

# Metabolismus der Phenylpropene Methyleugenol, (*E*)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron

Alexander Cartus



# **Metabolismus der Phenylpropene Methyleugenol, (*E*)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

**Dissertation**

D386

vorgelegt von

**Diplom-Chemiker Alexander Thomas Cartus**

Betreuer der Arbeit: Professor Dr. Dr. Dieter Schrenk

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 13.08.2014

Kaiserslautern 2014

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Januar bis September 2010 sowie Februar 2011 bis Mai 2013 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 29.06.2012

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 13.08.2014

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Gereon Niedner-Schatteburg

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

2. Berichterstatter: Jun.-Prof. Dr. Melanie Esselen

Umschlagbild:

Leberläppchen (*sus scrofa*, HE-Färbung, ca. 10-fache Vergrößerung), © Sarah Werning 2007  
und Auswahl einiger phenylpropanreicher Gewürze und Kräuter  
(Gewürznelke, Basilikum, und Fenchelsamen) © Roland Bischoff 2013

Druck und Umschlaggestaltung: Abteilung 5.6, Foto-Repro-Druck, der TU Kaiserslautern.



---

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b> .....	3
2.1	Phenylpropanoide.....	4
2.1.1	Natürliches Vorkommen und Verwendung der untersuchten Phenylpropene.....	5
2.1.1.1	Methyleugenol ( <b>1</b> ) und Methylisoeugenol ( <b>2</b> ).....	5
2.1.1.2	Asarone.....	6
2.2	Fremdstoffmetabolismus.....	7
2.2.1	Phase-I-Reaktionen.....	11
2.2.1.1	Cytochrom P450-Enzyme.....	12
2.2.1.2	Systematik der CYP-Enzyme.....	12
2.2.1.3	Struktur der Cytochrom P450-Enzyme.....	13
2.2.1.4	Reaktionsmechanismus CYP-vermittelter Oxygenierungen.....	13
2.2.1.5	CYP-katalysierte Reaktionen.....	15
2.2.1.6	Organspezifische und zelluläre Lokalisation.....	16
2.2.1.7	CYP-Aktivität und Polymorphismen.....	16
2.2.1.8	Induktion durch Aroclor 1254.....	18
2.2.1.9	Wichtige humane Cytochrom P450-Enzyme.....	18
2.2.1.10	Mikrosomale Epoxidhydrilase.....	22
2.2.2	Phase-II-Reaktionen.....	23
2.2.2.1	Sulfonierung und Glucuronidierung.....	23
2.3	Die Leber als Entgiftungsorgan.....	26
2.3.1	Untersuchung des hepatischen Fremdstoffmetabolismus.....	28
2.4	Enzymkinetik.....	31
2.5	Chemische Kanzerogenese.....	34
2.5.1	Mechanismen der chemischen Kanzerogenese.....	34
2.5.2	Gentoxische und nicht-gentoxische Kanzerogene.....	35
2.5.3	Rolle fremdstoffmetabolisierender Enzyme bei der Aktivierung von gentoxischen Kanzerogenen.....	36
2.5.4	Leberkrebs.....	37
<b>3</b>	<b>Toxikologie der untersuchten Phenylpropene: Stand der Forschung</b> .....	39
3.1	Toxikokinetik.....	40
3.1.1	Methyleugenol ( <b>1</b> ) und Methylisoeugenol ( <b>2</b> ).....	40
3.1.2	Asarone.....	41
3.2	Metabolismus.....	42
3.3	Kanzerogenität von Phenylpropenen.....	44
3.3.1	Mechanismus der Kanzerogenität von Safrol und Estragol: Historischer Überblick.....	45
3.3.2	Einfluss der Phenylpropen-Struktur auf die Leberkanzerogenität im Tierversuch.....	48
3.3.3	Kanzerogenitätsstudien der untersuchten Testsubstanzen.....	49
3.4	Gentoxizität/-regulation.....	53
3.4.1	Methyleugenol ( <b>1</b> ).....	53
3.4.1.1	DNA-Schäden.....	54
3.4.1.2	DNA-Addukte.....	54
3.4.1.3	Mutagenität.....	56
3.4.1.4	Chromosomenschäden.....	56
3.4.1.5	Einfluss auf die Gen- oder Proteinexpression.....	56
3.4.2	Methylisoeugenol ( <b>2</b> ).....	58
3.4.3	Asarone.....	58
3.4.3.1	DNA-Schäden.....	58
3.4.3.2	Mutagenität.....	58
3.4.3.3	Chromosomenschäden.....	59
3.5	Subakute und subchronische Toxizität.....	60
3.5.1	Methyleugenol ( <b>1</b> ) und Methylisoeugenol ( <b>2</b> ).....	60
3.5.2	Asarone.....	60

3.5.3	Kalmusöle .....	61
3.6	Akute Toxizität .....	62
3.7	Zytotoxizität .....	63
3.8	Proteinaddukte .....	65
3.9	Reproduktionstoxizität und Teratogenität .....	65
3.10	Pharmakologische Wirkungen .....	66
3.11	Risikobewertung und Regulation .....	67
3.11.1	Methyleugenol ( <b>1</b> ) .....	67
3.11.2	Methylisoeugenol ( <b>2</b> ) .....	69
3.11.3	Asarone .....	69
<b>4</b>	<b>Problemstellung</b> .....	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>73</b>
5.1	Gliederung und Darstellung der Ergebnisse .....	73
5.2	Synthesen .....	75
5.2.1	Isolierung von $\beta$ -Asaron ( <b>4</b> ) aus Kalmusöl .....	75
5.2.2	Synthese von 6-OH-ME ( <b>19</b> ), 6-OH-MIE ( <b>20</b> ) und $\gamma$ -Asaron ( <b>5</b> ) .....	76
5.2.3	Synthese von 1'-Hydroxyasaron ( <b>29</b> ) .....	77
5.2.4	Synthese von ( <i>E</i> )- und ( <i>Z</i> )-3'-Hydroxyasaron .....	78
5.2.4.1	Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <b>33</b> ) .....	78
5.2.4.2	Synthese von ( <i>Z</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <b>38</b> ) .....	79
5.2.4.3	Bestätigung der <i>E</i> - und <i>Z</i> -Konfiguration von <b>33</b> und <b>38</b> .....	79
5.2.5	Synthese von 1'-Oxoasaron ( <b>30</b> ) und ( <i>E</i> )-3'-Oxoasaron ( <b>34</b> ) .....	80
5.2.6	Synthese von Asaron-Diolen .....	81
5.2.7	Synthese von 1',2'-Dihydrodihydroxymethylisoeugenol ( <b>14</b> ) .....	82
5.2.8	Synthese und Isolierung von Chavibetol ( <b>8</b> ) .....	83
5.3	HPLC-UV-Analytik und LC-MS/MS .....	85
5.3.1	HPLC .....	85
5.3.2	Quantifizierung der Substanzen .....	87
5.3.3	LC-MS/MS .....	91
5.4	Metabolismus der Phenylpropanoide .....	92
5.4.1	Allgemeines .....	92
5.4.1.1	Untersuchte Spezies .....	92
5.4.1.2	Mikrosomenpräparation .....	93
5.4.1.3	Mikrosomale Inkubationen .....	94
5.4.1.4	Zeitverlauf der Metabolitenbildung bei Inkubationen mit Lebermikrosomen .....	94
5.4.1.5	Metabolismus der Testsubstanzen durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme .....	94
5.4.1.6	Bestimmung enzymkinetischer Parameter .....	95
5.4.1.7	Beitrag von CYPs zum Metabolismus in HLM: Das RAF-Konzept .....	101
<b>5.4.2</b>	<b>Metabolismus von Methyleugenol (<b>1</b>)</b> .....	<b>105</b>
5.4.2.1	Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von Methyleugenol ( <b>1</b> ) .....	105
5.4.2.2	Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol ( <b>1</b> ) in LM .....	115
5.4.2.3	Metabolismus von Methyleugenol ( <b>1</b> ) durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	123
5.4.2.4	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol ( <b>1</b> ) in Lebermikrosomen .....	126
5.4.2.5	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von <b>1</b> in CYPs und deren Beteiligung in HLM .....	131
5.4.2.6	Phase-II-Metabolismus von Methyleugenol in primären Rattenhepatozyten .....	136
<b>5.4.3</b>	<b>Metabolismus von (<i>E</i>)-Methylisoeugenol (<b>2</b>)</b> .....	<b>139</b>
5.4.3.1	Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von ( <i>E</i> )-Methylisoeugenol ( <b>2</b> ) .....	139
5.4.3.2	Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von <b>2</b> in Lebermikrosomen .....	142
5.4.3.3	Metabolismus von <b>2</b> durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	149
5.4.3.4	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von <b>2</b> in Lebermikrosomen .....	152
5.4.3.5	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von <b>2</b> in CYPs und deren Beteiligung in HLM .....	155
<b>5.4.4</b>	<b>Bildung von DNA-Addukten in pRH durch <b>1</b>, <b>2</b> und deren Metaboliten</b> .....	<b>159</b>

---

5.4.5	Metabolismus von Asaron-Isomeren .....	162
<b>5.4.6</b>	<b>Metabolismus von <math>\beta</math>-Asaron (4)</b> .....	163
5.4.6.1	Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\beta$ -Asaron (4) .....	163
5.4.6.2	Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\beta$ -Asaron (4) in Lebermikrosomen .....	172
5.4.6.3	Metabolismus von $\beta$ -Asaron (4) durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	178
5.4.6.4	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\beta$ -Asaron (4) in Lebermikrosomen .....	181
5.4.6.5	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von 4 in CYPs und deren Beteiligung in HLM ...	184
<b>5.4.7</b>	<b>Metabolismus von <math>\alpha</math>-Asaron (3)</b> .....	188
5.4.7.1	Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\alpha$ -Asaron (3) .....	188
5.4.7.2	Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (3) in Lebermikrosomen .....	190
5.4.7.3	Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (3) durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	195
5.4.7.4	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (3) in Lebermikrosomen .....	198
5.4.7.5	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von 3 in CYPs und deren Beteiligung in HLM ...	201
<b>5.4.8</b>	<b>Metabolismus von <math>\gamma</math>-Asaron (5)</b> .....	205
5.4.8.1	Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\gamma$ -Asaron (5) .....	205
5.4.8.2	Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5) in Lebermikrosomen .....	206
5.4.8.3	Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5) durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	211
5.4.8.4	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5) in Lebermikrosomen .....	213
5.4.8.5	Kinetik des Phase-I-Metabolismus von 5 in CYPs und deren Beteiligung in HLM ...	216
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion</b> .....	221
6.1	Methyleugenol (1) und Methylisoeugenol (2) .....	223
6.1.1	Metabolismus von Methyleugenol (1) in Lebermikrosomen und Supersomes <sup>TM</sup> .....	223
6.1.1.1	Identifizierung mikrosomaler Metaboliten von Methyleugenol (1) .....	223
6.1.1.2	Zeitverläufe der Metabolitenbildung in Inkubationen mit Methyleugenol (1) .....	223
6.1.1.3	Kinetik der Metabolitenbildung von Methyleugenol (1) in Lebermikrosomen .....	224
6.1.1.4	Metabolismus von Methyleugenol (1) durch humane Cytochrom P450-Enzyme .....	229
6.1.1.5	Beteiligung humaner CYPs am Metabolismus von 1 in HLM .....	233
6.1.2	Metabolismus von Methyleugenol (1) in primären Rattenhepatozyten .....	233
6.1.3	Metabolismus von (E)-Methylisoeugenol (2) in LM und Supersomes <sup>TM</sup> .....	238
6.1.4	Bildung von DNA-Addukten in pRH durch 1, 2 und deren Metaboliten .....	239
6.1.5	Schlussfolgerungen Methyleugenol (1) und (E)-Methylisoeugenol (2) .....	243
6.2	Metabolismus von Asaron-Isomeren in Lebermikrosomen und Supersomes <sup>TM</sup> .....	244
6.2.1	Identifizierung mikrosomaler Asaron-Metaboliten .....	244
6.2.1.1	$\beta$ -Asaron (4) .....	244
6.2.1.2	$\alpha$ -Asaron (3) .....	247
6.2.1.3	$\gamma$ -Asaron (5) .....	247
6.2.2	Metabolismus von 4 und 3 durch Lebermikrosomen und Supersomes <sup>TM</sup> .....	249
6.2.3	Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5) durch Lebermikrosomen und Supersomes <sup>TM</sup> .....	252
6.2.4	Schlussfolgerungen zum Metabolismus von Asaron-Isomeren .....	253
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	257
7.1	Allgemeines .....	257
7.2	Phase-I-Metabolismus .....	257
7.2.1	Mikrosomen .....	257
7.2.1.1	Rattenlebermikrosomen .....	257
7.2.1.2	Humane Lebermikrosomen .....	258
7.2.1.3	Rinderlebermikrosomen .....	258
7.2.1.4	Schweinelebermikrosomen .....	259
7.2.1.5	Rekombinant exprimierte humane CYPs (Supersomes <sup>TM</sup> ) .....	259
7.2.1.6	Proteinbestimmung .....	259
7.2.1.7	Quantitative Bestimmung der CYP- und Cytochrom- <i>b</i> <sub>5</sub> -Gehalte .....	260
7.2.2	Inkubation der Mikrosomen oder Supersomes <sup>TM</sup> .....	261
7.2.3	Probenaufarbeitung .....	262

---

7.3	Phase-II-Metabolismus.....	263
7.4	DNA-Addukte.....	263
7.4.1	DNA-Isolierung und Aufreinigung mit kommerziellem E.Z.N.A. Fertig-Kit.....	263
7.4.2	DNA-Isolierung durch Phenol/Chloroform-Extraktion.....	264
7.4.3	DNA-Verdau und Quantifizierung der DNA-Addukte.....	265
7.5	HPLC-Analytik und LC-MS.....	265
7.5.1	Analytische HPLC.....	265
7.5.2	Präparative HPLC.....	266
7.5.3	Massenspektrometrie.....	268
7.5.4	Strukturaufklärung unbekannter Metaboliten mittels <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....	268
7.5.5	Detektion und Quantifizierung von Phenylpropanoiden mittels analytischer HPLC....	269
7.5.6	Bestimmung enzymkinetischer Parameter.....	269
7.5.7	Das RAF-Konzept.....	271
7.6	Synthesen.....	272
7.6.1	Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte.....	272
7.6.2	Isolierung von β-Asaron ( <b>4</b> ) aus Kalmusöl.....	274
7.6.3	Synthese von γ-Asaron ( <b>5</b> ).....	275
7.6.4	Synthese von Chavibetol ( <b>8</b> ).....	276
7.6.5	Synthese von ( <i>RS</i> )-1'-Hydroxymethyleugenol ( <b>11</b> ).....	277
7.6.6	Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Hydroxymethylisoeugenol ( <b>12</b> ).....	278
7.6.7	Synthese von 1',2'-Dihydro-1'-hydroxy-2'- <i>meta</i> -chlorbenzoesäure-MIE ( <b>13</b> ).....	279
7.6.8	Synthese von 1',2'-Dihydrodihydroxymethylisoeugenol ( <b>14</b> ).....	280
7.6.9	Synthese von (2' <i>RS</i> )-Methyleugenolepoxid ( <b>15</b> ).....	281
7.6.10	Synthese von 3,4-Dihydroxyeugenol ( <b>16</b> ).....	282
7.6.11	Synthese von 1-Allyloxy-3,4-dimethoxybenzen ( <b>18</b> ).....	283
7.6.12	Synthese von 6-Hydroxymethyleugenol ( <b>19</b> ).....	284
7.6.13	Synthese von ( <i>E</i> )-6-Hydroxymethylisoeugenol ( <b>20</b> ).....	285
7.6.14	Synthese von 3,4-Dimethoxypropylbenzen ( <b>21</b> ).....	286
7.6.15	Synthese von 1'-Oxomethyleugenol ( <b>22</b> ).....	287
7.6.16	Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Oxomethylisoeugenol ( <b>23</b> ).....	288
7.6.17	Synthese von ( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxyzimtsäuremethylester ( <b>25</b> ).....	289
7.6.18	Synthese von ( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxyzimtsäure ( <b>26</b> ).....	290
7.6.19	Synthese von ( <i>RS</i> )-2',3'-Dihydroxymethyleugenol ( <b>27</b> ).....	291
7.6.20	Synthese von ( <i>RS</i> )-1'-Hydroxyasaron ( <b>29</b> ).....	292
7.6.21	Synthese von 1'-Oxoasaron ( <b>30</b> ).....	293
7.6.22	Synthese von ( <i>E</i> )-3,4,6-Trimethoxyzimtsäureester ( <b>32</b> ).....	294
7.6.23	Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <b>33</b> ).....	295
7.6.24	Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Oxoasaron ( <b>34</b> ).....	296
7.6.25	Synthese von 3,4,6-Trimethoxyiodbenzen ( <b>36</b> ).....	297
7.6.26	Synthese von 3,4,6-Trimethoxypropin-3'-ol-benzen ( <b>37</b> ).....	298
7.6.27	Synthese von ( <i>Z</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <b>38</b> ).....	299
7.6.28	Synthese von Asaron-Diolen.....	300
7.6.28.1	<i>threo</i> -Asarondioli ( <b>39</b> ).....	300
7.6.28.2	<i>erythro</i> -Asarondioli ( <b>40</b> ).....	301
7.6.28.3	( <i>RS</i> )-γ-Asarondioli ( <b>41</b> ).....	301
7.6.29	Synthese von 2,4,5-Trimethoxytoluol ( <b>43</b> ).....	302
<b>8</b>	<b>Literatur und Quellen</b> .....	<b>303</b>
	Eigene Publikationen.....	316
	Erklärungen.....	318
	Lebenslauf.....	319
	DANKE!.....	320

Anhang (551 Seiten)

---

## Formelzeichen / Symbole

$A_\lambda$	Peakfläche bei gegebener Wellenlänge [mAU·s]
$c$	Stoffmengenkonzentration [mol/l] = [M]
$c$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (299.792 km/s)
$d$	Durchmesser
$\delta$	chemische Verschiebung [ppm]
$\Delta$	Differenz
$E_{\text{cat}}(\text{app})$	„apparente katalytische Effizienz“ oder = $v_{\text{max}}(\text{app})/K_M(\text{app})$ bzw. $v(c(\text{app}))/K_M(\text{app})$ [ $\mu\text{l min}^{-1}(\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]
$E_{\text{cat}}$	„katalytische Effizienz“ = $k_{\text{cat}}/K_{M_i}$ [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];
$g$	Erdbeschleunigung; $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$
${}^n J_{X,Y}$	Kopplungskonstante über n-Bindungen zu Atom X bzw. zw. den Atomen X und Y [Hz]
$k_{\text{cat}}$	(maximale) Wechselzahl; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1}(\text{nmol Cytochrom P450})^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante bzw. $[S]_{50}$ oder $K_{0,5}$ ; [ $\mu\text{M}$ ]
$\lambda, \lambda_{\text{min}}, \lambda_{\text{max}}$	(Mess-)Wellenlänge; (lokales) Absorptionsminimum, -maximum [nm]
$\lambda_{\text{ref}}$	Referenzwellenlänge [nm]
$m/z$	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; hier dimensionslos verwendet
$m$	Masse [g]; atomare Masseneinheit [u]
$M$	Molare Masse [g/mol]
$n$	Anzahl der (unabhängig) durchgeführten Experimente oder Anzahl der untersuchten Individuen („Stichprobenumfang“)
$N$	individuelle Messung/Messreihe von $n$ Messungen/Messreihen
$n_H$	Hill-Koeffizient (Enzymkinetik)
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$p$	Überschreitungswahrscheinlichkeit (Signifikanzwert)
$R^2$	Determinationskoeffizient
$R_f$	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie), dimensionslos
$\rho$	Massenkonzentration; Dichte in $m/V$
$[S]$	Substratkonzentration (Schreibweise nur im Kontext der Enzymkinetik verwendet)
$t$	Zeit
$T$	Temperatur [K] oder [ $^\circ\text{C}$ ]
$t_R$	engl.: <i>time of retention</i> (Retentionszeit; HPLC) [min]
$V$	Volumen
$v_{\text{max}}(\text{app})$	maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1}(\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]
$w$	Massenanteil in $m/m$ ; auch als Gew.-%, Gehalt, Level oder Dosis angegeben

## Einheiten

%	Prozent
‰	Promille
a	Jahr
AU	engl.: <i>absorption units</i> (Absorptionseinheiten); arbiträre Einheit des DAD
d	Tag(e)
Da	Dalton (1 Da = 1 u)
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
h	Stunde
Hz	Hertz (1 Hz = 1/s)
K	Kelvin
l (L)	Liter
m	Meter
M	Molarität, (1 M = 1 mol/l)
min	Minute

