003) Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology* **86**:177-180.
- Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L and Coward A (1998) Phyto-oestrogens: Where are we now? *British Journal of Nutrition* **79**:393-406.
- Bisswanger H (2000) Enzymkinetik, Theorie und Methoden. **3. Auflage**.
- Bloedon LeAnne T, Jeffcoat AR, Lopaczynski W, Schell Michael J, Black Tracy M, Dix Kelly J, Thomas Brian F, Albright C, Busby Marjorie G, Crowell James A and Zeisel Steven H (2002) Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *American journal of clinical nutrition* **76**:1126-1137.
- Bokkenheuser VD and Winter J (1988) Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. *Progress in Clinical and Biological Research* **280**:143-145.
- Booth NL, Overk CR, Yao P, Totura S, Deng Y, Hedayat AS, Bolton JL, Pauli GF and Farnsworth NR (2006) Seasonal Variation of Red Clover (*Trifolium pratense* L., Fabaceae) Isoflavones and Estrogenic Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:1277-1282.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Braune A, Gutschow M, Engst W and Blaut M (2001) Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5558-5567.
- Brink E, Coxam V, Robins S, Wahala K, Cassidy A and Branca F (2008) Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**:761-770.
- Brooks JD and Thompson LU (2005) Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **94**:461-467.
- Cancellieri F, De Leo V, Genazzani AD, Nappi C, Parenti GL, Polatti F, Ragni N, Savoca S, Teglio L, Finelli F and Nichelatti M (2007) Efficacy on menopausal neurovegetative symptoms and some plasma lipids blood levels of an herbal product containing isoflavones and other plant extracts. *Maturitas* **56**:249-256.
- Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B and Setchell KD (2006) Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *Journal of Nutrition* **136**:45-51.

- Chan HY and Leung LK (2003) A potential protective mechanism of soya isoflavones against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene tumour initiation. *British Journal of Nutrition* **90**:457-465.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR and Doerge DR (2000) Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed sprague-dawley rats. *Journal of Nutrition* **130**:1963-1970.
- Chang Y-C and Nair MG (1995) Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *Journal of Natural Products* **58**:1892-1896.
- Chatterjee P and Franklin MR (2003) Human cytochrome P450 inhibition and metabolic-intermediate complex formation by goldenseal extract and its methylenedioxyphenyl components. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:1391-1397.
- Chen C-Y, Bakhiet RM, Hart V and Holtzman G (2005a) Isoflavones Improve Plasma Homocysteine Status and Antioxidant Defense System in Healthy Young Men at Rest but Do Not Ameliorate Oxidative Stress Induced by 80% VO₂pk Exercise. *Annals of Nutrition & Metabolism* **49**:33-41.
- Chen J, Wang S, Jia X, Bajimaya S, Lin H, Tam VH and Hu M (2005b) Disposition of flavonoids via recycling: Comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:1777-1784.
- Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F and Franke AA (1999) Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutrition and cancer* **33**:82-87.
- Clarke DB and Lloyd AS (2004) Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK Total Diet Study. *Food Additives & Contaminants* **21**:305-316.
- Coldham NG, Darby C, Hows M, King LJ, Zhang AQ and Sauer MJ (2002) Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica* **32**:45-62.
- Coldham NG and Sauer MJ (2000) Pharmacokinetics of [¹⁴C]Genistein in the Rat: Gender-Related Differences, Potential Mechanisms of Biological Action, and Implications for Human Health. *Toxicology and Applied Pharmacology* **164**:206-215.
- Cook JC and Hodgson E (1985) The induction of cytochrome P 450 by isosafrole and related methylenedioxyphenyl compounds. *Chemico-Biological Interactions* **54**:299-315.
- Coon JT, Pittler MH and Ernst E (2007) Trifolium pratense isoflavones in the treatment of menopausal hot flashes: a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine* **14**:153-159.
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR and Barnes S (1993) Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**:1961-1967.

- Creaser CS, Koupaiabyazani MR and Stephenson GR (1991) Mass-Spectra of Trimethylsilyl Derivatives of Naturally-Occurring Flavonoid Aglycones and Chalcones. *Organic Mass Spectrometry* **26**:157-160.
- Creaser CS, Koupai-Abyazani MR and Stephenson GR (1992) Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of flavanones in citrus and grape juices. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **117**:1105-1109.
- De Kleijn MJJ, Van der Schouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE and Jacques PF (2001) Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the framingham study. *Journal of Nutrition* **131**:1826-1832.
- Denison MS, Fisher JM and Whitlock JP, Jr. (1988) The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *Journal of Biological Chemistry* **263**:17221-17224.
- Dickins M, Elcombe CR, Moloney SJ, Netter KJ and Bridges JW (1979) Further-Studies on the Dissociation of the Isosafrole Metabolite-Cytochrome-P-450 Complex. *Biochemical Pharmacology* **28**:231-238.
- Divi RL, Chang HC and Doerge DR (1997) Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochemical pharmacology* **54**:1087-1096.
- Divi RL and Doerge DR (1996) Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chemical research in toxicology* **9**:16-23.
- Doerge DR, Chang HC, Churchwell MI and Holder CL (2000) Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:298-307.
- Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR and Kurzer MS (2000) Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9**:581-586.
- Ebmeier CC and Anderson RJ (2004) Human thyroid phenol sulfotransferase enzymes 1A1 and 1A3: Activities in normal and diseased thyroid glands, and inhibition by thyroid hormones and phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**:5597-5605.
- Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E and Quetin-Leclercq J (2001) Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **12**:707-715.
- Ferretti G, Bacchetti T, Menanno F and Curatola G (2004) Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). *Atherosclerosis (Amsterdam, Netherlands)* **172**:55-61.
- Fisher MB, Campanale K, Ackermann BL, Vandenbranden M and Wrighton SA (2000) In vitro glucuronidation using human liver microsomes

- and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:560-566.
- Galati G, Chan T, Wu B and O'Brien PJ (1999) Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chemical Research in Toxicology* **12**:521-525.
- Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Achanfuo-Yeboah J, Iannucci R, Chowdhury S, Alton K, Patrick JE and Zbaida S (2004a) Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(S) responsible for the glucuronidation of ezetimibe (ZETIA). *Drug Metabolism and Disposition* **32**:314-320.
- Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Achanfuo-Yeboah J, Iannucci R, Chowdhury S, Alton K, Patrick JE and Zbaida S (2004b) Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of posaconazole (Noxafil). *Drug Metabolism and Disposition* **32**:267-271.
- Green MD and Tephly TR (1998) Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyl transferase proteins. *Drug Metabolism and Disposition* **26**:860-867.
- Gu L, Laly M, Chang HC, Prior RL, Fang N, Ronis MJJ and Badger TM (2005) Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:6858-6863.
- Guo Q, Rimbach G, Moini H, Weber S and Packer L (2002) ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* **179**:171-180.
- Harbone J (1995) Hormonelle Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren. *Ökologische Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*:123-149.
- Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR and Olson JR (2006) Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology in Vitro* **20**:426-438.
- He K, Ludtke SJ, Heller WT and Huang HW (1996) Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophysical journal* **71**:2669-2679.
- Heinonen SM, Hoikkala A, Wahala K and Adlercreutz H (2003) Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **87**:285-299.
- Heinonen SM, Wahala K and Adlercreutz H (2004a) Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:6802-6809.
- Heinonen SM, Wahala K, Liukkonen KH, Aura AM, Poutanen K and Adlercreutz H (2004b) Studies of the in vitro intestinal metabolism