## Abkürzungen

---

<b>mol</b>	Mol
<b>ppb</b>	engl.: <i>parts per billion</i> („Teile pro Milliarde“; 1 ppb = 10 <sup>-9</sup> )
<b>ppm</b>	engl.: <i>parts per million</i> („Teile pro Million“; 1 ppm = 10 <sup>-6</sup> )
<b>ppt</b>	engl.: <i>parts per trillion</i> („Teile pro Billion“; 1 ppt = 10 <sup>-12</sup> )
<b>s</b>	Sekunde
<b>t</b>	Tonne (1000 kg)
<b>u</b>	engl.: <i>unified atomic mass unit</i> (Atomare Masseneinheit; auch amu)
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Woche

## SI - Präfixe

M	Mega	10 <sup>6</sup>	Million	
k	Kilo	10 <sup>3</sup>	Tausend	
c	Zenti	10 <sup>-2</sup>	Hundertstel	(%)
m	Milli	10 <sup>-3</sup>	Tausendstel	(‰)
μ	Mikro	10 <sup>-6</sup>	Millionstel	(ppm)
n	Nano	10 <sup>-9</sup>	Milliardenstel	(ppb)
p	Piko	10 <sup>-12</sup>	Billionstel	(ppt)

## Abkürzungen

<b>2D-, 3D-</b>	zwei-, dreidimensional
<b>AAAS</b>	engl.: <i>American Association for the Advancement of Science</i>
<b>AACR</b>	engl.: <i>American Association for Cancer Research</i>
<b>abs.</b>	absolut
<b>ADH</b>	Alkoholdehydrogenase
<b>ADI</b>	engl.: <i>acceptable daily intake</i> (dt.: Erlaubte Tagesdosis)
<b>AhR</b>	engl.: <i>aryl hydrocarbon receptor</i> (dt. Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor)
<b>AKR</b>	Aldo-Keto-Reduktase
<b>ALAT</b>	Alanin-Aminotransferase
<b>ALDH</b>	Aldehyd-Dehydrogenase
<b>APCI</b>	engl.: <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> (bei der Massenspektrometrie)
<b>app</b>	apparent
<b>ApRH</b>	Aroclor 1254-vorinkubierte Rattenhepatozyten
<b>ARLM</b>	Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>B6C3F<sub>1</sub></b>	1. hybride Filialgeneration der Mäusestämme C57BL/6J (♀) und C3H/HeJ (♂)
<b>Bail</b>	Botanisches Autorenkürzel von Theodor Bail (1833–1922)
<b>BLM</b>	engl.: <i>bovine liver microsomes</i> (dt.: Rinderlebermikrosomen)
<b>BMD[L]</b>	engl.: <i>benchmark dose [lower confidence limit]</i>
<b>BSA</b>	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (dt.: Rinderserumalbumin)
<b>br</b>	breit (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>C57BL/6</b>	Inzucht Mäusestamm
<b>CAS</b>	engl.: <i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>CE</b>	engl.: <i>collision energy</i> (bei der Massenspektrometrie)
<b>CHO</b>	engl.: <i>chinese hamster ovary cells</i> (Zelllinie aus Ovarien von <i>Cricetulus griseus</i> )
<b>COE</b>	engl.: <i>Council of Europe</i> (dt.: Europarat)
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>d</b>	Dublett (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>dA</b>	2'-Desoxyadenosin
<b>DAD</b>	Diodenarraydetektor
<b>DC</b>	Dünnschicht-Chromatographie
<b>DCM</b>	Dichlormethan

---

<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Doppelt destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )
<b>dG</b>	2'-Desoxyguanosin
<b>DIBAL(-H)</b>	Diisobutylaluminiumhydrid
<b>DMEM</b>	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMF</b>	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dN</b>	2'-Desoxyribonukleosid(e)
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dT</b>	2'-Desoxythymidin, Thymidin
<b>EC<sub>50</sub></b>	mittlere effektive Konzentration (für einen gegebenen Effekt)
<b>(Na<sub>2</sub>-)EDTA</b>	(Dinatrium-)ethylendiamin-tetraacetat
<b>EE</b>	Essigsäureethylester (Ethylacetat)
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
<b>EH</b>	Epoxidhydrolase
<b>ELISA</b>	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
<b>EOC</b>	Kalmusöl des europäischen Arzneikalmus (triploid)
<b>eq.</b>	Reaktionsäquivalente
<b>EROD</b>	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisation (bei der Massenspektrometrie)
<b>ESR, EPR</b>	Elektronenspinresonanz (engl.: <i>electron paramagnetic resonance</i> )
<b>et al.</b>	lat.: <i>et alii</i> (dt.: und andere)
<b>EU</b>	Europäische Union (bis 2009 EG; Europäische Gemeinschaft)
<b>f, ♀</b>	engl.: <i>female</i> ; lat.: <i>femininum</i> (dt.: weiblichen Geschlechts)
<b>F344/N</b>	Inzucht-Albino Rattenstamm (Fischer)
<b>FAO</b>	engl.: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FDA</b>	engl.: <i>U. S. Food and Drug Administration</i>
<b>FEMA</b>	engl.: <i>Flavor and Extract Manufacturers Association</i>
<b>FIA</b>	Fließinjektionsanalyse (Optimierungsverfahren bei der LC-MS)
<b>FMO</b>	Flavin-abhängige Monooxygenase
<b>Fpg</b>	Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase
<b>FS</b>	Feststoff
<b>FUJITA</b>	Botanisches Autorenkürzel von Yasuji Fujita
<b>F.v.M.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Ferdinand von Müller (1825–1896)
<b>G. MEY.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Georg Friedrich Wilhelm Meyer (1782–1856)
<b>GC-ID-HRMS</b>	engl.: <i>isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry</i>
<b>Gew.-%</b>	Gewichtsprozent ( <i>w</i> )
<b>GMP</b>	engl.: <i>good manufacturing practice</i>
<b>GRAS</b>	engl.: <i>generally recognized as safe</i>
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GST</b>	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
<b>HCA</b>	engl.: <i>hepatocellular adenoma</i> (dt.: hepatozelluläres Adenom)
<b>HCC</b>	engl.: <i>hepatocellular carcinoma</i> (dt.: hepatozelluläres Karzinom)
<b>hCYP</b>	humanes Cytochrom P450
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HEPES</b>	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
<b>hept</b>	Heptett
<b>HLM</b>	humane Lebermikrosomen
<b>HOFFM.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Georg Franz Hoffmann (1761–1826)
<b>HOOK.</b>	Botanisches Autorenkürzel von William Jackson Hooker (1785–1865)
<b>HPLC</b>	engl.: <i>high performance (pressure) liquid chromatography</i>
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
<b>hSULT</b>	humane Sulfotransferase
<b>IARC</b>	engl.: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>i. p.</b>	lat.: <i>intra peritoneum</i> (intraperitoneal, dt.: in die Bauchhöhle)
<b>IR</b>	Infrarot
<b>IS</b>	Interner Standard
<b>IUPAC</b>	engl.: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

---

## Abkürzungen

---

<b>i. v.</b>	lat.: <i>intra vena</i> (intravenös, dt.: in die Vene)
<b>JECFA</b>	engl.: <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
<b>JOC</b>	Indisches Kalmusöl aus der Jammu-Region (tetraploid)
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KOC</b>	Indisches Kalmusöl aus der Kashmir-Region
<b>L., LINN.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Carl von Linné (1707–1778)
<b>L.F.</b>	Botanisches Autorenkürzel Carl von Linné (Sohn, 1741–1783)
<b>LC-MS(/MS)</b>	Flüssigchromatographie (HPLC) mit (Tandem-)Massenspektrometrie-Kopplung
<b>LC<sub>50</sub></b>	mittlere letale Konzentration
<b>LD<sub>50</sub></b>	mittlere letale Dosis
<b>LDH</b>	(L-)Lactatdehydrogenase
<b>LLA</b>	LDH- <i>leakage assay</i>
<b>LO(A)EL</b>	engl.: <i>lowest observed (adverse) effect level</i>
<b>LOD</b>	engl.: <i>limit of detection</i> (dt.: Nachweis- oder Detektionsgrenze)
<b>LOQ</b>	engl.: <i>limit of quantification</i> (dt.: Bestimmungs- oder Quantifizierungsgrenze)
<b>LM</b>	Lebermikrosomen bzw. Lebensmittel
<b>m, ♂</b>	engl.: <i>male</i> ; lat.: <i>masculinum</i> (dt.: männlichen Geschlechts)
<b>m</b>	Multipllett (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>mEH</b>	mikrosomale Epoxidhydrolase
<b>MEZ</b>	Botanisches Autorenkürzel von Carl Christian Mez (1866–1944)
<b>MICHX.</b>	Botanisches Autorenkürzel von André Michaux (1746–1802)
<b>mIEH</b>	mikrosomale Insektenzell-Epoxidhydrolase
<b>MM</b>	Michaelis-Menten
<b>MOE</b>	engl. <i>margin of exposure</i>
<b>MROD</b>	7-Methoxyresorufin-O-Demethylase
<b>MS</b>	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
<b>MSDS</b>	engl.: <i>material safety data sheet</i> (dt.: Sicherheitsdatenblatt)
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>MW</b>	arithmetischer Mittelwert
<b>MWD</b>	engl.: <i>multiple wavelength detector</i>
<b>N<sup>2</sup>-MIE-dG</b>	N <sup>2</sup> -( <i>trans</i> -Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin
<b>N<sup>6</sup>-MIE-dA</b>	N <sup>6</sup> -( <i>trans</i> -Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyadenosin
<b>n. a.</b>	nicht angegeben, nicht bekannt
<b>NADH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
<b>NADP</b>	β-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
<b>NAT</b>	N-Acetyl-Transferase
<b>nd</b>	nicht detektiert/nicht detektierbar
<b>NEES</b>	Botanisches Autorenkürzel von Christian Gottfried Daniel Nees von Esenbeck (1776–1858)
<b>NGS</b>	NADPH-(re)generierendes Systems
<b>NIS</b>	N-Iodsuccinimid
<b>NMR</b>	engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> (dt.: Kernresonanzspektroskopie)
<b>NO(A)EL</b>	engl.: <i>no observed (adverse) effect level</i>
<b>nq</b>	nicht quantifizierbar
<b>NS</b>	Niederschlag
<b>NTP</b>	<i>National Toxicology Program</i> des U.S. Gesundheitsministeriums
<b>ÖPV</b>	Ölpumpenvakuum
<b>p</b>	pseudo (NMR; z. B. ps = Pseudosingulett)
<b>P450</b>	Cytochrom P450
<b>p. a.</b>	lat.: <i>pro analysi</i> (für die Analyse; als Reinheitsstufe für Chemikalien)
<b>PADI</b>	engl.: <i>possible average daily intake</i>
<b>PAK</b>	engl.: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PAP</b>	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
<b>PAPS</b>	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
<b>PB</b>	Phenobarbital
<b>PBBK</b>	engl.: <i>physiologically based biokinetic</i>
<b>PCB</b>	Polychlorierte Biphenyle
<b>PCP</b>	Pentachlorphenol

---



---

<b>PFS</b>	engl.: <i>plant food supplement</i> ; pflanzliche Nahrungsergänzungsmittel
<b>pH</b>	pH-Wert (neg. dekadische Logarithmus der (solvatisierten) Protonen-Aktivität)
<b>pRH, prH</b>	primäre Rattenhepatozyten; primäre Hepatozyten
<b>PP</b>	Phenylpropene, Phenylpropanoide
<b>PROD</b>	7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase
<b>q</b>	Quartett (NMR)
<b>quint</b>	Quintett (NMR)
<b>RAF</b>	engl.: <i>relative activity factors</i> (dt.: relative Aktivitätsfaktoren)
<b>RAF.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Constantine Samuel Rafinesque-Schmaltz (1783–1840)
<b>Rkt.</b>	Reaktion(en)
<b>RLM</b>	Rattenlebermikrosomen (nicht-induziert)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS</b>	engl.: <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
<b>ROXB.</b>	Botanisches Autorenkürzel von William Roxburgh (1751–1815)
<b>RP</b>	engl.: <i>reversed phase</i> (dt.: Umkehrphase; bei der HPLC)
<b>RRT</b>	Resazurinreduktionstest
<b>RSA</b>	Röntgenstrukturanalyse
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Singulett (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>S9, S9-Mix</b>	engl.: <i>supernatant</i> ; Überstand der differentiellen Zentrifugation nach 10 min 1.000 g und 10–20 min 9.000 g (meist aus Aroclor 1254-induzierter Rattenleber, m)
<b>SCE</b>	engl.: <i>sister chromatid exchange</i> (dt.: Schwesterchromatidaustausch)
<b>SCF</b>	engl.: <i>Scientific Committee on Food</i> der EU-Kommission
<b>SCHOTT</b>	Botanisches Autorenkürzel von Heinrich Wilhelm Schott (1794–1865)
<b>SD</b>	engl.: <i>standard deviation</i> (dt.: Standardabweichung, Stichprobe)
<b>SD</b>	Sprague-Dawley (ein Albino-Auszucht-Rattenstamm)
<b>SDS-PAGE</b>	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>sEH</b>	engl.: <i>soluble epoxide hydrolase</i> (dt.: lösliche, zytosolische Epoxidhydrolase)
<b>sext</b>	Sextett (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>sh</b>	engl.: <i>shoulder</i> (geschulterte Signale bei NMR-, UV oder IR-Spektren)
<b>SI</b>	franz.: <i>Système international d'unités</i> (Internationales Einheitensystem)
<b>SIEB.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Philipp Franz von Siebold (1796–1866)
<b>SLM</b>	Schweinelebermikrosomen
<b>SOL.</b>	Botanisches Autorenkürzel von Daniel Solander (1733–1782)
<b>SRB</b>	Sulforhodamin-B bzw. Sulforhodamin-B-Test
<b>ssp.</b>	engl./lat.: <i>subspecies</i> (dt.: Unterart)
<b>SULT</b>	Sulfotransferase
<b>SW</b>	Spannweite (= $x_{\max} - x_{\min}$ ; engl.: <i>range</i> )
<b>t</b>	Triplett (bei der NMR-Spektroskopie)
<b>TAMDI</b>	engl.: <i>theoretical added maximum daily intake</i>
<b>TBAI</b>	Tetrabutylammoniumiodid
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>TM</b>	Traditionelle Medizin
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TU</b>	Technische Universität
<b>UGT</b>	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
<b>UDS</b>	unplanmäßige DNA-Synthese
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat = Uridin-5'-trihydrogendiphosphat
<b>UNEP</b>	engl.: <i>United Nations Environment Programme</i>
<b>UPLC</b>	engl.: <i>ultra performance liquid chromatography</i>
<b>U.S., USA</b>	engl.: <i>United States [of America]</i> (dt.: Vereinigte Staaten [von Amerika])
<b>UV</b>	Ultraviolettstrahlung
<b>Vis</b>	engl.: <i>visible [light]</i> (dt.: sichtbar[es Licht])
<b>VSD</b>	engl.: <i>virtual safe dose</i>
<b>WHO</b>	engl.: <i>World Health Organization</i> (dt.: Weltgesundheitsorganisation)
<b>WST-1</b>	engl.: <i>water soluble tetrazolium salt assay</i> (Zellviabilitätstest mit WST-1) bzw. als Chemikalie: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat

---

# Substanzübersicht

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit mehrfach wiederkehrenden Verbindungen unter Angabe deren Substanznummer (wird in dieser Arbeit stets als fett gedruckte Zahl angegeben), Bezeichnung, Kurzbezeichnung, Strukturformel, Retentionszeit und Quelle aufgeführt. Die Substanzübersicht ist der Dissertation zusätzlich als Beiblatt beigelegt. Auf Seite XIV sind die CAS-Nummern dieser Verbindungen angegeben.

**Tabelle 1.** Verbindungsnummern, Bezeichnungen, Abkürzungen, durchschnittliche Retentionszeiten ( $t_R$ , HPLC) und Quellen der in dieser Arbeit referenzierten Verbindungen. K = kommerziell; S = synthetisiert; I = isoliert; NS = nicht synthetisiert; – = nicht untersucht

Nr.	Bezeichnung, (Abk.)	Struktur	$t_R$ [min]	Quelle
<b>1</b>	Methyleugenol (ME)		28,8	K
<b>2</b>	(E)-Methylisoeugenol (MIE)		30,0	K
<b>2b</b>	(Z)-Methylisoeugenol (MIE)		29,5	NS
<b>3</b>	$\alpha$ -Asaron ( $\alpha$ A)		29,4	K
<b>4</b>	$\beta$ -Asaron ( $\beta$ A)		28,0	I
<b>5</b>	$\gamma$ -Asaron ( $\gamma$ A)		28,6	S
<b>6</b>	Eugenol (E)		24,4	K
<b>7</b>	(E)-Isoeugenol (IE)		25,5	K
<b>8</b>	Chavibetol (C)		24,8	S
<b>9</b>	(E)-Isochavibetol (IC)		25,9	NS
<b>10</b>	Veratrumaldehyd (VA)		15,5	K
<b>11</b>	(RS)-1'-Hydroxymethyl- eugenol (1'-OH-ME)		17,1	S

<b>12</b>	( <i>E</i> )-3'-Hydroxymethyl- isoeugenol (3'-OH-MIE)		17,4	S
<b>13</b>	1'-Hydroxy-1',2'- dihydromethylisoeugenol- <i>meta</i> -chlorbenzoat		–	S
<b>14a</b>	<i>threo</i> -Dihydrodihydroxy- methylisoeugenol; (1' <i>R</i> ,2' <i>R</i> ), (1' <i>S</i> ,2' <i>S</i> ); (MIE-Diol)		11,1	S
<b>14b</b>	<i>erythro</i> -Dihydrodihydroxy- methylisoeugenol; (1' <i>R</i> ,2' <i>S</i> ), (1' <i>R</i> ,2' <i>S</i> ); (MIE-Diol)		8,5	NS
<b>14c</b>	1',2'-Methylisoeugenolepoxid (MIE-Epoxid)		–	NS
<b>15</b>	( <i>RS</i> )-Methyleugenol-2',3'- epoxid (ME-Epoxid)		18,8	S
<b>16</b>	3,4-Dihydroxyeugenol		19,1	S
<b>17</b>	3,4-Dimethoxyphenol		–	K
<b>18</b>	1-Allyloxy-3,4- dimethoxybenzen		–	S
<b>19</b>	6-Hydroxymethyleugenol (6-OH-ME)		20,4	S
<b>20</b>	( <i>E</i> )-6-Hydroxymethyl- isoeugenol (6-OH-MIE)		21,7	S
<b>20a</b>	( <i>Z</i> )-6-Hydroxymethyl- isoeugenol		–	NS
<b>21</b>	3,4-Dimethoxypropylbenzen (H <sub>2</sub> -ME)		31,5	S
<b>22</b>	1'-Oxomethyleugenol (1'-Oxo-ME)		19,5	S
<b>23</b>	( <i>E</i> )-3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE)		19,8	S
<b>24</b>	( <i>E</i> )-Ferulasäure		3,5	K

Substanzen

<b>25</b>	( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxy- zimtsäuremethylester (DMZSE)		25,2	S
<b>26</b>	( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxyzimtsäure (DMZS)		7,0	S
<b>27</b>	( <i>RS</i> )-2',3'-Dihydro-2',3'- dihydroxymethyleugenol (ME-Diol)		11,3	S
<b>28</b>	3,4,6-Trimethoxybenz- aldehyd (TMBA)		17,5	K
<b>29</b>	( <i>RS</i> )-1'-Hydroxyasaron (1'-OH-A)		18,6	S
<b>30</b>	1'-Oxoasaron (1'-Oxo-A)		22,1	S
<b>31</b>	( <i>E</i> )-3,4,6-Trimethoxy- zimtsäure (TMZS)		8,3	K
<b>32</b>	( <i>E</i> )-3,4,6-Trimethoxy- zimtsäuremethylester		25,0	S
<b>33</b>	( <i>E</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <i>E</i> -3'-OH-A)		18,6	S
<b>33a</b>	3,4,6-Trimethoxy- phenylpropan-3'-ol		17,5	S
<b>34</b>	( <i>E</i> )-3'-Oxoasaron ( <i>E</i> -3'-Oxo-A)		22,5	S
<b>35</b>	3,4,6-Trimethoxybenzen (TMB)		–	K
<b>36</b>	3,4,6-Trimethoxyiodbenzen (TMIB)		–	S
<b>37</b>	3,4,6-Trimethoxyphenylprop- 1'-in-3'-ol		–	S
<b>38</b>	( <i>Z</i> )-3'-Hydroxyasaron ( <i>Z</i> -3'-OH-A)		18,6	S
<b>38a</b>	( <i>Z</i> )-3'-Oxoasaron ( <i>Z</i> -3'-Oxo-A)		–	NS
<b>39</b>	<i>threo</i> -1',2'-Dihydro-1',2'- dihydroxyasaron		13,0	S

<b>39a</b>	( <i>E</i> )-1',2'-Asaronepoxid ( <i>E</i> -A-Epoxid)		(18,2)	S*
<b>40</b>	<i>erythro</i> -1',2'-Dihydro-1',2'- dihydroxyasaron ( <i>e</i> -A-Diol)		11,2	S
<b>40a</b>	( <i>Z</i> )-1',2'-Asaronepoxid ( <i>Z</i> -A-Epoxid)		(18,2)	S*
<b>41</b>	( <i>RS</i> )-2',3'-Dihydro-2',3'- dihydroxyasaron ( $\gamma$ A-Diol)		13,8	S
<b>41a</b>	2',3'- $\gamma$ -Asaronepoxid ( $\gamma$ A-Epoxid)		–	NS
<b>42</b>	3,4,6- Trimethoxyacetophenon		19,8	K
<b>43</b>	3,4,6-Trimethoxytoluol		23,4	S
<b>44</b>	( <i>E</i> )-3-Hydroxyasaron (3-OH- $\alpha$ A)		–	NS
<b>45</b>	( <i>E</i> )-4-Hydroxyasaron (4-OH- $\alpha$ A)		–	NS
<b>46</b>	( <i>Z</i> )-3-Hydroxyasaron (3-OH- $\beta$ A)		–	NS
<b>47</b>	( <i>Z</i> )-4-Hydroxyasaron (4-OH- $\beta$ A)		–	NS
<b>48</b>	3-Hydroxy- $\gamma$ -asaron (3-OH- $\gamma$ A)		–	NS
<b>49</b>	4-Hydroxy- $\gamma$ -asaron (4-OH- $\gamma$ A)		–	NS
<b>50</b>	1-(3,4,6-Trimethoxyphenyl)- propan-2-on		–	NS
<b>51</b>	1-(4-Hydroxy-3-methoxy- phenyl)-propan-2-on		–	NS

\* Die Synthese der Asaron-Epoxide **39a** und **40a** gelang zwischenzeitlich (März 2014) Frau Dipl.-LMChem. Simone Stegmüller im Rahmen ihrer Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe Professor Schrenk, TU Kaiserslautern, nach der Methode von Kim *et al.* (1999).

---

**C A S - N u m m e r n**


---

<b>Verbindung</b>	<b>CAS-Nr.</b>
<b>1</b>	93-15-2
<b>2</b>	6379-72-2 (E); 6380-24-1 (Z)
<b>3</b>	2883-98-9
<b>4</b>	5273-86-9
<b>5</b>	5353-15-1
<b>6</b>	97-53-0
<b>7</b>	97-54-1
<b>8</b>	501-19-9
<b>9</b>	501-20-2
<b>10</b>	120-14-9
<b>11</b>	31706-95-3 872853-94-6 (S) 1073478-60-0 (R) 209790-20-5 (+)
<b>12</b>	18523-76-7 40918-90-9 (E) 70570-23-9 (Z)
<b>13</b>	nicht vergeben
<b>14a</b>	20133-19-1
<b>14b</b>	314295-15-3 (1'R,2'S; absolut) 1372205-80-5 (1'R,2'S; relativ)
<b>14c</b>	40626-39-9 99417-43-3 (1'S,2'R; relativ) 124878-07-5 (1'S,2'S; relativ) 156767-66-7 (1'S,2'R; absolut)
<b>15</b>	27602-80-8 165821-74-9 (2'R), (+)
<b>16</b>	1126-61-0
<b>17</b>	2033-89-8
<b>18</b>	6906-64-5
<b>19</b>	59893-87-7
<b>20</b>	263256-10-6 65720-05-0 (E)
<b>20a</b>	65720-04-9 (Z)
<b>21</b>	5888-52-8
<b>22</b>	33731-40-7
<b>23</b>	18523-76-7 40918-90-9 (E) 70570-23-9 (Z)
<b>24</b>	537-98-4 (E) 1014-83-1 (Z)
<b>25</b>	5396-64-5 30461-77-9 (E) 30461-78-0 (Z)
<b>26</b>	2316-26-9 14737-89-4 (E) 14737-88-3 (Z)
<b>27</b>	26509-45-5 54910-32-6 (R; +) 261926-47-0 (S; -)
<b>28</b>	4460-86-0
<b>29</b>	1517851-36-3
<b>30</b>	1500937-73-4
<b>31</b>	24160-53-0 73490-49-0 (E) 73490-48-9 (Z)
<b>32</b>	352279-44-8 80749-75-3 (E) 444155-04-8 (Z)
<b>33</b>	1392497-89-0 (E)
<b>33a</b>	1000519-32-3
<b>34</b>	106128-88-5 99217-06-8 (E)
<b>35</b>	135-77-3
<b>36</b>	23149-33-9
<b>37</b>	nicht vergeben
<b>38</b>	1402544-70-0 (Z)
<b>38a</b>	99217-07-9 (Z)
<b>39</b>	146830-05-9 321365-67-7 (1'R,2'R, relativ) 137361-00-3 (1'S,2'S, relativ) 853021-82-6 (1'S,2'S, absolut) 853021-83-7 (1'R,2'R, absolut)
<b>39a</b>	124878-08-6
<b>40</b>	146830-05-9 853021-85-9 (1'S,2'R, absolut) 853021-84-8 (1'R,2'S, absolut) 137361-02-5 (1'S,2'R, relativ) 321365-68-8 (1'S,2'R, relativ)
<b>40a</b>	321365-66-6
<b>41</b>	nicht vergeben
<b>41a</b>	nicht vergeben
<b>42</b>	1818-28-6
<b>43</b>	14894-74-7
<b>44</b>	89915-49-1
<b>45</b>	90377-06-3
<b>46</b>	nicht vergeben
<b>47</b>	nicht vergeben
<b>48</b>	89915-49-1
<b>49</b>	90377-06-3
<b>50</b>	2020-90-8
<b>51</b>	2503-46-0

---

## K u r z z u s a m m e n f a s s u n g

Methyleugenol (ME), (E)-Methylisoeugenol (MIE), alpha-Asaron (aA), beta-Asaron (bA) und gamma-Asaron (gA) sind natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe aus der Klasse der Phenylpropene (PP) und Bestandteil der menschlichen Ernährung. ME, aA und bA erwiesen sich im Tierversuch als hepatokanzerogen. MIE und gA wurden bislang nicht untersucht. Die allylischen Hepatokanzerogene Estragol und Safrol werden im Verlauf des Fremdstoffmetabolismus durch Cytochrom P450-Enzyme (CYP) in 1'-Position hydroxyliert und anschließend durch Sulfotransferasen sulfoniert. Der reaktive Schwefelsäureester kann DNA-Addukte bilden, wodurch in der Folge Mutationen und Tumoren ausgelöst werden können. Für ME wurde der gleiche Mechanismus der Aktivierung postuliert, obgleich definitive Beweise bislang fehlten. Im Gegensatz dazu war die Mehrheit der bislang untersuchten propenylischen PP nicht kanzerogen. aA und bA stellen insofern eine Ausnahme dar. Tierexperimentelle Untersuchungen legen einen alternativen Mechanismus für die Aktivierung von aA und bA nahe. Untersuchungen zum Metabolismus der Asarone liegen bisher nicht vor. Ziel der Arbeit war es daher, den hepatischen Metabolismus dieser fünf PP zu untersuchen, um Einblicke in die potentiellen gentoxischen Mechanismen zu erhalten. Die Metabolitenbildung der fünf Substanzen wurde zeit- und konzentrationsabhängig in humanen und tierischen Lebermikrosomen (LM) sowie verschiedenen humanen CYP-Enzymen (Supersomes<sup>TM</sup>) untersucht. Die Metaboliten wurden charakterisiert, identifiziert und synthetisiert, um als Referenzverbindungen für die Quantifizierung sowie für weitere mechanistische *in vitro* Untersuchungen zu dienen. Ferner wurden enzymkinetische Parameter bestimmt, um eine Extrapolation der Metabolitenbildung hin zu kleinen Substratkonzentrationen sowie die Beteiligung humaner CYPs an der Metabolitenbildung in humanen LM zu ermöglichen. Außerdem wurde die Bildung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit ME, MIE sowie deren Metaboliten untersucht. Für alle Verbindungen konnten die folgenden fünf enzymatischen Reaktionen identifiziert werden: Hydroxylierung der Seitenkette, Oxidation dieser Alkohole, Epoxidierung der Seitenkette und Hydrolyse zu Diolen sowie O-Demethylierung. Als Hauptmetaboliten von ME, MIE, aA und gA wurden die jeweiligen Seitenkettenalkohole identifiziert, während bA hauptsächlich über Epoxide zu Diolen metabolisiert wurde. Die Ergebnisse belegen, dass ME, im Gegensatz zu MIE, über den gleichen Mechanismus wie Safrol und Estragol, auch in geringen, humanrelevanten Konzentrationen aktiviert werden kann. Für aA und vor allem bA scheint eine Aktivierung über Epoxide wahrscheinlicher, während es für gA keine Hinweise auf potentiell gentoxische Metaboliten gibt.

---

## A b s t r a c t

Methyleugenol (ME), (*E*)-methylisoeugenol (MIE), alpha-asarone (aA), beta-asarone (bA) and gamma-asarone (gA) are naturally occurring plant constituents, and thus part of the human nutrition. They belong to the class of phenylpropenes (PP) or alkenylbenzenes. ME, aA and bA are hepatocarcinogenic to male mice, whereas the carcinogenicity of MIE and gA were not investigated so far. Estragole and safrole, both allylic hepatocarcinogens, are activated via Cytochrom P450 enzymes (CYP) and sulfotransferases during xenobiotic metabolism by forming a 1'-hydroxy metabolite (side chain), which is afterwards sulfonated. After loss of sulfate, the remaining carbocation can form DNA-adducts leading to mutations and tumors in rodent liver. For ME, the same mechanism of activation was assumed, although ultimate evidences were lacking. In contrast, the majority of propenylic PP examined as yet is not or very weakly carcinogenic. The propenylic compounds aA and bA are hence an exception. Based on the results of animal experiments, an alternative mechanism of bioactivation is likely for aA and bA. Data on the metabolism of asarone-isomers are not yet available.

Therefore, the aim of this work was to elucidate the metabolism of these five PP to uncover their possible carcinogenic mechanisms and metabolic pathways.

The formation of metabolites was measured time- and concentration-dependent using human and animal liver microsomes, as well as different human CYP enzymes (Supersomes<sup>TM</sup>). The metabolites were characterized, identified and synthesized to use them as reference compounds for quantification and to test them in further mechanistic *in vitro* assays. Kinetic data were derived to enable extrapolation to low substrate concentration, more relevant for the human nutrition, and to determine the contribution of different human CYPs in metabolite formation in human liver microsomes. Finally, the formation of DNA adducts by ME, MIE and there metabolites was studied using primary rat hepatocytes.

For all compounds, the following five enzyme-catalyzed reactions were identified: hydroxylation of the side chain, oxidation of those alcohols to aldehydes or ketones, epoxidation of the side chain followed by hydrolysis yielding diols, as well as *O*-demethylation. Major metabolites of ME, MIE, aA and gA were the corresponding side chain alcohols, whereas bA was mainly metabolized via the epoxide/diol pathway. The results show, that ME, but not MIE, are bioactivated by the same mechanism as safrole and estragole even at low substrate concentrations. In case of aA and bA an alternative bioactivation via epoxides, not side chain alcohols, is highly likely. For gA, there are no hints for a genotoxic mode of action or genotoxic metabolites.



---

# 1

## Einleitung

Ein hoher Anteil natürlicher, pflanzlicher Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Kräuter und Gewürze wird in der öffentlichen Wahrnehmung häufig mit einer „gesunden Ernährung“ gleichgesetzt und oft gleichfalls mit einem verminderten Krankheitsrisiko, z. B. für Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs, assoziiert. Andererseits sind einige der potentesten bekannten Toxine wie Aflatoxine, Tetrodotoxin oder das Botulinumtoxin natürlichen Ursprungs. Auch in pflanzlichen Lebensmitteln können toxikologisch zumindest bedenkliche Stoffe vorhanden sein. Diese können als Kontaminanten unabsichtlich (z. B. während der industriellen Verarbeitung) gebildet oder in das Lebensmittel eingebracht werden (z. B. Acrylamid) oder werden als Rückstände nicht wieder vollständig entfernt (z. B. Pflanzenschutzmittel). Neben Kontaminanten und Rückständen gibt es eine dritte Möglichkeit: Die Pflanze produziert toxische Stoffe selbst, z. B. um sich gegen Fraßfeinde oder Mikroorganismen zur Wehr zu setzen.

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropene (PP) sind natürliche Bestandteile vieler Pflanzen und stellen zum Teil toxikologisch bedenkliche Stoffe dar. So erzeugten das allylische Methyleugenol (**1**) sowie die propenylischen PP  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) im Tierversuch Lebertumoren. Für die allylischen PP Safrol und Estragol konnte bereits in den 1970er und -80er Jahren tierexperimentell gezeigt werden, dass für deren Bioaktivierung sowohl Cytochrom P450-Enzyme (CYPs), als auch Sulfotransferasen (SULT) verantwortlich sind. Für **1** wurde ein analoger Mechanismus postuliert. Im Gegensatz dazu waren die Mehrzahl der propenylischen PP in Tierversuchen nicht oder sehr schwach (hepato-)kanzerogen. Die beiden hepatokanzerogenen Verbindungen **3** und **4** bilden insofern eine Ausnahme. Tierexperimentelle Untersuchungen lassen darauf schließen, dass für deren Aktivierung fremdstoffmetabolisierende SULTs keine Rolle spielen. Untersuchungen

zum Metabolismus bzw. weitergehende Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen der Kanzerogenese von Asaronen liegen derzeit nicht vor. Somit sind Untersuchungen zum Wirkmechanismus allylischer und propenylischer hepatokanzerogener PPs nicht nur in Hinblick auf Struktur-Wirkungsbeziehungen überaus interessant, sondern auch wichtige Grundvoraussetzungen für eine fundierte Risikoidentifizierung, -analyse und -bewertung dieser Bestandteile der menschlichen Ernährung.

---

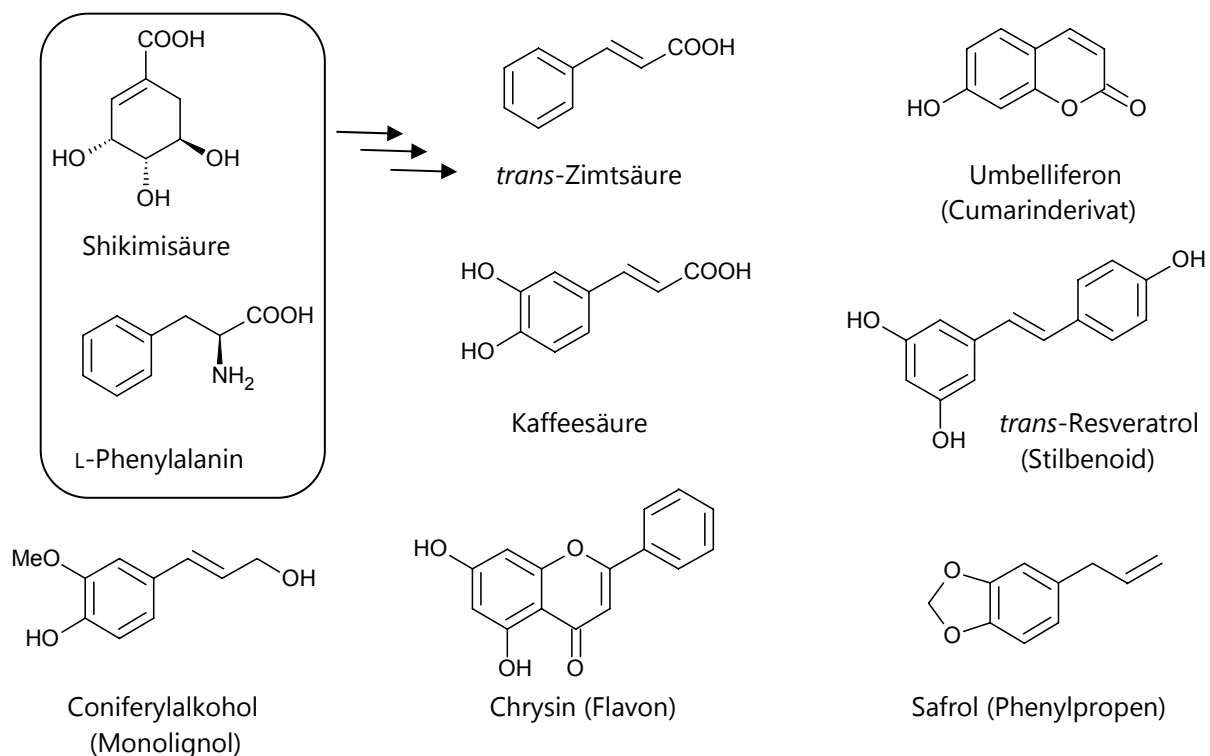
# 2

## Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die Grundlagen zum Verständnis der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gelegt werden. Zunächst werden die chemischen Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropanoide sowie deren natürliches Vorkommen beschrieben. Anschließend wird auf die Funktion und die molekularen Mechanismen des Fremdstoffmetabolismus sowie auf Eigenschaften bestimmter fremdstoffmetabolisierender Enzyme bzw. Enzymsysteme und bekannte Polymorphismen dieser eingegangen. Wegen ihrer zentralen Rolle im (Fremdstoff-)Metabolismus und weil die Leber das Hauptzielorgan der Toxizität der untersuchten Phenylpropene darstellt, wird kurz auf die Funktionen und den Feinbau dieses Organs eingegangen. Ferner werden wichtige Labormodelle für die Untersuchung des Leberstoffwechsels bzw. des hepatischen Fremdstoffmetabolismus vorgestellt und eine konzise Einführung in die Enzymkinetik gegeben. Abschließend werden die grundlegenden Mechanismen der chemischen Kanzerogenese sowie die Rolle und Bedeutung verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme dabei erläutert.

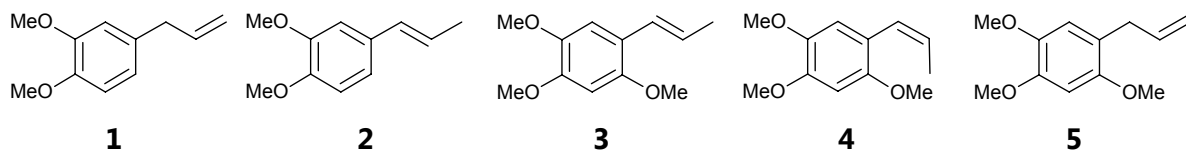
## 2.1 Phenylpropanoide

Phenylpropanoide sind organische Verbindungen mit einem Kohlenstoffgerüst bestehend aus einem aromatischen Ring und einer C3-Seitenkette. Der Benzenring ist häufig mit Sauerstofffunktionen wie Hydroxy-, Methoxy- und/oder Methylendioxygruppen substituiert. Viele Phenylpropanoide sind Naturstoffe, die in Pflanzen und Mikroorganismen über den Shikimat-Phenylalanin-Biosyntheseweg gebildet werden (Koeduka *et al.*, 2006 und 2009; Ravindran *et al.*, 2003; Dewick, 2002). Als sekundäre Pflanzenstoffe stellen sie die Hauptmenge der natürlich vorkommenden phenolischen Substanzen dar oder sind deren Vorstufen. Beispiele sind Flavonoide, Lignine, Zimtsäurederivate sowie Cumarinderivate und Stilbenoide (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Natürlich vorkommende Phenylpropanoide wie Kaffeesäure, Zimtsäure, Safrol, Coniferylalkohol werden über Shikimisäure und Phenylalanin (Kasten) gebildet und sind Vorstufen für weitere Substanzklassen wie Flavonoide (z. B. Chrysin), Stilbenoide (z. B. Resveratrol) oder Cumarine (z. B. Umbelliferon).