- of isoflavones aid in the identification of their urinary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:2640-2646.
- Heller W and Forkmann G (1994) Biosynthesis of flavonoids. *Flavonoids*:499-535.
- Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Mori TA, Rivera J and Beilin LJ (1999) Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)* **145**:167-172.
- Horman I and Viani R (1971) Plant-polyphenols and related compounds. Mass-spectrometric study of the trimethylsilyl derivatives of hydroxy- and/or methoxy-substituted cinnamic acids and of their methyl esters. *Organic Mass Spectrometry* **5**:203-219.
- Hornross PL (1995) Phytoestrogens, Body-Composition, and Breast-Cancer. *Cancer Causes & Control* **6**:567-573.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM and Smith M (2000) Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer causes & control : CCC* **11**:289-298.
- Houston JB and Kenworthy KE (2000) In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metabolism and Disposition* **28**:246-254.
- Howes J, Waring M, Huang L and Howes Laurence G (2002) Long-term pharmacokinetics of an extract of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*). *Journal of alternative and complementary medicine* **8**:135-142.
- Howes JB, Sullivan D, Lai N, Nestel P, Pomeroy S, West L, Eden JA and Howes LG (2000) The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis (Shannon, Ireland)* **152**:143-147.
- Hsieh C-Y, Santell RC, Haslam SZ and Helferich WG (1998) Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* **58**:3833-3838.
- Hu M, Krausz K, Chen J, Ge X, Li J, Gelboin HL and Gonzalez FJ (2003) Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:924-931.
- Hvattum E and Ekeberg D (2003) Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **38**:43-49.
- Hwang CS, Kwak HS, Lim HJ, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG and Han KO (2006) Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **101**:246-253.

- Ioannides C, Delaforge M and Parke DV (1981) Safrole - Its Metabolism, Carcinogenicity and Interactions with Cytochrome-P-450. *Food and Cosmetics Toxicology* **19**:657-666.
- Janning P, Schuhmacher US, Upmeier A, Diel P, Michna H, Degen GH and Bolt HM (2000) Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Archives of Toxicology* **74**:421-430.
- Jia X, Chen J, Lin H and Hu M (2004) Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzyme-transporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **310**:1103-1113.
- Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M and Nelson C (1995) A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **54**:167-184.
- Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR and Helferich WG (2001) Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *Journal of Nutrition* **131**:2957-2962.
- Kamienski FX and Murphy SD (1971) Biphasic effects of methylenedioxyphenyl synergists on the action of hexobarbital and organophosphate insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **18**:883-894.
- Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE and Reeder AY (1993) Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clinica Chimica Acta* **223**:9-22.
- King CD, Green MD, Rios GR, Coffman BL, Owens IS, Bishop WP and Tephly TR (1996) The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **332**:92-100.
- King CD, Rios GR, Green MD and Tephly TR (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism* **1**:143-161.
- King RA and Bursill DB (1998) Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **67**:867-872.
- Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T and Masamune Y (2004) Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **27**:185-188.
- Kirk CJ, Harris RM, Wood DM, Waring RH and Hughes PJ (2001) Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochemical Society Transactions* **29**:209-216.

- Kitteringham NR, Pirmohamed M and Park BK (1998) The pharmacology of the cytochrome P450 enzyme system. *Bailliere's Clinical Anaesthesiology* **12**:191-211.
- Klejduš B, Vitamvasova-Sterbova D and Kuban V (2001) Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta* **450**:81-97.
- Kliwer SA (2003) The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *Journal of Nutrition* **133**:2444S-2447S.
- Knaggs AR (2001) The biosynthesis of shikimate metabolites (1999). *Natural Product Reports* **18**:334-355.
- Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ and Tracy TS (1998) Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* **37**:4137-4147.
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, Van Der Burg B and Gustafsson J-A (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* **139**:4252-4263.
- Kulling SE (1996) Untersuchungen zur Genotoxizität und zum in vitro-Metabolismus des Phytoestrogens Coumestrol. *Dissertationsschrift, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern*.
- Kulling SE (2001) Phytoestrogene vom Isoflavontyp: Metabolismus und genetische Toxizität. *Habilitationsschrift, Fakultät für Chemie, TU Karlsruhe*.
- Kulling SE, Honig DM and Metzler M (2001) Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **49**:3024-3033.
- Kulling SE, Honig DM, Simat TJ and Metzler M (2000) Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**:4963-4972.
- Kulling SE, Lehmann L and Metzler M (2002) Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **777**:211-218.
- Kumagai Y, Lin LY, Philpot RM, Yamada H, Oguri K, Yoshimura H and Cho AK (1992) Regiochemical Differences in Cytochrome-P450 Isozymes Responsible for the Oxidation of Methylene-dioxyphenyl Groups by Rabbit Liver. *Molecular Pharmacology* **42**:695-702.
- Lake BG (1987) Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: K. Snell and B. Mullock, Editors, *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford:183-215.
- Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R and Elgavish A (2002) Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition* **132**:552S-558S.