Die in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropanoide gehören der Gruppe der Phenylpropene (PP) an und zeichnen sich in ihrer chemischen Struktur durch drei Merkmale aus: Ihr Grundgerüst besteht aus einem Benzenring mit Methoxysubstituenten in Ringposition 3, 4 oder 3, 4 und 6 sowie einer ungesättigten C3-Seitenkette in 1-Position (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Strukturformeln von Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**),  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**).

Die Verbindungen **1-5** unterscheiden sich in der Lage und Art der Doppelbindung in der Seitenkette. Die 2'-Propenyl-Seitenkette wird als Allyl-, die 1'-Propenyl-Seitenkette als Propenylrest bezeichnet. Während **1** und **5** nur in einer Konfiguration vorkommen, gibt es bei den 1'-Propenyl-Verbindungen mit interner Doppelbindung die Möglichkeit zur Bildung von je zwei Isomeren; *cis* (**4**) oder *trans* (**2**, **3**) bzw. *E* oder *Z*. In der Natur kommen die Propenylderivate aufgrund Ihres Biosyntheseweges fast ausschließlich als Gemisch der (*E*)- und (*Z*)-Form vor (Savidge und Förster, 2001), wobei eine starke Favorisierung einer Konfiguration vorkommen kann.

## 2.1.1 Natürliches Vorkommen und Verwendung der untersuchten Phenylpropene

### 2.1.1.1 Methyleugenol (**1**) und Methylisoeugenol (**2**)

Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) sind bei Raumtemperatur hellgelbe, ölige Flüssigkeiten mit einem intensiven Geruch nach Gewürznelken.

Die Verbindungen kommen in der Natur meist vergesellschaftet mit anderen Phenylpropenen, z. B. Eugenol (**6**) und Isoeugenol (**7**), in diversen Pflanzen vor und werden/wurden als Aroma- und Duftstoffe für Lebensmittel, Parfums, Kosmetika und Tabakerzeugnisse eingesetzt (IARC, 2012; Stanfill *et al.*, 2003). Daneben fand **1** z. B. als Lockstoff für Insekten in Pheromonfallen und als Pestizid Verwendung (Zheng *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2009; Kah-Wei Hee und Tan, 2006; Uchida *et al.*, 2007; Chuang und Hou, 2008). Die natürlichen Gehalte an PP in Pflanzen sind generell von vielen Faktoren abhängig und schwanken über Größenordnungen. Der Gehalt von **1** z. B. in Basilikum schwankt nicht nur innerhalb verschiedener Varietäten und Cultivaren stark, sondern auch innerhalb derselben Art. In *Ocimum basilicum* L. variiert der Gehalt an ME im etherischen Öl zwischen 0 und 100 %, je nach Alter und Wuchshöhe der Pflanze, Position der Blätter, Wachstums- und Erntebedingungen, Standort, Bestehenden Infektionen der Pflanze sowie dem Chemotyp (Miele *et al.*, 2001; Zheljzakov *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2011; Lewinsohn *et*

*al.*, 2000; Kothari *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2011). In getrocknetem Basilikum oder basilikumhaltigen Kräutermischungen hängt der Gehalt von **1** bei Verwendung des gleichen Rohmaterials zudem von der Trocknungsmethode ab (Di Cesare *et al.*, 2003). Gehalte von bis zu 18 % **1** wurden für die etherischen Ölen von z. B. Basilikum, Piment, Muskatnuss, Kalmus, Zitronengras, Kardamom (De Vincenzi *et al.*, 2000) sowie Zimt, Sternanis (Gursale *et al.*, 2010; Römpf, 2013), Gewürznelke, Fenchel, Pfeffer, Rosenblättern, Betelnuss und zahlreichen anderen Pflanzen beschrieben (Burdock, 2004). In sehr hohen Gehalten (> 90 %) ist **1** in Huon-Pinienöl (*Dacrydium franklinii* HOOK.) sowie den Ölen aus *Melaleuca bracteata* F.v.M und *Cinnamomum olivieri* BAIL vorhanden. Eine ausgesprochen umfangreiche Zusammenfassung über die Gehalte von **1** in verschiedenen Pflanzen geben Tan und Nishida (2012). **2** kommt mit Gehalten von bis zu 53 % in den Ölen verschiedener Pflanzen und Pflanzenwurzeln vor. Die höchsten Gehalte wurden in *Asarum arifolium* MICHX., *Cymbopogon javanensis* HOFFM. und *Orthodon methylisoeugenoliferum* FUJITA bestimmt. Ferner wurde **2** in Ingwer, Kalmus, getrocknetem Thunfisch (Bonito), Orangenschalenöl und weiteren Fruchtölen gefunden (Burdock, 2004; Fujita, 1944).

### 2.1.1.2 Asarone

$\alpha$ -Asaron (**3**) ist bei Raumtemperatur (RT) ein farbloser kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 62 °C.  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) bilden in hochreiner Form farblose bzw. leicht hellbraun gefärbte Kristalle, deren Schmelzpunkte im Bereich der RT liegen (**4**: 16–20 °C; **5**: 25 °C). Alle drei Asarone kommen als natürliche Inhaltsstoffe in diversen Pflanzen vor. Die Gehalte an  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\alpha$ -Asaron (**3**) sind in etherischen Ölen der Osterluzeigewächse (*Aristolochiaceae*), von Hasel- und Brechwurz (*Asarum europaeum* L.) und der Kalmusgewächse (*Acoraceae*; z. B. Kalmus, *Acorus calamus* L.; Zwergkalmus, *Acorus gramineus* SOL.) am höchsten (Rana *et al.*, 2013; Satyal *et al.*, 2013; COE, 2005; Mukherjee, 2007b). Die Pflanzenherkunft bzw. -varietät ist von entscheidender Bedeutung für den  $\beta$ -Asaron-Gehalt. Die indische tetraploide Varietät von *A. calamus* enthält bis zu 95 % **4** im etherischen Öl, während die triploide europäische Varietät nur bis zu 10 % **4** enthält. Kalmusöl der amerikanischen, diploiden Varietät von *A. calamus* (auch als eigene Gattung *Acorus americanus* RAF. beschrieben), enthält lediglich Spuren von **4** (COE, 2005). In den verschiedenen Varietäten von *A. calamus* liegt **5** nur in Spuren vor (Stahl und Keller, 1981). Neben **4** und **3** enthalten Kalmusöle weitere phenolische Bestandteile wie Methyleugenol, (EZ)-Methylisoeugenol sowie diverse Terpenoide wie Linalool, Campher, Acorenon, Acoron, Isoacoron, Cedren, Geranylacetat oder Pinene (Mukherjee *et al.*, 2007b; Rana *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Della Greca *et al.*, 1989; Marongiu *et al.*, 2005; Ka *et al.*, 2005; Bertea *et al.*, 2005; Satyal *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2011; Motley, 1994; Keller und Stahl, 1983).

Della Greca *et al.* (1989) identifizierten in *A. gramineus* SOL. alle drei Asaron-Isomere nebeneinander in Gehalten von 12,3 mg (**4**); 2,7 mg (**5**) und 1,7 mg (**3**) neben 2,3 mg (*Z*)-Methylisoeugenol pro kg getrockneten Pflanzenanteilen. **5** wurde weiterhin in der Asterart *Caesulia axillaris* ROXB. beschrieben (Devgan und Bokadia, 1968). Asaron-Isomere und andere Phenylpropene wurden ebenfalls in diversen Pfeffer-Gewächsen (*Piper*) nachgewiesen. Die höchsten Gehalte an **5** pro kg getrockneter Pflanzenblätter wurden in *P. futokadzura* SIEB. mit 1,58 g  $\gamma$ -Asaron (Matsui *et al.*, 1976) und *P. sarmentosum* ROXB. mit 0,53 g  $\gamma$ -Asaron sowie 0,78 g  $\alpha$ -Asaron (Masuda, 1999) bestimmt. Qin *et al.* (2010) charakterisierten ebenfalls das etherische Öl von *P. sarmentosum* ROXB. und identifizierten dabei 41 Komponenten. Neben diverser Terpene konnten folgende Phenylpropene quantifiziert werden: **3** (1,08 %), **4** (0,19 %), **5** (1,19 %), **1** (0,64 %), Safrol (0,16 %), Elemicin (1,53 %) und Myristicin (65,2 %). Pro kg Pflanzenextrakt bestimmten Avella *et al.* (1994) in *P. divaricatum* G. MEY. 1,2 g  $\gamma$ -Asaron. Extrem hohe Gehalte an **5** wurden im Lorbeergewächs *Aniba hostmanniana* (NEES) MEZ bestimmt, dessen etherisches Öl bis zu 98,6 %, also fast reines  $\gamma$ -Asaron enthält (Gottlieb und da Rocha, 1972). Gehandelt wird hauptsächlich  $\beta$ -asaronreiches Kalmusöl der tetraploiden Varietät aus Indien, Pakistan, Bangladesh, Japan und China (Sinha, 2002). Verwendung finden asaronhaltige Pflanzenteile hauptsächlich zum Aromatisieren von alkoholischen Getränken, als Tees sowie in vielen pflanzlichen Arzneimitteln, insbesondere in der traditionellen Medizin vieler Ethnien (vgl. Kap. 3.10).

## 2.2 Fremdstoffmetabolismus

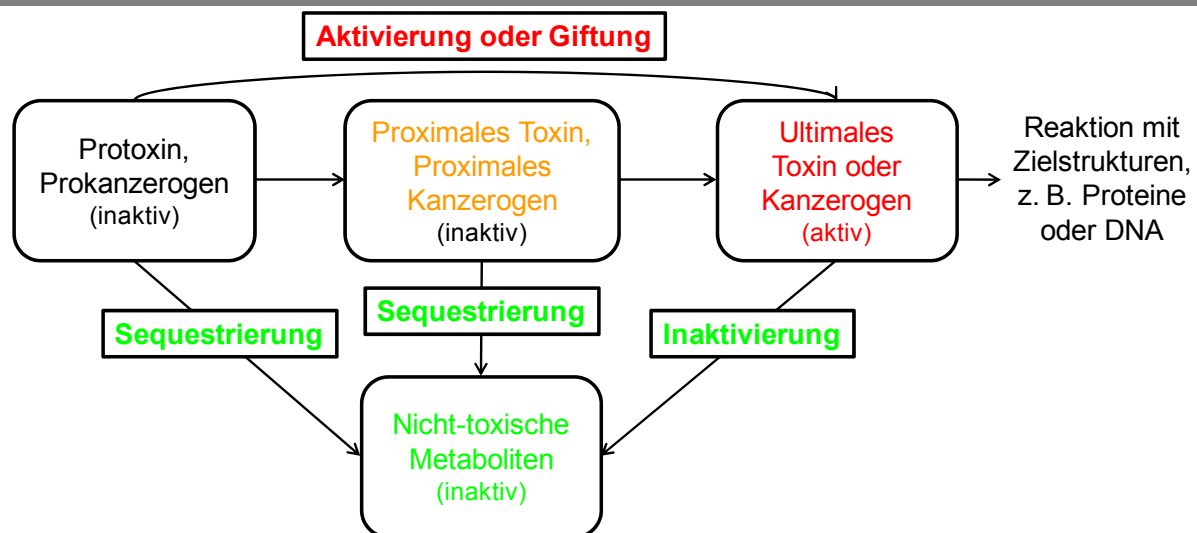
Lipophile Fremdstoffe (Xenobiotika; z. B. Arzneimittel, Umweltgifte oder Kontaminanten und Rückstände in Lebensmitteln), aber auch körpereigene lipophile Substanzen (z. B. Steroidhormone) können vom menschlichen und tierischen Organismus im Allgemeinen nicht direkt über die Niere ausgeschieden werden. Dies ist oft erst dann möglich, wenn die Wasserlöslichkeit dieser Stoffe erhöht wird. Um dies zu bewerkstelligen, haben sich bei allen höheren Lebewesen im Laufe der Evolution Enzymsysteme entwickelt, die lipophile Stoffe chemisch verändern und so deren Ausscheidung erleichtern oder erst ermöglichen. Den gesamten Prozess von der Aufnahme eines (nicht zwingend lipophilen) Fremdstoffes bis zur Ausscheidung des umgewandelten Metaboliten kann man aus pharmakokinetischer/ pharmakologischer Sicht in vier bis sechs Teile (*AL*)ADME gliedern:

- 1.) **A = Administration**, meint die gewollte oder ungewollte **Inkorporation** eines Stoffes (z. B. oral, dermal, inhalativ oder intravenös)

- 2.) **L = Liberation**, meint die **Freisetzung** des Stoffes, z. B. des Wirkstoffes aus einer Arzneimittelformulierung oder die Freisetzung von Stoffen aus komplexen Lebensmittelmatrices.
- 3.) **A = Absorption**, meint die **systemische Aufnahme** eines Stoffes in den Organismus, i. d. R. ist damit die Aufnahme in die Blutbahn gemeint.
- 4.) **D = Distribution**, meint die **Verteilung** des Stoffes im Organismus in verschiedenen Kompartimenten, d. h. Körperflüssigkeiten, Geweben und Organen
- 5.) **M = Metabolism**, meint die **Verstoffwechslung** des Stoffes im Organismus/in den Kompartimenten
- 6.) **E = Excretion**, beschreibt die **Ausscheidung** des Stoffes oder dessen Stoffwechselprodukte zum einen aus der Zelle und zum anderen aus dem Gesamtorganismus.

Die (AL)ADME-Prozesse sind zeitlich und örtlich nicht abgegrenzt, laufen also zeitlich zwar meist versetzt beginnend, aber nebeneinander in allen vom Stoff erreichten Kompartimenten ab. Auch werden nicht immer alle Stufen durchlaufen. So wird bei intravenös verabreichten Stoffen meist Punkt 2 übersprungen, andere Stoffe werden unabhängig von der Applikation quasi nicht metabolisiert und verlassen den Körper ohne Umwandlung oder reichern sich im Körper an. Im weiteren Sinne bezieht sich die Bezeichnung Fremdstoffmetabolismus oder Biotransformation auf den gesamten ALADME-Prozess, im engeren Sinne bezieht sich die Bezeichnung jedoch auf Punkt 5, also den Metabolismus. Da viele der vom Körper aufgenommenen Fremdstoffe toxische Eigenschaften besitzen, dient der Fremdstoffmetabolismus vermutlich der Entgiftung des Körpers (Bernhardt, 2004). Allerdings kann es auch zu einer (ungewollten) Aktivierung oder Giftung kommen. Dies ist dann der Fall, wenn die gebildeten Metaboliten toxischere Eigenschaften besitzen als die Muttersubstanz selbst (Mutschler, 2001). Abbildung 3 erläutert die Grundbegriffe dieser Prozesse. Per Definition müssen Protoxine erst metabolisch zu proximalen Toxinen und diese wiederum metabolisch zu ultimalen Toxinen umgewandelt werden. Letztere können ihre schädigende Wirkung direkt, also ohne weitere metabolische Umwandlungen entfalten. Bei Kanzerogenen ist dieser letzte Schritt allgemein die kovalente Bindung an DNA. Die Aktivierung zum ultimalen Toxin (Kanzerogen) kann mehrere enzymatische und spontane (nicht-enzymatische) Schritte beinhalten oder in einem einzelnen Schritt vollzogen werden. Sowohl Protoxine, als auch bereits gebildete proximale oder ultimale Toxine können enzymatisch oder spontan zu inaktiven, nicht-toxischen Metaboliten umgesetzt werden, was man als Sequestrierung, bzw. Inaktivierung bezeichnet. Beide Prozesse führen somit zu einer Detoxifizierung.





**Abbildung 3.** Grundbegriffe zur metabolischen Aktivierung.

Der Fremdstoffmetabolismus wird weiter in zwei bis vier Phasen unterteilt:

### Phase-I: Funktionalisierung

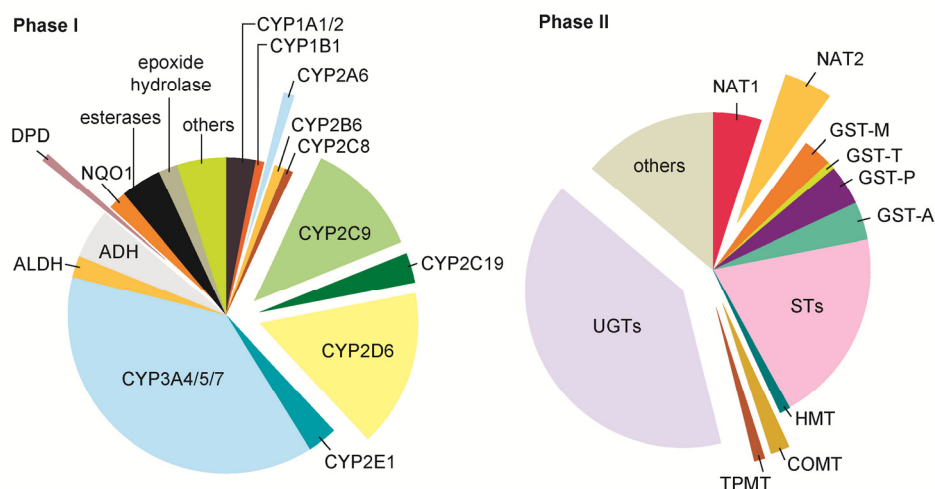
In Phase-I des Fremdstoffmetabolismus werden funktionelle Gruppen wie  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-CHO$  oder  $-COOH$  geschaffen oder neu in das Molekül eingeführt. Dies geschieht in fast allen Geweben, aber vor allem in der Leber, wo die für die Funktionalisierungsreaktionen nötigen Enzyme in besonders hoher Konzentration vorhanden sind. In Kapitel 2.2.1 werden die Phase-I-Reaktionen, insbesondere die Cytochrom P450 (CYP)-katalysierten, ausführlich vorgestellt. Die eingeführten funktionellen Gruppen können die Wasserlöslichkeit bereits ausreichend erhöhen, so dass eine renale Ausscheidung möglich ist. Oder sie dienen als „Ankergruppen“ für die weitere Umwandlung der Moleküle in Phase-II (Mutschler, 2001).

### Phase-II: Konjugation

Die in Phase-I des Fremdstoffmetabolismus in das Molekül eingeführten oder bereits vorhandenen funktionellen Gruppen werden in Phase-II enzymatisch an andere hydrophile Stoffe gekoppelt (konjugiert), wodurch die Hydrophilie weiter erhöht und die Ausscheidung über Niere und Galle ermöglicht wird. Neben der Erhöhung der Hydrophilie, ist das eigentliche Argument für die Ermöglichung der renalen Ausscheidung eines Stoffes, die Verringerung der Membrangängigkeit durch die Konjugation. Als Beispiel soll Ethanol dienen. Ohne Metabolismus hätte Ethanol bei rein renaler Ausscheidung eine Halbwertszeit von 24 Tagen im menschlichen Körper (Frey und Löscher, 2009). Dies resultiert daraus, dass Ethanol zwar einerseits recht hydrophil ist, aber andererseits auch klein und lipophil genug, um gut membrangängig zu sein. Folglich würde Ethanol permanent tubulär rückresorbiert und so der renalen Ausscheidung entzogen. Da die bei der Konjugation gebildeten Metaboliten oft

anionisch vorliegen, wird die Membrandurchlässigkeit drastisch gesenkt und die renale Ausscheidung erst ermöglicht. Zu den wichtigsten Phase-II-Reaktionen gehört die Konjugation mit Glucuronsäure durch Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UDP-GTs oder kurz UGTs), mit Glutathion (GSH) durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) oder die Sulfonierung mit Hilfe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS, „aktiviertes Sulfat“) durch Sulfotransferasen (SULT, vgl. Kap. 2.2.2.1), die Konjugation mit Aminosäuren, Acyl- oder Acetylresten z. B. durch *N*-Acetyltransferasen (NAT) sowie die Konjugation mit Methylgruppen durch *S*-Adenosylmethionin (SAM).

In Abbildung 4 ist die prozentuale Beteiligung verschiedener Phase-I- und -II-Enzyme am Fremdstoffmetabolismus gezeigt. Mit über 75 % sind CYPs dabei die prozentual wichtigsten bzw. häufigsten Phase-I-Enzyme. Die Situation bei Phase-II-Enzymen ist etwas heterogener. Hier stellen UGTs, SULTs und GSTs zusammen mit rund 75 % die wichtigsten Vertreter für die Katalyse von Phase-II-Reaktionen.



**Abbildung 4. Prozentualer Anteil verschiedener Enzyme an Phase-I- und -II-Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus.** Abkürzungen: ADH; Alkoholdehydrogenase, ALDH; Aldehyddehydrogenase, CYP; Cytochrom P450, DPD; Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, NQO1; NADPH:Chinon-Oxidoreduktase bzw. DT-Diaphorase, COMT; Catechol-*O*-Methyltransferase, GST; Glutathion-*S*-Transferase, HMT; Histamin-Methyltransferase, NAT; *N*-Acetyltransferase, STs; Sulfotransferasen, TPMT; Thiopurin-Methyltransferase, UGTs; Uridin-5'-trihydrogen-diphosphat-Glucuronosyltransferasen.

Aus/From: Evans WE, Relling MV, *Science*, 1999, 286, 5439, 487-91. Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from AAAS; © 1999.

This translation is not an official translation by AAAS staff, nor is it endorsed by AAAS as accurate. In crucial matters, please refer to the official English-language version originally published by AAAS.

### Phase-0 und -III: Aufnahme und Ausscheidung

Ergänzend zum Zweiphasenkonzept des Fremdstoffmetabolismus wird gelegentlich die aktive Aufnahme von Stoffen aus dem Blut in die Zellen als Phase-0 bezeichnet. Als Phase-III werden die aktiven Ausscheidungsprozesse von Substraten und Fremdstoffkonjugaten aus

der Zelle und manchmal auch aus dem Organismus bezeichnet. Diese aktiven Prozesse werden – neben Diffusion und passiven Transportvorgängen – mit Hilfe von Transportproteinen bewerkstelligt. Für die aktive Aufnahme von (Fremd)-Stoffen in die Zelle sind vor allem SLC-Transporter (*solute carrier transport proteins*) verantwortlich, z. B. OATPs (*organic anion transporting polypeptides*) und OATs/OCTs (*organic anion/cation transport proteins*). Für die aktive Ausscheidung aus der Zelle sind Effluxpumpen aus der Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporters*), z. B. MDR (*multi drug resistance proteins* oder *P-glycoproteins*), MRP (*multi drug resistance-related proteins*) und BCRP (*breast cancer resistance protein*) verantwortlich. Diese membrangebundenen Proteine oder Proteinkomplexe können ungeladene lipophile Substrate oder auch anionische Konjugate transportieren. Die finale Ausscheidung von Fremdstoffen oder deren Metaboliten aus dem Organismus kann dann, abhängig von deren physikalischen und chemischen Eigenschaften, z. B. über die Niere, die Galle und den Darm, die Atemluft oder mit der Muttermilch erfolgen.

### 2.2.1 Phase-I-Reaktionen

Neben Reduktionen und Decarboxylierungen, welche eine eher untergeordnete Rolle spielen, sind im Zusammenhang mit dem Fremdstoffmetabolismus im Wesentlichen zwei Funktionalisierungsreaktionen von besonderer Bedeutung:

#### Hydrolyse

Enzyme, die Hydrolysereaktionen katalysieren, heißen Hydrolasen. Wichtige Vertreter sind Esterasen und Amidasen, welche Ester, Thioester und Amide unspezifisch zu Alkoholen, Carbonsäuren, Thiolen und Aminen hydrolysieren. Ebenfalls zu den Hydrolasen gehören die Epoxidhydrolasen. Sie katalysieren die Hydrolyse von Epoxiden zu vicinalen Diolen. Hydrolasen befinden sich sowohl im endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch im Zytosol. Wegen Ihrer großen Bedeutung im Kontext dieser Arbeit und für den Fremdstoffmetabolismus im Allgemeinen wird die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) in Kapitel 2.2.1.10 ausführlicher besprochen.

#### Oxidation

Mehrere Enzymklassen katalysieren Oxidationsreaktionen. Als Beispiel seien Dehydrogenasen wie Alkoholdehydrogenasen (ADH) aufgeführt, welche Alkohole zu Aldehyden oxidieren. Diese wiederum können von Aldehyddehydrogenasen (ALDH) weiter zu Carbonsäuren oxidiert werden. Die weitaus wichtigste Gruppe von Enzymen, die Oxidationsreaktionen katalysieren, sind die Monooxygenasen. Man unterscheidet Flavin-abhängige-(FMO) und Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP). Diese unterscheiden sich neben ihrer

Struktur und ihrem Koenzym vor allem hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Da CYPs eine besondere Bedeutung innerhalb des Fremdstoffmetabolismus zukommt, werden sie im folgenden Kapitel (2.2.1.1) ausführlich vorgestellt.

### **2.2.1.1 Cytochrom P450-Enzyme**

Cytochrom P450 (CYP) bezeichnet eine Klasse von Hämproteinen mit enzymatischer Oxidoreduktaseaktivität. CYP-Enzyme kommen ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vor. Sie stellen eine Supergenfamilie dar, die mehr als 8000 Mitglieder aufweist (Denisov *et al.*, 2009). Im Rahmen des Humangenomprojekts wurden 57 Gene identifiziert, die verschiedene CYPs kodieren (Nelson, 2013). CYPs sind von großer Bedeutung für die Pharmakologie, Toxikologie und den Metabolismus vieler endogener und exogener Substrate. So katalysieren sie die Oxidation organischer Substrate mit Sauerstoff und spielen bei der Biosynthese, beim Stoffwechsel, bei der Entgiftung schädlicher Substanzen sowie in einigen Fällen bei der Aktivierung von Prokanzerogenen eine wesentliche Rolle. Da CYPs bei Lebensformen praktisch ubiquitär vorkommen, wird vermutet, dass bereits vor 3,5 Milliarden Jahren eine Urform des Enzyms entstand. Sicher ist, dass es bereits vor 2 Milliarden Jahren eine Präform des Enzyms gab, da zu diesem Zeitpunkt die Differenzierung zwischen Tier- und Pflanzenwelt stattfand (Nebert und McKinnon, 1994). Im menschlichen Körper werden CYPs in hoher Konzentration in der Leber exprimiert, welche durch sie ihre bekannte dunkelrote Farbe erhält. Der Begriff *Cytochrom* stammt aus dem Griechischen und bedeutet Zellfarbstoff. Die Zahl 450 weist auf das Absorptionsmaximum der Soret-Bande CO-komplexierter CYPs bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  hin (Omura und Sato, 1962). Andere Hämproteine weisen gewöhnlich ein Maximum bei  $\lambda = 420 \text{ nm}$  auf. Das P steht durch die farbgebenden Eigenschaften für „Pigment“. Entdeckt wurde Cytochrom P450 von Omura und Sato im Jahre 1958. Obgleich der hohen Anzahl verschiedener CYPs, gibt es nur eine CYP-Reduktase (NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase). Dieses Flavoprotein ist dafür zuständig, die für die CYP-katalysierte Monooxygenierung benötigten Reduktionsäquivalente ( $2 e^-$ ,  $2 H^+$ ), welche von NADPH geliefert werden, auf das CYP zu übertragen. Die Reduktase-Konzentration liegt bei etwa 1/10 der CYP Monooxygenase-Konzentration im Gewebe. Dies ist ausreichend, da die Monooxygenierung mittels CYP im Vergleich sehr langsam abläuft (Eisenbrand *et al.*, 2004).

### **2.2.1.2 Systematik der CYP-Enzyme**

Die Einteilung der CYP-Enzyme erfolgt aufgrund der Homologie in der Aminosäuresequenz. Enzyme mit mindestens 40 % Übereinstimmung werden einer Familie zugeordnet (Zahl), wobei es Ausnahmen von dieser Regel gibt. Dann erfolgt die Unterteilung der Familien in Subfamilien, deren Mitglieder in mindestens 55 % der AS-Sequenz übereinstimmen

(Buchstabe). Zum Schluss wird das individuelle Enzym beschrieben (Zahl). Ist die Bezeichnung kursiv geschrieben, z. B. *CYP1A1*, so steht diese Bezeichnung für das dem Enzym zugehörige Gen. Humane CYPs und CYPs der Ratte werden groß geschrieben, murine CYPs werden durch Kleinschreibung angezeigt (*cyp1a1*). Die Substratspezifität der meisten CYPs ist gering, was für die Metabolisierung eines breiten Spektrums von Substanzen von Vorteil ist (Eisenbrand *et al.*, 2005). Einige der wichtigsten Vertreter im menschlichen Organismus sind: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4. Wegen ihrer herausragenden Rolle für den Fremdstoffmetabolismus werden ausgewählte CYPs in Kapitel 2.2.1.9 ausführlich vorgestellt.

### 2.2.1.3 Struktur der Cytochrom P450-Enzyme

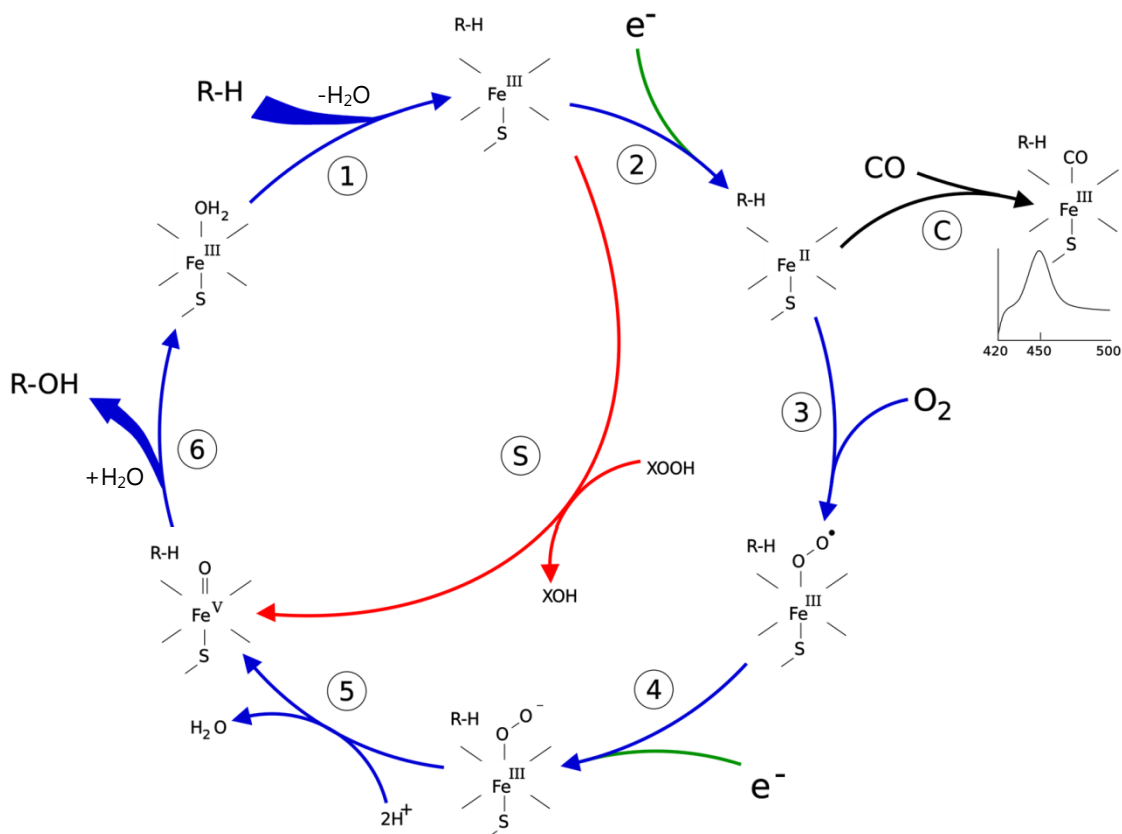
Strukturell haben CYPs Ähnlichkeiten mit anderen Hämproteinen wie Hämoglobin oder weiteren Cytochromen (z. B. Cytochrom *c*). Im aktiven Zentrum befindet sich ein sechsfach koordiniertes Eisenion in oktaedrischer Umgebung, dessen vier äquatoriale Bindungsstellen über die Stickstoffatome eines Protoporphyrin-IX-Ring komplexiert sind. Eine axiale Position wird durch die Bindung des Proteins an die prosthetische Gruppe besetzt, welche vom Cystein-Schwefel ausgebildet wird. Die zweite axiale Position kann dativ von Sauerstoffspezies besetzt werden und ist somit der Wirkort der enzymatischen Reaktion. Im nicht-substratgebundenen Zustand bindet in dieser Position ein Hydroxidion oder ein Wassermolekül über das Sauerstoffatom, im substratgebundenen Zustand wird dort der für spätere Monooxygenierung verwendete Sauerstoff gebunden (Lippard *et al.*, 1995).

### 2.2.1.4 Reaktionsmechanismus CYP-vermittelter Oxygenierungen

CYPs sind Monooxygenasen, d. h. sie übertragen ein Sauerstoffatom auf das gebundene Substrat. In Abbildung 5 ist der für die Substratmetabolisierung postulierte Katalysezyklus dargestellt, welcher aus <sup>18</sup>O-Markierungsexperimenten, der Regioselektivität der Hydroxylierungsreaktionen und anderen Informationen abgeleitet wurde, die zum großen Teil auf Untersuchungen des Enzyms aus Lebermikrosomen sowie des P450<sub>CAM</sub>-Enzyms beruhen. P450<sub>CAM</sub>, oder CYP101 war das erste CYP, das gereinigt und dessen Kristallstruktur bestimmt wurde. Es ist ein zytosolisches CYP aus *Pseudomonas putida*, einer gramnegativen Bakteriengattung. Der Name leitet sich daher ab, dass dieses Enzym Campher hydroxyliert (Lippard und Berg, 1995). Die einzelnen Schritte des Katalysezyklus werden nachfolgend näher erläutert:

- Schritt 1:** Bindung eines Substratmoleküls (R-H) an das Fe<sup>3+</sup>-Zentrum und Verdrängung aller in der substratbindenden Tasche vorhandenen Wassermoleküle
- Schritt 2:** Aufnahme eines Elektrons von der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (aus NADPH); Reduktion des Fe<sup>3+</sup> zum Fe<sup>2+</sup> (→ hohe Affinität zu O<sub>2</sub>)

- Schritt 3:** Aufnahme von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ )
- Schritt 4:** Bildung eines Oxenoids durch Aufnahme eines zweiten Reduktionsäquivalents
- Schritt 5:** Nach Addition von Protonen: Spaltung der O-O-Bindung unter Bildung von Wasser
- Schritt 6:** Homolytische Spaltung der R-H-Bindung des Substrates, Rekombination zum oxygenierten Produkt und dessen Abspaltung nach folgender Gleichung:  
 $R-H + \text{„Fe}^V=O\text{“} \rightarrow [R\cdot + \text{Fe}^{IV}-OH]$ ;  $[R\cdot + \text{Fe}^{IV}-OH] + H_2O \rightarrow ROH + \text{Fe}^{III}-OH_2$   
 („Rebound-Mechanismus“)
- „ $\text{Fe}^V=O$ “ (Compound I) ist als rein formale Struktur aufzufassen. Beweise für einen  $\text{Fe}^{5+}$ -Zustand gibt es bislang nicht. Mößbauer- und ESR-Untersuchungen lassen eine Ferrylspezies ( $\text{Fe}^{4+}$ ) wahrscheinlicher erscheinen, wobei die verbleibende Ladung über den Porphyrinring und Thiolat-Liganden delokalisiert ist (Rittle und Green, 2010; Jung *et al.*, 2011).
- Schritt S:** „peroxide shunt“: Bezeichnet einen alternativen Mechanismus, bei dem nach Schritt 1 direkt ein Eisen-Oxo-Intermediat gebildet wird. Der Sauerstoff wird in diesem Fall von Peroxiden oder Hypochloriten geliefert.
- Schritt C:** Bindet CO an den  $\text{Fe}^{2+}$ -Komplex ist der Katalysezyklus irreversibel unterbrochen. Der CO-Fe(II)-Komplex ist verantwortlich für das namensgebende Differenzspektrum mit einer Bande bei  $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ .



**Abbildung 5.** Für Cytochrom P450-Enzyme vorgeschlagener Katalysemechanismus der Oxidation eines Kohlenwasserstoffs R-H (nach Lippard und Berg, 1995; Lewis und Pratt, 1998. Abbildung modifiziert aus Richfield, 2008; *public domain*).



### **2.2.1.6 Organspezifische und zelluläre Lokalisation**

Durch CYP-katalysierte Biotransformationen finden in erster Linie und (von spezialisierten CYPs abgesehen) in der Leber statt (vgl. Tabelle 3, Seite 21). mRNA und Enzymaktivitäten verschiedener CYPs sind aber in fast allen Organen nachweis- oder induzierbar, besonders in der Niere, Lunge, Haut, Plazenta, Gehirn und im Intestinum. In letzterem kommt zusätzlich der Biotransformation durch die mikrobielle Darmflora, welche vor allem für Reduktionen und Hydrolysen verantwortlich ist, eine besondere Bedeutung zu (Mutschler *et al.*, 2001). Eukaryotische CYPs sind membrangebundene Enzyme und innerhalb der Zelle an der Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER), der Kernmembran oder der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Sono *et al.*, 1996; Berka *et al.*, 2011; Khandwala und Kasper, 1973; Ortiz de Montellano, 2005).

### **2.2.1.7 CYP-Aktivität und Polymorphismen**

Die Konzentration von CYPs bzw. deren Aktivität hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, z. B. der Spezies und Gewebeart, dem Alter, dem Ernährungszustand sowie dem Einfluss von Induktoren (bewirken eine vermehrte Expression eines Enzyms) oder Inhibitoren (bewirken eine verringerte Expression oder Aktivität eines Enzyms). Oft sind Substrate eines Enzyms auch gleichzeitig Induktoren (Autoinduktion). Es gibt mehrere Induktionsmechanismen. Zum Beispiel kann die Induktion durch (meist rezeptorvermittelte) Erhöhung der Transkription und somit erhöhter Translation des Enzyms erfolgen. Auch die Stabilisierung der betreffenden mRNA oder des Proteins selbst sind Möglichkeiten die Enzymexpression und somit die Gesamtaktivität zu erhöhen. Von besonderem pharmakologischem und toxikologischem Interesse sind drei Induktorenklassen, die über die jeweils gleichen Induktionswege wirken und nach ihren Prototypen unterteilt sind: TCDD-, Phenobarbital- und Rifampicin-Typ.

Induktoren vom TCDD-Typ sind vor allem planare aromatische Kohlenwasserstoffe, z. B. TCDD, Methylcholanthren, Phenanthren oder Benzo[*a*]pyren. Sie wirken über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR). Im Zytoplasma liegt der AhR als Heterooligomer komplexiert mit zwei Hsp90-Einheiten (*Heat shock protein*, 90 kDa) und dem Protein XAP2 (*Hepatitis B virus X-associated protein*) vor. Beide Proteine fungieren als Chaperone, teilweise dient auch p23 (*Heat shock protein*, 23 kDa) als Co-Chaperon. Bindet ein Ligand nun an den AhR und aktiviert diesen, wandert der Komplex in den Zellkern, wo die Chaperone abgespalten werden und wieder ins Zytoplasma gelangen. Im Zellkern bindet der Ligand-AhR-Komplex an den *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT). Diese aktive Form des Rezeptors bindet an spezielle *Dioxin* bzw. *Xenobiotic responsive elements* (DER/XRE) unter anderem in der 5'-Kontrollregion vor dem *CYP1A*-Gen, was zur Transkriptionsaktivierung



---

mehrerer Gene der AhR-Genbatterie führt. Neben der Induktion von Phase-I-Enzymen wie CYP1A1/A2 und CYP1B1 werden auch mehrere Phase-II-Enzyme wie z. B. die Glutathion-S-Transferase  $\gamma$ -Untereinheit (A1), Aldehyd-3-Dehydrogenase, UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 und der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase induziert (Rowlands und Gustafsson, 1997; Schrenk, 1998). Induktoren des Rifampicin-Typs wirken über den PXR (*pregnan x receptor*). Die Liganden binden an den PXR und der aktivierte PXR-Komplex bildet ein Heterodimer mit dem RXR (*retinoid X receptor*), welches dann an der XREM-Region (*xenobiotic-responsive enhancer module*) z. B. des CYP3A4-Gens bindet. Hierdurch kommt es zu Wechselwirkungen mit der Promotorregion des Gens, was eine verstärkte Transkription und Expression z. B. von CYP3A4 bewirkt (Robertson *et al.*, 2003). Phenobarbitalartige Induktoren wirken über CAR (*constitutive androstane receptor*) am PBREM (*phenobarbital-responsive enhancer module*) aktiviert.

Enzym-Inhibitoren können ihre Wirkung ebenfalls über verschiedene Mechanismen entfalten. So kann die Bildung des Enzyms selbst verringert oder verhindert, der Abbau des Enzyms verstärkt, oder das Enzym durch Bindung eines Inhibitors ganz oder teilweise inaktiviert werden. Im letzteren Fall wird eine starke aber reversible Bindung des Inhibitors und die irreversible Bindung, die zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms führt (*suicide inhibition*) unterschieden. Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Inhibitor und Substrat um die Bindung an ein Enzym. Damit eine potente Inhibition stattfinden kann, muss die Affinität des Enzyms zum Inhibitor größer sein, als zum Substrat.