- Le Bail J-C, Champavier Y, Chulia A-J and Habrioux G (2000) Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sciences* **66**:1281-1291.
- Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L and Metzler M (2005) Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicology Letters* **158**:72-86.
- Lethaby AE, Brown J, Marjoribanks J, Kronenberg F, Roberts H and Eden J (2007) Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. *Cochrane Database of Systematic Reviews*:CD001395.
- Lewandowski M, Chui YC, Levi PE and Hodgson E (1990) Differences in induction of hepatic cytochrome P450 isozymes by mice in eight methylenedioxyphenyl compounds. *Journal of Biochemical Toxicology* **5**:47-55.
- Lundstroem K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P and Ulmanen I (1995) Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology* **1251**:1-10.
- Ma DF, Qin LQ, Wang PY and Katoh R (2008) Soy isoflavone intake inhibits bone resorption and stimulates bone formation in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition* **62**:155-161.
- Matern H, Heinemann H and Matern S (1994) Radioassay of UDP-glucuronosyltransferase activities toward endogenous substrates using labeled UDP-glucuronic acid and an organic solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry* **219**:182-188.
- Meech R and Mackenzie PI (1997) Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **24**:907-915.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ and Lake BG (2003) Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica* **33**:511-527.
- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E and Segura-Aguilar J (1998) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biology & Medicine* **26**:107-116.
- Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR and Duthie GG (1998) Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**:142-148.
- Moon YJ, Sagawa K, Frederick K, Zhang S and Morris ME (2006) Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *AAPS Journal* **8**:E433-E442.
- Morandi S, Locati D, Ferrario F, Chiesa G and Arnoldi A (2005) A simple method for the characterization and quantification of soy isoflavone metabolites in the serum of MMTV-Neu mice using high-performance

- liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**:153-161.
- Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M and Masamune Y (2002) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**:48-52.
- Murata M, Midorikawa K, Koh M, Umezawa K and Kawanishi S (2004) Genistein and Daidzein Induce Cell Proliferation and Their Metabolites Cause Oxidative DNA Damage in Relation to Isoflavone-Induced Cancer of Estrogen-Sensitive Organs. *Biochemistry* **43**:2569-2577.
- Murray M (2000) Mechanisms of inhibitory and regulatory effects of methylenedioxyphenyl compounds on cytochrome P450-dependent drug oxidation. *Current Drug Metabolism* **1**:67-84.
- Murray M (2006) Altered CYP expression and function in response to dietary factors: Potential roles in disease pathogenesis. *Current Drug Metabolism* **7**:67-81.
- Nestel P, Cehun M, Chronopoulos A, DaSilva L, Teede H and McGrath B (2004) A biochanin-enriched isoflavone from red clover lowers LDL cholesterol in men. *European Journal of Clinical Nutrition* **58**:403-408.
- Nettleton JA, Greany KA, Thomas W, Wangen KE, Adlercreutz H and Kurzer MS (2004) Plasma phytoestrogens are not altered by probiotic consumption in postmenopausal women with and without a history of breast cancer. *Journal of Nutrition* **134**:1998-2003.
- Nettleton JA, Greany KA, Thomas W, Wangen KE, Adlercreutz H and Kurzer MS (2005) The effect of soy consumption on the urinary 2:16-hydroxyestrone ratio in postmenopausal women depends on equol production status but is not influenced by probiotic consumption. *Journal of Nutrition* **135**:603-608.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**:369-375.
- Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J and Adlercreutz H (2002) Isoflavone content of the soy based supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**:1-11.
- Oberdisse E, Hackenthal, E., Kuschinsky, K. (2001) Pharmakologie und Toxikologie. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage.*
- Occhiuto F, De Pasquale R, Guglielmo G, Palumbo DR, Zangla G, Samperi S, Renzo A and Circosta C (2007) Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytotherapy Research* **21**:130-134.
- Omura T and Sato R (1964) Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry* **239**:2379-2385.