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor sind die bei verschiedenen Enzymen natürlich auftretenden Polymorphismen, wodurch die gleichen Isoenzyme bei gleichem Induktionsstatus eine unterschiedliche Aktivität aufweisen. Unter Polymorphismus versteht man das Vorhandensein von Genvariationen (Sequenzvariationen) eines oder mehrerer Allele innerhalb einer Population. Sind mindestens 1 % einer Population von der Genvariation betroffen, spricht man von Polymorphismus, sind es weniger, so spricht man von Mutation. Tritt diese Genvariation in einem Bereich der DNA, welche für ein Enzym kodiert, so kann diese Variation die Aktivität des entsprechenden Genprodukts (Enzym) beeinflussen. Von Polymorphismen sind nicht nur fast alle CYPs betroffen, sondern auch viele Phase-II-Enzyme und weitere, nicht am Fremdstoffmetabolismus beteiligte Enzyme. Dieser Umstand ist von hohem medizinischem Interesse, da Unterschiede in der Metabolisierungsgeschwindigkeit Auswirkungen auf die effektive Dosis und somit auf die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Medikamenten haben. Dadurch kann es zu unterschiedlichen Arzneimittelneben- und Wechselwirkungen kommen. Auch epigenetische Faktoren können die Enzymaktivität

beeinflussen. Das prominenteste Beispiel für einen Polymorphismus bei humanen CYPs ist *CYP2D6* (Genotyp), da die *CYP2D6*-Aktivität hier zwischen null und „ultraschnell“ variieren kann. Die Mehrheit der Bevölkerung gehört zum schnellen Phänotyp (*extensive metabolizer*), welche eine normale (hohe) *CYP2D6*-Aktivität besitzen und das Allel *CYP2D6\*1* aufweisen. Es sind weitere Allelvarianten bekannt, die zu keiner oder einer extrem hohen *CYP2D6*-Aktivität führen. Die *CYP2D6*-Aktivität beim „ultraschnellen“ Phänotyp (*ultrarapid metabolizer*, *CYP2D6\*2*) kann durch das Vorhandensein mehrerer Kopien des *CYP2D6*-Gens hintereinander zehn- bis 200-fach höher sein als beim langsamen Phänotyp (*poor metabolizer*, z. B. *CYP2D6\*3* oder *CYP2D6\*9*), welche keine oder eine drastisch verminderte *CYP2D6*-Aktivität aufweisen. Die Aktivität kann *in vivo* durch Messung der Rate der Biotransformation von Debrisoquin zu 4-Hydroxydebrisoquin ermittelt werden, was besonders dann klinisch notwendig ist, wenn Medikamente verabreicht werden sollen, die durch *CYP2D6* aktiviert (*Prodrugs*) oder abgebaut (metabolisiert) werden. Zudem ist *CYP2D6* als eines der wenigen CYPs nicht induzierbar (Omiecinski *et al.*, 1999; Ortiz de Montellano, 2005).

### 2.2.1.8 Induktion durch Aroclor 1254

Aroclor ist ein Eigenname der Fa. Monsanto (USA) und bezeichnet eine Mischung verschiedener polychlorierter Biphenyle. Die Bezeichnung Aroclor wird durch vier Ziffern ergänzt, von denen die ersten beiden Ziffern die Anzahl der Kohlenstoffatome und die beiden letzten den mittleren Chlorgehalt in Gewichtsprozent angeben (Ausnahme Aroclor 1016; UNEP, 1999). Aroclor 1254 induziert eine Reihe verschiedener hepatischer mikrosomaler Enzyme wie z. B. Epoxidhydrolasen und diverse CYPs (Parkinson *et al.*, 1983) und bewirkte bei Nagern bereits nach 12 Stunden eine signifikante Zunahme des Lebergewichtes (Marquardt und Schäfer, 1994). So werden z. B. *CYP1A2*, *2C9*, *2C19*, *2D6*, *2E1* und *3A4* bei der Ratte durch Aroclor 1254 (*in vivo* und *in vitro*) induziert (Easterbrook *et al.*, 2001a), aber auch einige Phase-II Enzyme wie Glutathion-S-Transferasen oder bestimmte Glucuronosyltransferasen.

### 2.2.1.9 Wichtige humane Cytochrom P450-Enzyme

Im nachfolgenden wird auf prominente humane CYPs und deren Eigenschaften näher eingegangen. Im linken Schaubild von Abbildung 4 (Seite 10) wurde der prozentuale Anteil von verschiedenen CYPs und anderen Phase-I-Enzymen am Fremdstoffmetabolismus gezeigt. In Ergänzung dazu sind in Tabelle 2 die Gehalte verschiedener prominenter CYPs in der menschlichen Leber zusammengefasst. Somit kommen den Enzymen der *CYP3A*-Subfamilie nicht nur in Bezug auf die prozentuale Rolle im Fremdstoffmetabolismus, sondern auch in Bezug auf die exprimierte Menge in der Leber eine besondere Bedeutung zu.

**Tabelle 2.** Durchschnittliche Gehalte verschiedener CYPs in humanen Lebermikrosomen ( $n = 72$ ; nach Shimada *et al.*, 1994)

CYP	Gehalt	Anteil am CYP-Gesamtgehalt
	[pmol/mg Protein]	[%]
1A2	37 ± 24	13
2A6	13 ± 13	4,0
2B6	0,68 ± 1,4	0,15
2C9	55 ± 28	20
2D6	4,5 ± 2,9	1,7
2E1	20 ± 13	6,6
3A4	87 ± 53	29
<b>Summe</b>	<b>217 ± 107</b>	<b>73</b>

**CYP1A1** und **CYP1A2** sind beide beteiligt am Fremdstoffmetabolismus und haben ein breites, aber ähnliches Spektrum an Substraten, Induktoren und Inhibitoren. Substrate sind u. a. (polyzyklische) aromatische Kohlenwasserstoffe und heterozyklische Aromaten. Im menschlichen Körper wird CYP1A2 vor allem in der Leber gebildet, wohingegen CYP1A1 in der menschlichen Leber, trotz nachweisbarer *CYP1A1* mRNA nicht, oder nur in äußerst geringen Mengen nachweisbar ist. Obgleich die konstitutive Expression von CYP1A1 gering ist, wird sie z. B. in der Lunge durch Zigarettenrauch oder in der Plazenta nach Exposition mit polychlorierten Biphenylen induziert. Beide Enzyme spielen eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese, da sie unter anderem heterozyklische aromatische Amine (z. B. aus gebratenen oder gegrillten Lebensmitteln) *N*-hydroxylieren können und somit die Bildung ultimaler Kanzerogene bzw. Mutagene einleiten (vgl. Kapitel 2.5). In humanen Hepatozyten wird durch TCDD verstärkt CYP1A2, in primären Rattenhepatozyten verstärkt CYP1A1 induziert (Murray *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2006). In Tabelle 3 sind ausgewählte Substrate, Induktoren und Inhibitoren von CYP1A1, CYP1A2 und weiterer wichtiger CYPs aufgeführt.

Wichtigste xenobiotische Substrate von **CYP2A6** sind Nikotin und tabakspezifische Nitrosamine. Viele Publikationen berichteten einen Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten, resultierenden Krebsrisiken und der CYP2A6-Aktivität (Pianezza *et al.*, 1998). Die Hypothese lautet, dass Raucher mit verringerter CYP2A6-Aktivität einen verminderten Nikotin-Stoffwechsel aufweisen und daher weniger rauchen, als Raucher mit normaler CYP2A6-Aktivität (Yoshida *et al.*, 2002; Styn *et al.*, 2013). Ein vermindertes Krebsrisiko scheint biologisch auch deshalb nachvollziehbar, weil die Aktivierung vieler Tabakinhaltstoffe bei einer erniedrigten CYP2A6-Aktivität ebenfalls verringert ist (Kamatagi *et al.*, 1999). Der vermutete Zusammenhang zwischen CYP2A6-Geno- bzw. Phänotyp und der Lungenkrebsinzidenz

konnte jedoch jüngst nicht bestätigt werden (Liu *et al.*, 2013). Bislang wurde kein anderes CYP neben 2A6 identifiziert, welches die 7-Hydroxylierung von Cumarin katalysiert. Diese sehr spezifische Reaktion wird daher auch für die klinische Diagnostik von CYP2A6 herangezogen.

Die humane **CYP2C**-Subfamilie besteht aus vier Mitgliedern: CYP2C8, 2C9, 2C18 und 2C19. CYP2C9 und 2C19 spielen im Fremdstoffmetabolismus eine bedeutendere Rolle als 2C8 und 2C18. Obgleich das Substratspektrum der vier CYP2C-Enzyme ähnlich ist, sind 2C8 und 2C18 generell katalytisch langsamer als 2C9 und 2C19. CYP2C9 macht rund 20 % und CYP2C19 weniger als 5 % des hepatischen mikrosomalen CYP-Gesamtgehalt aus. Beide Enzyme sind nach CYP3A4 und 2D6 die bedeutendsten für den Metabolismus vieler pharmakologischer Substrate.

Obgleich **CYP2D6** nur rund 5 % des CYP-Gehaltes in der Leber ausmacht, ist es das zweitbedeutendste Phase-I-Enzym für die Metabolisierung einer Reihe von Arzneistoffen. Neben den bereits erwähnten Polymorphismen (vgl. Kapitel 2.2.1.7) ist eine weitere Besonderheit von CYP2D6, dass bislang keine Induktoren für dieses Enzym bekannt sind, es also nicht induzierbar ist.

**CYP2E1** ist induzierbar durch Isoniazid und Ethanol (EtOH). Letzteres stellt ebenfalls ein bedeutendes Substrat für CYP2E1 dar. Es wurde lange angezweifelt, dass ein kleines, hydrophiles Molekül wie EtOH ein Substrat für CYPs sein kann und eine Rolle bei dessen Metabolismus spielt. Tatsächlich scheint CYP2E1 erst bei hohen EtOH-Konzentrationen bzw. Dosen einen bedeutenden metabolischen Beitrag zu leisten (Kashiwagi *et al.*, 1982; Kono *et al.*, 1999). Die Regulation von CYP2E1 verläuft über HNF-1 (*hepatocyte nuclear factor 1*) (Ueno und Gonzalez, 1990). CYP2E1 ist neben CYP1A2 und 3A4 hauptsächlich verantwortlich für die Bildung des toxischen Paracetamol-Metaboliten *N*-Acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI, Patten *et al.*, 1993). Weiterhin bewirkt CYP2E1 die Metabolisierung von Halothan, was in seltenen Fällen zur Halothan-Hepatitis, einer allergischen Reaktion, führen kann (Bourdi *et al.*, 1996).

**CYP3A4** ist eines der wichtigsten CYPs, da es das breiteste Substratspektrum besitzt und das meistexprimierte CYP im menschlichen Körper darstellt. Es ist am Metabolismus von über der Hälfte der zugelassenen Arzneimittel beteiligt. Aus dieser Tatsache resultiert allerdings auch, dass CYP3A4 die meisten unerwünschten Metabolisierungsreaktionen und Wechselwirkungen bei Medikamenten aufweist. Im menschlichen Körper wird CYP3A4 vor allem in der Leber exprimiert, wo es auch quantitativ mit bis zu 30 % (Shimada *et al.*, 1994) das mit Abstand häufigste CYP darstellt. Es wird aber auch in anderen Geweben und Organen wie dem Darm

und dem Gehirn exprimiert. Interessanterweise wird CYP3A4 bei Neugeborenen nicht, dafür allerdings CYP3A7 gebildet, welches ein ähnlich breites Spektrum an Substraten aufweist. In den ersten Lebensmonaten wird die Expression von CYP3A7 dann kontinuierlich geringer und die Expression von CYP3A4 beginnt (Ekroos und Sjogren, 2006).

Wichtige Eigenschaften der angesprochenen CYPs, sowie prominente Substrate, Induktoren und Inhibitoren sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.** Substrate, Induktoren, Inhibitoren, Vorkommen und charakteristische Markerreaktionen von für den Fremdstoffmetabolismus wichtigen Cytochrom P450-Enzymen

CYP	Substrate	Induktoren	Inhibitoren	Hauptvorkommen <sup>1</sup>	Assay
<b>1A1</b>	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), Ethoxyresorufin	Zigarettenrauch dioxinartige PCBs, Dioxine, Quercitin	$\alpha$ -Naphthoflavon, Ellipiticin, Cimetidin	Lunge, Plazenta, Lymphozyten, Monozyten	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD), 7-Methoxyresorufin-O-Deethylase (MROD)
<b>1A2</b>	zyklische aromatische Amine, Brokkoli, gegrilltes Fleisch, Phenacetin, Koffein	Zigarettenrauch dioxinartige PCBs, Dioxine, Isosafrol, Enoxacin	Furafyllin, Fluvoxamine, $\alpha$ -Naphthoflavon	Leber, nicht in der Lunge	EROD, MROD, Phenacetin-O-Deethylase
<b>2A6</b>	Nikotin, Nitrosamine, Cumarin, Koffein	Phenobarbital, Rifampicin, Ethinylestradiol	Tranlylcypromin, Methoxypsoralen	Leber, nasopharyngealer Bereich	Cumarin-7-Hydroxylase
<b>2C9</b>	(S)-Warfarin, Diclofenac, Tolbutamid, Phenytoin	Rifampicin, Phenobarbital	Sulfaphenazol, Fluconazol	Leber	Diclofenac-4'-Hydroxylase
<b>2C19</b>	Omeprazol, (S)-Mephenytoin	Rifampicin, Phenobarbital	Tranlylcypromin, (S)-N-3-Benzylinirvanol, Fluconazol	Leber	(S)-Mephenytoin-N-Demethylase
<b>2D6</b>	Codein, Nitrosamine, Debrisoquin, Spartein, Bufuralol	keine	( $\pm$ )-Chinidin	Leber, Lunge, Gehirn	Bufuralol-1'-Hydroxylase nach Inhibition mit Chinidin
<b>2E1</b>	Ethanol, Enfluran, Benzen, Furan, Dichlormethan, Chlorzoxazon, Vinylchlorid, Paracetamol, Acrylamid, Ethylcarbammat	Ethanol, Isoniazid, Fasten	Aceton, Diethyldithiocarbamat, Pyridin, Disulfiram	Leber, Lunge, Dünndarm	Chlorzoxazon-6-Hydroxylase
<b>3A4</b>	Aflatoxin B <sub>1</sub> , Cyclophosphamid, Cyclosporin, Steroide, Midazolam, Testosteron	Rifampicin, Steroide, Dexamethason, Phenobarbital	Ketoconazol, Troleandomycin, Furocumarine und Naringenin aus Grapefruitsaft	Leber, Dünndarm	Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylase

<sup>1</sup> Die Verteilung der mRNA in verschiedenen Geweben ist einsehbar unter <http://biogps.org>.

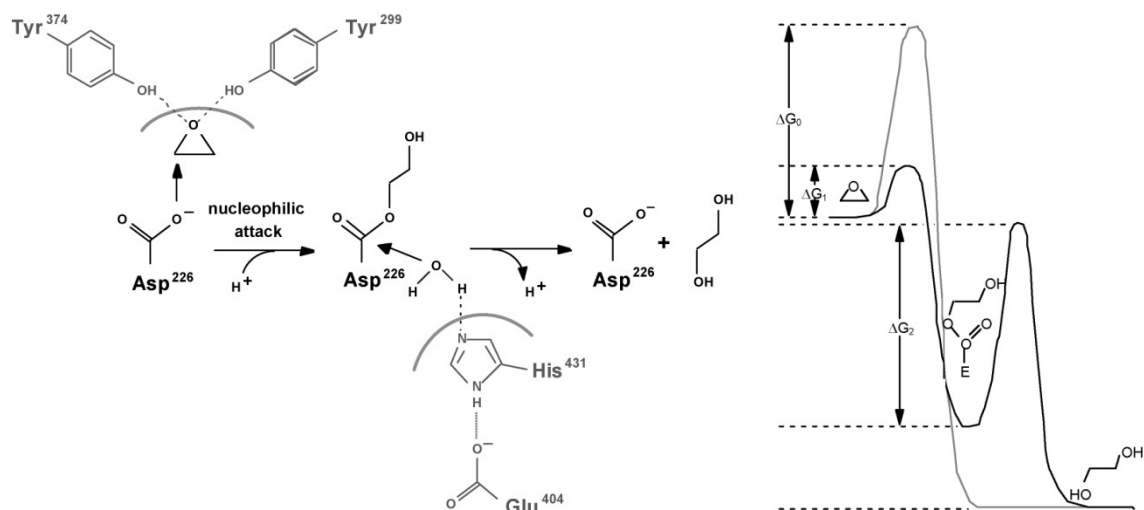
Quellen: Brandon *et al.*, 2003 und Quellen darin; Rose und Hodgson, 2004; Ortiz de Montellano, 2005 und Quellen darin.

### 2.2.1.10 Mikrosomale Epoxidhydrolase

Epoxide sind häufig auftretende Phase-I-Metaboliten von olefinischen und aromatischen Verbindungen. Die Halbwertszeiten der gebildeten Epoxide variieren stark und liegen in wässriger Lösung zwischen weniger als 1 s und mehreren Monaten. Mikrosomal gebildete Epoxide sind wegen ihrer elektrophilen, reaktiven Eigenschaften die ultimalen Metaboliten vieler Kanzerogene, z. B. PAKs, Aflatoxine, Acrylamid, Vinylchlorid oder Styrol. Das Schicksal von Epoxiden in biologischen Systemen beinhaltet hauptsächlich drei Wege: i) die spontane (= nicht enzymatische) kovalente Bindung an nukleophile Zentren von Nukleinsäuren oder Proteinen; ii) die spontane Isomerisierung von Arenepoxiden zu Phenolen; iii) die spontane oder enzymatische Reaktion mit Glutathion (über GSTs) oder Hydrolyse mit Wasser (über Epoxidhydrolasen, EH).

Mikrosomale Epoxidhydrolasen (mEH) spielen – neben den zytosolischen Formen (*soluble* EHs, sEH) – im Körper eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung mikrosomal gebildeter Epoxide, in dem sie diese zu *trans*-Diolen hydrolysieren. Wie bei den Reaktionen anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme kann es aber auch durch Einwirken von EHs zu einer Aktivierung kommen, wie es bei polyzyklischen aromatischen Verbindungen der Fall ist. Zum Beispiel wird aus Benzo[*a*]pyren über CYPs und mEHs *anti*-Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-oxid gebildet, eines der potentesten ultimalen Kanzerogene, welches dann aber selbst kein Substrat mehr für mEHs oder sEHs darstellt.

Der wahrscheinliche Reaktionsmechanismus der enzymatischen Epoxidhydrolyse durch EHs (Arand *et al.*, 1994; Oesch *et al.*, 2004) ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7.** Katalytische Triade zum Mechanismus der enzymatischen Epoxidhydrolyse am Beispiel von Oxiran durch mEH sowie Energiediagramme der katalysierten Reaktion (schwarz) und der nicht-katalysierten Reaktion (grau).

Aus/mit freundlicher Genehmigung von: Arand *et al.*, *EXCLI J*, **2003**, 2, 22-30.

Im ersten Schritt der Reaktion erfolgt ein nukleophiler Angriff eines Carboxylatrestes (Aspartat) der mEH an das elektrophilere oder sterisch ungehindertere Kohlenstoffatom des Epoxids, wodurch eine kovalente Esterbindung zwischen Protein und Substrat gebildet wird. In nachfolgenden Schritt findet die eigentliche Hydrolyse statt: Der Hydroxy-Ester wird durch ein Wassermolekül, welches durch Wasserstoffbrückenbindung zu einem Histidinrest der mEH aktiviert ist, nukleophil am Carbonylkohlenstoff angegriffen. Als Reaktionsprodukt wird unter Regeneration des Enzyms das aus dem Epoxid gebildete Diol freigesetzt (Müller *et al.*, 1997, Oesch *et al.*, 2000 und 2004). Der erste Reaktionsschritt verläuft sehr schnell, während die Hydrolyse des Esters i. A. mit Wechselzahlen von weniger als  $1 \text{ s}^{-1}$  sehr langsam verläuft. Die langsame Regeneration des Enzyms wird im Körper weitgehend durch die hohe Konzentration, in der mEH und andere lösliche Epoxidhydrolasen vorliegen, kompensiert. In der menschlichen Leber liegt die mEH in einer Konzentration zwischen 10 und 50  $\mu\text{mol}$  pro kg Lebergewebe vor. Die mEH wirkt somit gewissermaßen als Schwamm für mikrosomal gebildete Epoxide, da sie diese schnell kovalent bindet und so detoxifiziert (Oesch *et al.*, 2004). Betrachtet man nur die Bindung des Epoxids, so kann man EHs als *high capacity, low affinity*-Enzyme klassifizieren. Neben der Hydrolyse werden Epoxide häufig über GSTs mit Glutathion konjugiert und zu Mercaptursäuren sequestriert.

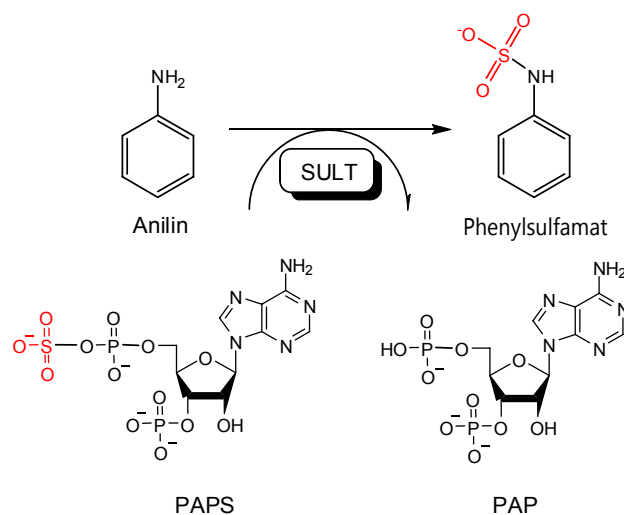
## 2.2.2 Phase-II-Reaktionen

Nachdem in Phase-I des Fremdstoffmetabolismus funktionelle Gruppen in den (lipophilen) Fremdstoff eingeführt wurden, erfolgt nun in Phase-II die Konjugation. Elektrophile Phase-I-Metaboliten wie Epoxide oder Chinone reagieren bevorzugt mit Glutathion und werden zu Mercaptursäuren prozessiert. Nukleophile Phase-I-Metaboliten, z. B. Alkohole oder Phenole werden bevorzugt mit Glucuronsäure konjugiert oder sulfoniert. Prinzipiell stehen alle Phase-II-Reaktionen in Konkurrenz zueinander, teilweise auch mit anderen Phase-I-Reaktionen (z. B. bei Alkoholen die Reaktion mit Alkoholdehydrogenasen). Die Konkurrenz zwischen Glucuronidierung und Sulfonierung ist am weitesten ausgeprägt. Ausnahmen bilden *N*-Oxide und Hydroxamsäuren, welche nahezu ausschließlich sulfoniert werden oder Carbonsäuren, die nicht sulfoniert werden. Die gebildeten Konjugate sind i. d. R. leichter ausscheidbar, weil sie anionisch, gut wasserlöslich und wenig membrangängig sind. Eine Ausnahme bildet Minoxidil (ein aromatisches *N*-Oxid), nach dessen Sulfonierung die Wasserlöslichkeit sogar sinkt.

### 2.2.2.1 Sulfonierung und Glucuronidierung

Sulfotransferasen (SULTs) übertragen die Sulfogruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS, „aktiviertes Sulfat“) auf Hydroxy-, Amino-, Sulfhydryl- und *N*-Oxid-

Gruppen von Substraten. Wird die Hydroxylgruppe eines organischen Moleküls durch SULTs sulfoniert, entsteht ein (organischer) Schwefelsäureester. Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch wird die somit biochemisch nicht ganz korrekte Bezeichnung „Sulfatierung“ häufig für diese Art der Reaktion verwendet. Wird hingegen eine Aminogruppe sulfoniert, entsteht als Produkt eine Sulfamidsäure ( $\equiv$  Amidosulfonsäure) und kein Sulfat, was Abbildung 8 verdeutlicht.

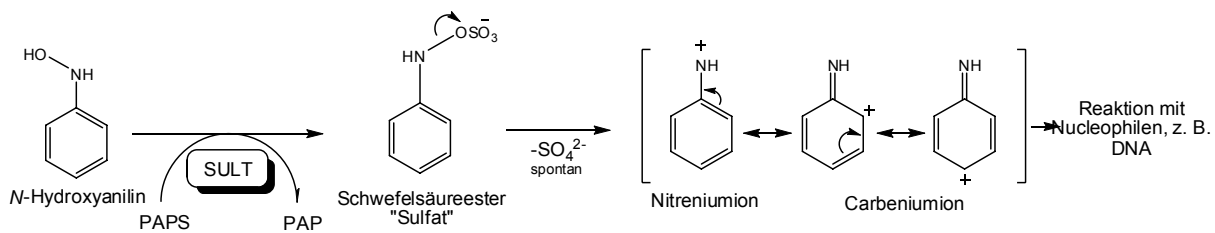


**Abbildung 8.** Sulfonierung von Anilin durch Sulfotransferasen (PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; PAP: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat).

Fremdstoffmetabolisierende SULT (26–35 kD, 13 humane Formen bekannt) sind lösliche Enzyme und liegen vorrangig im Zytoplasma vor. Im Gegensatz dazu sind UGTs (50–56 kD, 22 humane Formen) im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. SULTs haben ein ausgeprägtes Spektrum endogener Substrate (Steroide, Catecholamine, Serotonin, Gallensäuren), während UGTs nur wenige endogene Substrate besitzen (Bilirubin, Schilddrüsenhormone). Die Gefahr, dass bei der Konjugation reaktive Metaboliten gebildet werden ist bei UGTs relativ gering, während viele Beispiele für Aktivierungen durch SULTs bekannt sind. Dies liegt daran, dass anionisches Sulfat (bei der Sulfonierung von Alkoholen oder Phenolen) in bestimmten Molekülen eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt. Der organische Schwefelsäureester kann spontan, also nicht-enzymatisch anorganisches Sulfat abspalten und es entsteht ein reaktives, elektrophiles Carbokation. Ist dieses mesomeriestabilisiert, ist die Reaktivität besonders hoch, da das Kation dann eine vergleichsweise hohe Lebensdauer und somit lange Diffusionsstrecken zurücklegen kann (z. B. allylische und benzyllische Alkohole, aromatische Hydroxylamine). Als Beispiel ist in Abbildung 9 die Sulfonierung von *N*-Hydroxyanilin und die Bildung des entsprechenden Kations gezeigt.



Welche Phase-II-Reaktion bevorzugt abläuft (Glucuronidierung oder Sulfonierung) hängt nicht allein von der Spezifität zum Substrat ab. Wichtige Faktoren sind neben der Spezies, das Alter, die Substratkonzentration und der CYP-Induktionsstatus. Katzen sind z. B. ausgeprägte „Sulfonierer“ während in Schweinen und Kaninchen die Glucuronidierung verstärkt stattfindet. Der Mensch und die Ratte liegen dazwischen. Beim Menschen werden bereits in frühen fötalen Stadien *SULT* exprimiert, während die Bildung von *UGTs* erst perinatal beginnt.



**Abbildung 9.** Metabolische Aktivierung von *N*-Hydroxyanilin: Sulfonierung, Abspaltung von Sulfat und Bildung des mesomeriestabilisierten Kations.

Dadurch dass PAPS in der Leber schneller depletierbar ist, ist die Sulfonierung bei niedrigen Substratkonzentrationen begünstigt, während bei höheren Konzentrationen das Ausmaß der Glucuronidierung zunimmt. Bei hohem CYP-Induktionsstatus gewinnt die Glucuronidierung an Bedeutung, da die Konzentration der Phase-I-Metaboliten steigt und eine Koinduktion von *UGTs* stattfinden kann, während *SULT* in der Regel nicht oder nur sehr gering durch CYP-Induktoren induzierbar sind. Als kinetische Faustregel gilt, dass *SULT* eine hohe Substrataffinität aber langsam sind bzw. eine geringe Kapazität aufweisen (*low capacity, high affinity*) und *UGTs* eine geringe Affinität, aber eine hohe Kapazität (*high capacity, low affinity*). Die Konzentration von PAPS in der Leber beträgt rund 30–70 nmol/g, was einem Gesamtgehalt von *ca.* 100 µmol pro adulter Leber entspricht. Zum Vergleich enthält eine Paracetamol-Tablette (500 mg) über 3300 µmol des Wirkstoffes. Die Neusyntheserate von PAPS in der Zelle ist aber trotz der niedrigen basalen Konzentration sehr schnell, so dass selbst bei vollständiger PAPS-Depletion nach nur einer Minute die PAPS-Speicher wieder gefüllt werden können.

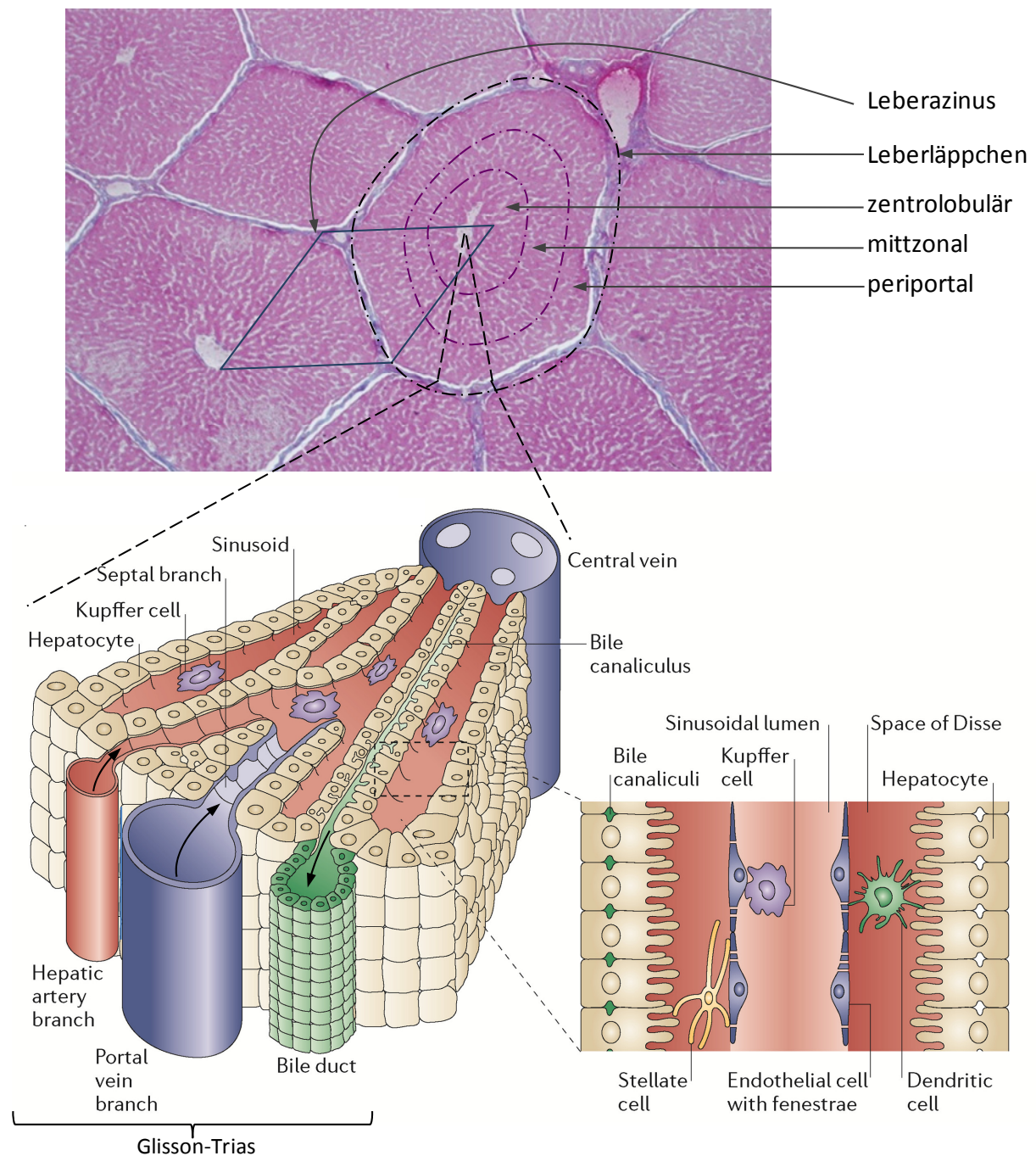
Das Nomenklaturschema von *SULTs* und *UGTs* ist an die Nomenklatur von *CYPs* angelehnt. Die wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden *SULTs* sind *SULT1A1-1A4*, *1B1*, *1C3* und *2A1*. Wie *CYPs* werden auch *SULTs* und *UGTs* vorrangig in der Leber, aber auch in Niere, Darm, Gehirn oder Geschlechtsorganen, exprimiert und weisen zahlreiche Polymorphismen auf. Die Bedeutung von Polymorphismen ist wegen der geringen Substratspezifität bei *UGTs* weniger von Bedeutung als für *SULTs*.

## 2.3 Die Leber als Entgiftungsorgan

Die Leber stellt das zentrale Organ für den Stoffwechsel und die größte Drüse des Organismus dar und ist das erste Organ, welches das nähr- und mitunter fremdstoffreiche Blut aus dem Darm passiert. Die endogenen Aufgaben der Leber sind vielseitig und umfassen die Verwertung, Speicherung sowie Synthese von Energie- und Nährstoffen, Vitaminen, Ketonkörpern, Albumin und z. B. Gerinnungsfaktoren. Daneben besteht eine der Hauptaufgaben im Ab- bzw. Umbau und der Entgiftung von körpereigenen- und körperfremden Substanzen mit dem Ziel diese über Galle oder Niere auszuscheiden.

Makroskopisch wird die Leber zunächst in einzelne Leberlappen und weiter in verschiedene Segmente untergliedert. Mikroskopisch lassen sich schon bei geringer Vergrößerung als anatomische Einheit meist sechseckige Strukturen erkennen; die ca. 1–2 mm großen Leberläppchen (*Lobuli hepatici*; Abbildung 10 oben). Die funktionelle Einheit ist der Leberazinus (Raute zwischen den Zentralvenen zweier benachbarter Leberläppchen) (Abbildung 10 unten). Gespeist wird die Leber zu ungefähr 75 % aus der Pfortader (*vena portæ*) und zu 25 % aus der Leberarterie (*arteria hepatica propria*). Die Pfortader sammelt das Blut von Dün- und Dickdarm, Magen, teilweise auch Milz und Bauchspeicheldrüse. Über feine Äste der Pfortader gelangt es in die Leberläppchen, wo es sich mit dem arteriellen, sauerstoffreichen Blut vermischt. Dadurch kommt es oft schon bei der ersten Passage eines im Gastrointestinaltrakt resorbierten Stoffes zu einer ausgeprägten Metabolisierung in der Leber (*First-pass-Effekt*) wodurch die Bioverfügbarkeit reduziert wird. Bei manchen Arzneimitteln wird dieser Effekt gezielt ausgenutzt, wenn ein Medikament als (unwirksames) *Prodrug* peroral verabreicht wird, welches erst in der Leber zu einem Wirkstoff metabolisiert wird (z. B. Metamizol, Omeprazol). Dies kann insbesondere dann sinnvoll sein, wenn der eigentliche Wirkstoff instabil ist, zur Vermeidung des *First-pass-Effekts*, zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit oder zur Überwindung von Blutschranken. Im Gegensatz dazu wird das mehrfache Zirkulieren von Stoffen zwischen Leber, Gallenblase und Darmtrakt als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet, wodurch im Allgemeinen die Bioverfügbarkeit von Stoffen und deren Wirkungsdauer erhöht wird. Die abführenden Gefäße der Leberläppchen sind die Zentralvenen, welche sich zu immer größeren Gefäßen vereinigen und in der *vena cava inferior* münden. In den Kapillarräumen zwischen zuführenden Gefäßen und Zentralvene (Sinosoide), mischt sich das arterielle mit dem venösen Blut. Die Sinosoide sind mit stark fenestriertem Endothel ausgekleidet, besitzen keine Basalmembran und stellen so über den Disse-Raum die Verbindung zu den parenchymalen (funktionellen) Leberzellen, den Hepatozyten, her. Durch fadenförmige Fortsätze der Hepatozyten (Mikrovilli) wird die Oberfläche stark vergrößert und der Stoffaustausch verbessert. Die Hepatozyten sind in

radialen Balken um die Zentralvene angeordnet, machen ungefähr 80 % des Lebertolumens aus und haben eine Lebensdauer von 200–300 Tagen.



**Abbildung 10.** Oben: Leberlobuli (Wildschwein (*Sus scrofa*); Schnitt; HE-Färbung; 10-fache Vergrößerung). Unten: Schematische Darstellung des Segmentes eines Leberläppchens. Nähere Erläuterungen im Fließtext.  
 Mit freundlicher Genehmigung von: Oben/top: © 2007 Sarah Werning. Used with permission. Unten/bottom: Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, Adams and Eksteen, 2006, 6, 246, © 2006.

Die restlichen nicht-parenchymalen, sinusoidalen Leberzellen sind hauptsächlich Endothelzellen, Kupfferzellen (ortsständige Makrophagen), Pit-Zellen (Lymphozyten) und Ito-

Zellen (*stellate cells*; Speicherung von Fetten und Vitamin A). Die Hepatozyten produzieren ferner die Gallenflüssigkeit, welche über feine, nicht mit Endothel ausgekleidete Gallenkanälchen in periportal Richtung gesammelt wird und über den interlobulären Gallengang das Leberläppchen verlässt. Diese Gallengänge vereinigen sich im weiteren Verlauf zu einem gemeinsamen Gallengang (*ductus hepaticus communis*), welcher über den Gallenblasengang mit der Gallenblase verbunden ist und schließlich im Zwölffingerdarm endet. Bei der Ratte gibt es eine anatomische Besonderheit; hier gelangt die produzierte Galle direkt in den Zwölffingerdarm, da sie keine Gallenblase besitzt. Die anatomische Anordnung aus den beiden zuführenden Blutgefäßen und des abführenden Gallengangs an den Ecken eines Leberläppchens nennt man Portalfelder oder Glisson-Trias. Innerhalb eines Leberläppchens besteht ein Gradient von periportal nach zentrolobulär an Sauerstoff, Nährstoffen und weiteren körpereigenen und körperfremden Stoffen. Dieser Gradient bedingt morphologische und funktionelle Unterschiede bzw. eine gewisse Spezialisierung der Hepatozyten bezüglich ihrer Lokalisierung innerhalb eines Leberläppchens. Zum Beispiel sind periportale Hepatozyten im Allgemeinen größer, seltener mehrkernig und weisen höhere Aktivitäten bei der Glukoneogenese, Fettsäureoxidation, Cholesterin-, Harnstoff- und Proteinsynthese auf. Zentrolobulär sind Glykolyse, Fettsäuresynthese und Glutaminsynthese verstärkt. Im Hinblick auf den Fremdstoffmetabolismus bestehen ebenfalls Unterschiede: Periportal werden vorwiegend ADHs und SULTs, zentrolobulär vermehrt CYPs, UGTs und GSTs exprimiert.

### 2.3.1 Untersuchung des hepatischen Fremdstoffmetabolismus

Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Leberstoffwechsel bzw. den Fremdstoffmetabolismus der Leber zu untersuchen. Aktivität (und Expression) von CYP-Enzymen liegt nicht nur in *in vivo* Systemen vor, sondern kann auch in kultivierten Zellen oder in speziellen Zellfragmenten, den Mikrosomen untersucht werden. Auch wenn man versucht, bereits früh humane oder humanisierte Modelle zu untersuchen, die möglichst nah an der *in vivo*-Situation sind, gelingt dies aus ethischen, wissenschaftlichen oder ökonomischen Gründen nicht immer, so dass man gerade in der Evaluierungs-, bzw. Entwicklungsphase von Versuchen oder Prüf- und Zulassungsprozessen auf alternative, billige und gut verfügbare Surrogate oder andere Spezies zurückgreifen muss. In Tabelle 4 sind einige Vor- und Nachteile der heute üblichen Modelle des Lebermetabolismus gegenübergestellt. Die wichtigsten, darunter die in dieser Arbeit verwendeten Modelle, werden nachfolgend erläutert. Eine vertiefende Übersicht bieten z. B. Brandon *et al.*, 2003 (allgemein); Knasmüller *et al.*, 2004 (Leberzelllinien) sowie Godoy *et al.*, 2013 (Untersuchung des hepatischen Fremdstoffmetabolismus in 2D- und 3D-(Primär-)Zellkulturen).