- Pfeiffer E, Graf E, Gerstner S and Metzler M (2006) Stimulation of estradiol glucuronidation: A protective mechanism against estradiol-mediated carcinogenesis? *Molecular Nutrition & Food Research* **50**:385-389.
- Pfeiffer E, Schebb NH, Podlech J and Metzler M (2007) Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**:307-316.
- Pfeiffer E, Treiling CR, Hoehle SI and Metzler M (2005) Isoflavones modulate the glucuronidation of estradiol in human liver microsomes. *Carcinogenesis*.
- Polasek J, Queiroz EF and Hostettmann K (2006) On-line identification of phenolic compounds of *Trifolium* species using HPLC-UV-MS and post-column UV-derivatisation. *Phytochemical Analysis* **18**:13-23.
- Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wahala K and Rechkemmer G (2000) Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* **21**:1247-1252.
- Preinerstorfer B and Sontag G (2004) Determination of isoflavones in commercial soy products by HPLC and coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology* **219**:305-310.
- Qin L-Q, Xu J-Y, Wang P-Y and Hoshi K (2006) Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **52**:428-436.
- Richelle M, Pridmore-Merten S, Bodenstab S, Enslin M and Offord EA (2002) Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *Journal of Nutrition* **132**:2587-2592.
- Rivera-Vargas LI, Schmitthenner AF and Graham TL (1993) Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* **32**:851-857.
- Roberts DW, Doerge DR, Churchwell MI, Gamboa da Costa G, Marques MM and Tolleson WH (2004) Inhibition of extrahepatic human cytochromes P450 1A1 and 1B1 by metabolism of isoflavones found in *Trifolium pratense* (red clover). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:6623-6632.
- Ronis MJ, Rowlands JC, Hakkak R and Badger TM (2001) Inducibility of hepatic CYP1A enzymes by 3-methylcholanthrene and isosafrole differs in male rats fed diets containing casein, soy protein isolate or whey from conception to adulthood. *Journal of Nutrition* **131**:1180-1188.
- Roy D and Liehr JG (1999) Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**:107-115.
- Rüfer CE, Maul R, Donauer E, Fabian EJ and Kulling SE (2007) In vitro and in vivo metabolism of the soy isoflavone glycitein. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**:813-823.

- Rüfer CE (2005) Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten. *Dissertationsschrift, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Universität Karlsruhe*.
- Rüfer CE, Bub A, Moseneder J, Winterhalter P, Sturtz M and Kulling SE (2008) Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, crossover study. *American Journal of Clinical Nutrition* **87**:1314-1323.
- Rüfer CE, Glatt H and Kulling SE (2006) Structural elucidation of hydroxylated metabolites of the isoflavan equol by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* **34**:51-60.
- Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P and Winston M (2006) Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation* **113**:1034-1044.
- Schalk M, Cabello-Hurtado F, Pierrel M-A, Atanossova R, Saindrenan P and Werck-Reichhart D (1998) Piperonylic acid, a selective, mechanism-based inactivator of the trans-cinnamate 4-hydroxylase: a new tool to control the flux of metabolites in the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **118**:209-218.
- Schmitt E, Metzler M, Jonas R, Dekant W and Stopper H (2003) Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **542**:43-48.
- Senafi SB, Clarke DJ and Burchell B (1994) Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochemical Journal* **303**:233-240.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A and Heubi JE (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition* **131**:1362S-1375S.
- Setchell KD, Brown NM and Lydeking-Olsen E (2002a) The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition* **132**:3577-3584.
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS and Heubi JE (2002b) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**:447-453.
- Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ and Heubi JE (2005) S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite

- produced by human intestinal bacterial flora. *American Journal of Clinical Nutrition* **81**:1072-1079.
- Setchell KDR, Brown NM and Lydeking-Olsen E (2002c) The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition* **132**:3577-3584.
- Setchell KDR and Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition* **129**:758s-767s.
- Sfakianos J, Coward L, Kirk M and Barnes S (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition* **127**:1260-1268.
- Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJ and Badger TM (2002) Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**:588-594.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**:414-423.
- Sidhu JS, Marcus CB, Parkinson A and Omiecinski CJ (1998) Differential induction of cytochrome P450 gene expression by 4n-alkyl-methylenedioxybenzenes in primary rat hepatocyte cultures. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **12**:253-262.
- Smith GG and Djerassi C (1971) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CCV. Mass spectra of trimethylsilyl ethers of phenols and the importance of neighboring group participation in fragmentation. *Organic Mass Spectrometry* **5**:487-489.
- Snyder RD and Gillies PJ (2003) Reduction of genistein clastogenicity in Chinese hamster V79 cells by daidzein and other flavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **41**:1291-1298.
- Soars MG, Ring BJ and Wrighton Steven A (2003) The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:762-767.
- Takimoto, Glover K, Huang X and Hayes S A (2003) Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Unconjugated Soy Isoflavones Administered to Individual with Cance. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **12**:1212-1221.
- Taku K, Umegaki K, Sato Y, Taki Y, Endoh K and Watanabe S (2007) Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition* **85**:1148-1156.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V and Adlercretuz H (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3106-3110.

- Toebes AHW, de Boer V, Verkleij JAC, Lingeman H and Ernst WHO (2005) Extraction of Isoflavone Malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:4660-4666.
- Tolleson WH, Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM and Roberts DW (2002) Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:4783-4790.
- Trock BJ, Hilakivi-Clarke L and Clarke R (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* **98**:459-471.
- Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, Young JC and McRae K (2006) Isoflavone Profiles of Red Clovers and Their Distribution in Different Parts Harvested at Different Growing Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:5797-5805.
- Tsunoda N, Pomeroy S and Nestel P (2002) Absorption in humans of isoflavones from soy and red clover is similar. *Journal of Nutrition* **132**:2199-2201.
- Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Someya H, Hori I, Metzler M and Barrett JC (2003) Cell-transforming activity and mutagenicity of 5 phytoestrogens in cultured mammalian cells. *International Journal of Cancer* **105**:312-320.
- Tukey RH and Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases. Metabolism, expression, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**:581-616, 582 plates.
- Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, Gardner-Stephen D, Galetin A, Houston JB and Miners JO (2004) Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metabolism and Disposition* **32**:413-423.
- Ueng Y-F, Hsieh C-H and Don M-J (2005) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by the natural hepatotoxin safrole. *Food and Chemical Toxicology* **43**:707-712.
- Ueng Y-F, Kuwabara T, Chun Y-J and Guengerich FP (1997) Cooperativity in Oxidations Catalyzed by Cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **36**:370-381.
- Uesugi T, Fukui Y and Yamori Y (2002) Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal japanese women: a four-week study. *Journal of the American College of Nutrition* **21**:97-102.
- Ullrich V and Schnabel KH (1973) Formation and binding of carbanions by cytochrome P-450 of liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **1**:176-183.
- University of Michigan Health System Red clover - traditional use. http://health.med.umich.edu/healthcontent.cfm?xyzpdqabc=0&id=6&action=detail&AEProductID=HW_CAM&AEArticleID=hn-2153008&AEArticleType=Cam **available July 17th 2008.**

- USDA (2002) U.S. Department of Agriculture-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods. **Release 1.3 - 2002**:<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>.
- Usia T, Watabe T, Kadota S and Tezuka Y (2005) Metabolite-cytochrome P450 complex formation by methylenedioxyphenyl lignans of Piper cubeba: mechanism-based inhibition. *Life Sciences* **76**:2381-2391.
- van Rhijn P and Vanderleyden J (1995) The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological reviews* **59**:124-142.
- Velpandian T, Jasuja R, Bhardwaj RK, Jaiswal J and Gupta SK (2001) Piperine in food: interference in the pharmacokinetics of phenytoin. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **26**:241-248.
- Venkatakrisnan K, Von Moltke LL and Greenblatt DJ (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *Journal of Clinical Pharmacology* **41**:1149-1179.
- Vermeulen NPE (1996) Role of metabolism in chemical toxicity. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*:29-53.
- Wang SWJ, Chen J, Jia X, Tam VH and Hu M (2006) Disposition of flavonoids via enteric recycling: structural effects and lack of correlations between in vitro and in situ metabolic properties. *Drug Metabolism and Disposition* **34**:1837-1848.
- Weaver CM and Cheong JM (2005) Soy isoflavones and bone health: the relationship is still unclear. *Journal of Nutrition* **135**:1243-1247.
- Wiseman H, Casey K, Clarke DB, Barnes KA and Bowey E (2002) Isoflavone Aglycon and Glucoconjugate Content of High- and Low-Soy U.K. Foods Used in Nutritional Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:1404-1410.
- Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR and Sanders TAB (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**:395-400.
- Wollenweber E, Stevens JF, Klimo K, Knauff J, Frank N and Gerhauser C (2003) Cancer chemopreventive in vitro activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Medica* **69**:15-20.
- Wong C-K and Keung WM (1997) Daidzein sulfoconjugates are potent inhibitors of sterol sulfatase (EC 3.1.6.2). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**:579-583.
- Woodward MD (1981) Differentiation of dihydroxymonomethoxyisoflavones by gas chromatography-mass spectroscopy. *Phytochemistry (Elsevier)* **20**:532-534.
- Wu AH, Yu MC, Tseng CC and Pike MC (2008) Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British Journal of Cancer* **98**:9-14.
- Wu Q, Wang M and Simon JE (2003) Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography, A* **1016**:195-209.

- Wuttke W, Jarry H and Seidlova-Wuttke D (2007) Isoflavones-Safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Research Reviews* **6**:150-188.
- Yan Z and Caldwell GW (2001) Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry (Hilversum, Netherlands)* **1**:403-425.
- Yu L-S, Wilkinson CF and Anders MW (1980) Generation of carbon monoxide during the microsomal metabolism of methylenedioxyphenyl compounds. *Biochemical Pharmacology* **29**:1113-1122.
- Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B and Odell JT (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiology* **124**:781-793.
- Zhai S, Dai R, Friedman FK and Vestal RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* **26**:989-992.
- Zhang B, Song Y, Hao Z and Yue H (2002) Study on optimum condition of acid hydrolysis for soybean isoflavone glycoside. *Shipin Kexue (Beijing, China)* **23**:75-78.
- Zhang Y, Hendrich S and Murphy PA (2003) Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *Journal of Nutrition* **133**:399-404.
- Zhu BT, Ezell EL and Liehr JG (1994) Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **269**:292-299.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF and Hyer MB (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute* **85**:1819-1827.
- Zubik L and Meydani M (2003) Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in american women. *American Journal of Clinical Nutrition* **77**:1459-1465.