## Mikrosomen

Mikrosomen sind keine funktionelle oder anatomische Einheit einer Zelle, also keine Organellen wie der Zellkern oder das Lysosom. Als Mikrosomen bezeichnet man die aus Organgewebe oder Zellen aus Zellkulturen mittels differentieller Zentrifugation von anderen Zellbestandteilen abgetrennten Membranbestandteile (vgl. Kap. 7.2.1.1). Sie enthalten hauptsächlich Bruchstücke und kleine ( $d \sim 100 \text{ nm}$ ) membranbegrenzte Vesikel des endoplasmatischen Retikulums (ER), der Plasmamembran und verschiedenen anderer endozytotischer Vesikel. In Mikrosomen liegen somit die unlöslichen (nicht-zytosolischen) Enzyme – in Lebermikrosomen (LM) vor allem CYPs – dann in hoher Konzentration vor. Der Vorteil von Mikrosomen liegt zum einen in der einfachen Isolierung und nahezu unbegrenzter Lagerungsfähigkeit. Weitere Vorteile sind, dass die native Enzymverteilung (und deren Aktivitäten) des Ursprungsorgans oder der Ursprungszelle weitgehend erhalten bleibt und der isolierte Phase-I-Metabolismus ohne Berücksichtigung von Phase-II-Reaktionen oder Eliminierungsprozessen untersucht werden kann.

**Tabelle 4.** Vergleich etablierter *in vitro* Lebermodelle mit der Situation *in vivo* in Hinblick auf verschiedene laborrelevante Parameter.

Modell	Parameter	Handhabung	Beschaffung, Verfügbarkeit	biologische Komplexität	Ähnlichkeit zur <i>in vivo</i> -Situation	Kosten
aufgereinigte Enzyme	einfach					
rekombinant exprimierte Enzyme in Mikrosomen (z. B. Supersomes™)						
Mikrosomen (± Zytosol)						
S9-Mix						
(transgene) Zelllinien						
primäre Hepatozyten						
3D-Sandwich-Primärkultur						
Leberdünnschnitte						
isoliert perfundierte Leber						
<i>in vivo</i> <span style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 5px;"> <div style="display: inline-block; border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; width: 10px; height: 10px; margin-right: 5px;"></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="font-size: 8px; margin-bottom: 2px;">Tier</div> <div style="font-size: 8px;">Mensch</div> </div> </span>	aufwendig	schwierig bis unmöglich	komplex	gut	gering	teuer

Zudem spielt eine eventuell schlechte Zellpermeabilität oder Bioverfügbarkeit der zu untersuchenden Substanzen keine Rolle. Damit die in Mikrosomen enthaltenen Enzyme ihren

Dienst leisten können, müssen die entsprechenden sonst zytosolisch vorkommenden Kofaktoren, also bei CYPs NADPH, supplementiert werden. Um zusätzlich auch bestimmte Phase-II-Reaktionen zu untersuchen kann S9 (Überstand der differentiellen Zentrifugation nach 10 min 1.000 *g* und 10–20 min 9.000 *g*) verwendet werden, welcher neben den mikrosomalen auch zytosolische Enzyme enthält. Auch hier müssen die benötigten Kofaktoren supplementiert werden. Einige rekombinant hergestellte Phase-II-Enzyme sind ebenso kommerziell verfügbar.

### **Supersomes™**

Möchte man den Metabolismus einzelner CYPs untersuchen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Aufgereinigte Enzyme haben eine gewisse Aktivität, wenn Sie mit den entsprechenden Kofaktoren und Koenzymen supplementiert werden (NADPH, NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase), erreichen aber nicht die Aktivität mikrosomaler Enzyme, bei denen eine gewisse, für die Funktion wichtige, Membranintegrität teilweise erhalten bleibt. Das meist verwendete Werkzeug zur Untersuchung einzelner CYPs sind Mikrosomen aus Wirtszellen in denen das ein beliebiges CYP (zusammen mit der CYP-Reduktase) rekombinant exprimiert wurde. Im Falle von Supersomes™ wird dazu die cDNA des CYPs (und der CYP-Reduktase, z. T. auch Cytochrom *b*<sub>5</sub>, welches die katalytische Aktivität einiger CYPs steigert) in einen vom Baculovirus abgeleiteten Vektor transfiziert und in Insektenzellen (Sf9) exprimiert. Die Anforderungen an die exprimierende Zelle sind, dass keine anderen Enzyme der jeweiligen Enzymklasse konstitutiv exprimiert werden. In Supersomes™-Insektenzellen werden keine basalen (humanen) CYP-Aktivitäten beobachtet. Diverse weitere Vektor- und Wirtszellsysteme werden benutzt, darunter, Bakterien-, Hefe- und Säugetierzellen sowie stabil transfizierte B-lymphoblastoide Zelllinien z. B. GentestMicrosomes™ (Gonzalez und Korzekwa, 1995).

### **Zellsysteme**

Der nächste Schritt in Richtung *in vivo*-Situation sind immortalisierte Zelllinien (z. B. HepG2; humane Hepatomzelllinie oder H4IIE; Rattenhepatomzelllinie), transgene Zelllinien und primäre Hepatozytenkulturen. Der Vorteil von Zelllinien liegt in der ständigen Verfügbarkeit, sie weisen aber als Krebszellen z. T. starke morphologische und funktionelle Unterschiede zu primären Hepatozyten auf. Primäre Hepatozyten sind hingegen nur kurze Zeit kultivierbar und proliferieren kaum. Dafür bleiben viele Enzyme auch *in vitro* induzierbar und der komplette Phase-I- und -II-Metabolismus, bedingt auch Transportprozesse, können so untersucht werden. Um auch Eigenschaften des Zell-Zell-Verbandes eines Organs abzubilden, gibt es etablierte dreidimensionale Modelle (Sandwich-Primärzellkulturen).

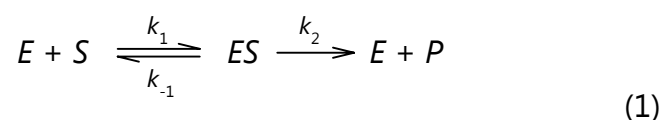
## Organoide Kulturen

Sind auch Zellsysteme keine geeigneten Modelle, so kann man auf Leberdünnschnitte zurückgreifen, welche für kurze Zeit kultiviert werden können. Sie gewährleisten den Erhalt des mikroskopischen Aufbaus (Leberläppchen), volle Zell-Zell-Kommunikation/-stoffaustausch und die Funktion der Kapillargefäßsysteme (z. B. Gallenkanälchen) bleibt für kurze Zeit aufrechterhalten. Die letzte Stufe vor der tatsächlichen Situation *in vivo* ist die Untersuchung des isoliert perfundierten Gesamtorgans.

## 2.4 Enzymkinetik

Zur quantitativen Beschreibung wie potent eine bestimmte Reaktion durch ein gegebenes Enzym oder eine gegebene Enzymmischung katalysiert wird, können enzymkinetische Parameter gemessen und berechnet werden. In der Regel werden diese Parameter eines Enzyms durch Untersuchung der Produktbildung oder Substratabnahme bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Die verbleibende Substratmenge oder -konzentration ist meistens experimentell einfacher zugänglich und beide Methoden liefern äquivalente Ergebnisse (Nath und Atkins, 2006). Dies kann freilich nur dann der Fall sein, wenn genau ein Enzym genau ein Produkt bildet. In Lebermikrosomen ist dies nur in seltenen Ausnahmefällen der Fall. So wurden bei allen Untersuchungen in dieser Arbeit von den verschiedenen lebermikrosomalen Enzymen mehrere Produkte gebildet. Auch bei Supersomes<sup>TM</sup>, wo die Beteiligung nur eines Enzyms am Phase-I-Metabolismus angenommen wird, wurden stets mehrere Produkte gebildet. In dieser Arbeit wurden daher immer die Produktbildungen statt der Abnahme des Substrats analysiert.

Zur Beschreibung kinetischer Prozesse haben Leonor Michaelis und Maud Menten (1913) die nach ihnen benannte Theorie der Enzymkinetik entwickelt. Gleichung 1 beschreibt (vereinfacht) die enzymkatalysierte Bildung von einem Produkt  $P$  aus Substrat  $S$ . Dabei ist  $E$  das Enzym,  $ES$  der Enzym-Substrat-Komplex und  $k$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktionen.



Aus dieser Reaktionsgleichung lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung 2 ableiten:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

mit:  $v$  = Bildungsgeschwindigkeit des betrachteten Produktes oder Metaboliten  
 $v_{\max}$  = maximale Bildungsgeschwindigkeit des betrachteten Produktes oder Metaboliten  
 $[S]$  = Startkonzentration des Substrats (= der Testsubstanz)  
 $K_M$  = Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit

In der biochemischen Interpretation sind zwei Grenzfälle von besonderer Bedeutung:

1. Bei sehr **hoher Substratkonzentration** ist das Enzym gesättigt, so dass die Produktbildungsrate konstant bleibt. Ist also  $[S]$  viel größer als  $K_M$ , unterscheiden sich die Beträge von  $K_M + [S]$  und  $[S]$  nur wenig. Somit kann  $K_M$  im Nenner vernachlässigt werden und  $[S]$  kürzt sich aus dem Bruch. Es folgt  $v = v_{\max}$ .
2. Ist  $K_M$  hingegen viel größer als  $[S]$ , wie es im Falle sehr **kleiner Substratkonzentrationen** meist der Fall ist, kann  $[S]$  im Nenner der Michaelis-Menten-Gleichung vernachlässigt werden. Somit folgt  $v = \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot [S]$ . Hieraus wird ersichtlich, dass der Term  $\frac{v_{\max}}{K_M}$  nun ein Maß für die Reaktions- bzw. Bildungsgeschwindigkeit bei sehr kleinen Substratkonzentrationen darstellt. In dieser Arbeit wird dieser Term als **katalytische Effizienz** mit  $E_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{K_M}$  bezeichnet.

$K_M$  ist die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit, was direkt ersichtlich wird, setzt man  $K_M = [S]$  in die Michaelis-Menten-Gleichung ein. Es folgt  $v = v_{\max}/2$ . Unter gewissen Voraussetzungen ( $k_2 \ll k_1'$ ) ist  $K_M$  in der biochemischen Interpretation ein Maß der Affinität eines Enzymes zum Substrat.

### Kooperativität

Das Phänomen der Kooperativität wurde zuerst bei oligomeren Enzymen (darunter auch Rezeptoren und Transporter) beobachtet, also Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind und in jeder Untereinheit ein aktives Zentrum haben. Die Bindungsstärke eines Liganden bzw. Substrates an ein kooperatives Enzym ist abhängig davon, wie viele Liganden bereits am Enzym gebunden sind. Somit verändern sich mit der Substratkonzentration auch die kinetischen Profile, die dann nicht mehr hinreichend mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden können. Erste Arbeiten wurden von Archibald Hill im Jahre 1910 veröffentlicht. In der Folge wurde die Beschreibung von kooperativem Verhalten von Enzymen durch Erweiterung der Michaelis-Menten-Gleichung um den Hill-Koeffizienten  $n_H$  erweitert (Gleichung 3). Erhöht die Bindung des ersten Liganden



die Bindungsaffinität des zweiten Liganden spricht man von positiver Kooperativität ( $n_H > 1$ ), wird die Affinität gesenkt, spricht man von negativer Kooperativität ( $n_H < 1$ ). Das erste und prominenteste Beispiel ist die Sauerstoffbindung an Hämoglobin, welches aus vier Untereinheiten besteht ( $n_{\text{theor.}} = 4$ ) und für das ein empirischer Hill-Koeffizient zwischen  $n_H = 2,5$ – $3,5$  bestimmt wurde (Bellelli, 2010; Holt und Ackers, 2009). Dies bedeutet, dass die Affinität von Hämoglobin zu Sauerstoffmolekülen mit der Zahl bereits gebundener Liganden steigt. Diese Affinitätsänderungen können gering sein, sich aber auch wie beim Hämoglobin um mehrere Größenordnungen erstrecken. Positive Kooperativität ist anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufs im  $v/[S]$ -Diagramm einfach zu identifizieren. Negative Kooperativität ist optisch schwieriger zu erkennen, da der Kurvenverlauf hyperbolisch bleibt.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^{n_H}}{K^{n_H} + [S]^{n_H}} \quad (3)$$

mit:  $v$  = Bildungsgeschwindigkeit des betrachteten Produktes oder Metaboliten  
 $v_{\max}$  = maximale Bildungsgeschwindigkeit des betrachteten Produktes oder Metaboliten  
 $[S]$  = Startkonzentration des Substrats (= der Testsubstanz)  
 $n_H$  = Hill-Koeffizient (dimensionslos)  
 $K$  = Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Entspricht bei der Michaelis-Menten-Gleichung ( $n_H = 1$ ) der Michaelis-Menten-Konstanten  $K_M$ . Im Falle der Hill-Gleichung (bei  $n_H \neq 1$ ) wird  $K$  meist als  $K_{0,5}$  bzw.  $[S]_{50}$  bezeichnet. Aus praktischen Gründen wird in dieser Arbeit  $K$  stets als  $K_M$  bezeichnet).

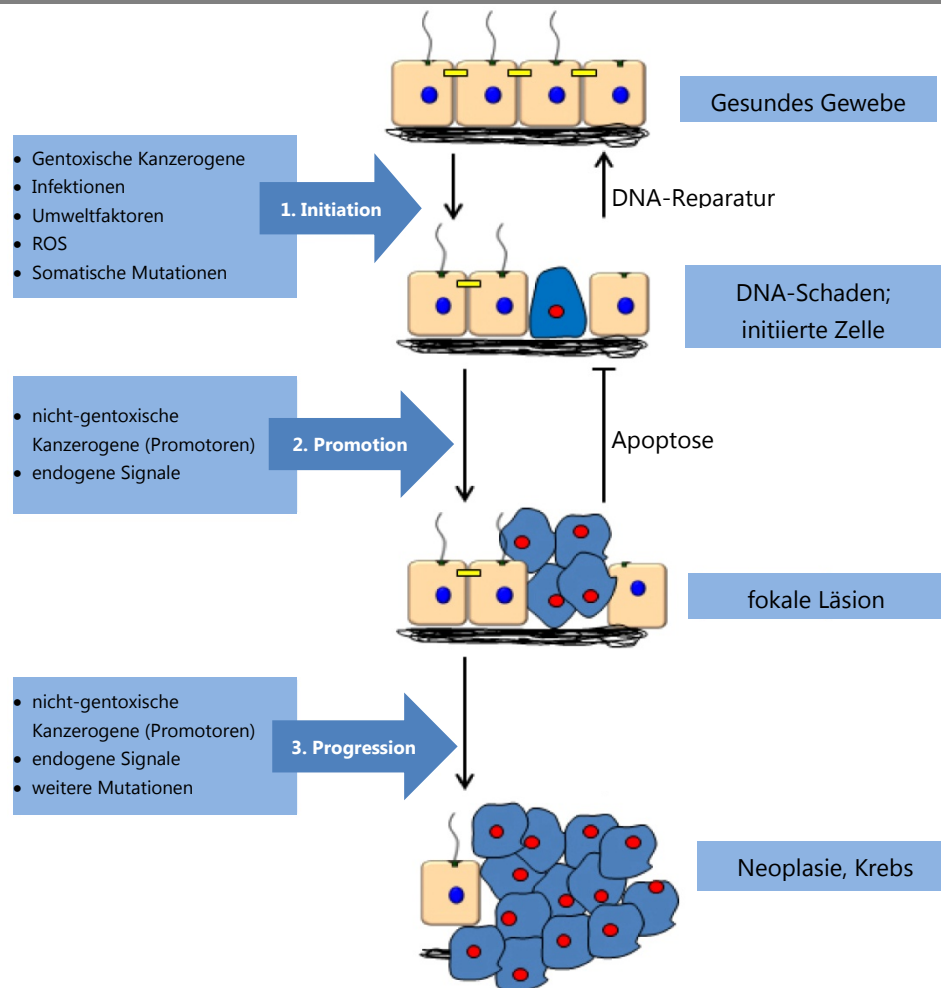
Obwohl die Mehrheit der Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) nur ein aktives Zentrum besitzen, sind CYPs mit mehr als ein aktiven Zentrum bekannt (Catalytic Site Atlas, 2013) und Kooperativität ein bekanntes Phänomen (z. B. Denisov *et al.*, 2009; Isin und Guengerich, 2006; Atkins *et al.*, 2002). Auch in humanen Lebermikrosomen wurden mit Kooperativität assoziierte allosterische Effekte beobachtet (Bowalgaha *et al.*, 2007). Diese „funktionelle Kooperativität“ kann wahrscheinlich auf mehrere molekulare Mechanismen zurückgeführt werden (Sohl *et al.*, 2008; Denisov und Sligar, 2012). Hauptsächlich dürften klassische allosterische Effekte von Substraten und Liganden, räumlich entfernt vom aktiven Zentrum des Enzyms sowie die Bindung mehrerer Liganden im Bereich der Substrat-Bindungstasche des Enzyms, gefolgt von einer sterischen Umlagerung und somit einer Neuorientierung des Substrats, hin oder weg vom aktiven Zentrum, eine Rolle spielen. Auch Oligomerisierung wird als Ursache diskutiert (Denisov *et al.*, 2009). Man unterscheidet homo- und heterotrope Kooperativität, je nachdem ob mehrere gleiche oder mehrere verschiedene Substrate bzw. Liganden mit dem Enzym wechselwirken. Die biochemische Interpretation des Hill-Koeffizienten  $n_H$  ist bei monomeren Enzymen nicht geklärt. Insbesondere bei lebermikrosomalen Inkubationen sollte man  $n_H$  daher eher als einen nicht näher spezifizierten apparenten Korrekturfaktor denn als quantitatives Maß für (funktionelle) Kooperativität auffassen.

## 2.5 Chemische Kanzerogenese

Der Begriff Kanzerogenese (auch Karzinogenese oder Carcinogenese) beschreibt die komplexen Prozesse der Tumor- bzw. Krebsentstehung. Dieser Prozess ist in der Regel ein multifaktorieller, mehrstufiger und meist langjähriger Prozess, der mit einer Schädigung der genomischen DNA beginnt. Eine solche Schädigung kann durch chemische (z. B. kanzerogene Chemikalien, ROS) biologische (z. B. Viren) oder physikalische Wechselwirkung mit energiereicher Strahlung (z. B. UV-C, Radioaktivität) ausgelöst werden.

### 2.5.1 Mechanismen der chemischen Kanzerogenese

Im Falle der durch chemische Kanzerogene induzierten Kanzerogenese (s. Abbildung 11) beginnt der Weg mit der Bildung eines elektrophilen Agens (z. B. ein Metabolit), welches mit der DNA (Nukleophil) reagiert und z. B. kovalente DNA-Addukte bildet. Im weiteren Verlauf kann das gebildete DNA-Addukt eine Mutation der DNA auslösen (Mutagenese). Dagegen wirkt die (prinzipiell sehr effiziente) DNA-Reparatur. Greift die Reparatur jedoch nicht und liegt die Mutation in einem Gen, welches für Zellteilung oder Zellzyklus verantwortlich ist (z. B. Aktivierung von Protoonkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen), bezeichnet man die einzelne mutierte Zelle als initiiert; den Prozess als **Initiation**. Hat die initiierte Zelle nun Gelegenheit sich zu teilen, kann sich die Mutation irreversibel manifestieren. Dieser Schritt wird als **Promotion** bezeichnet und kann über endogene Signalwege (z. B. über Wachstumsfaktoren oder Entzündungsreize) aber auch durch exogene Tumorpromotoren angeregt werden. Die resultierende Krebszelle ist zumeist dedifferenziert, proliferiert unkontrolliert und weist morphologische und biochemische Veränderungen auf. Im weiteren Verlauf können durch weitere Zellteilungen nun fokale Läsionen (präneoplastische Herde; *Foci*) entstehen. Sowohl gegen die Teilung einer einzelnen initiierten Zelle, als auch gegen die weitere Vermehrung vieler Zellen einer neoplastischen Läsion wirkt u. a. die Apoptose. Diese kann von der betroffenen Zelle selbst oder durch äußere Reize ausgelöst werden und bewirkt, dass die initiierte(n) Zelle(n) gezielt und planmäßig absterben. Die Apoptose stellt somit im Gegensatz zur Nekrose und zusammen mit der Autophagozytose und dem caspasenunabhängigen Weg eine Form des „programmierten Zelltods“ dar. Geschieht dies nicht, kann in der weiteren Folge aus präneoplastischen Läsionen im Laufe der Zeit ein makroskopisch sichtbarer Tumor gebildet werden. Dieses Stadium bezeichnet man als **Progression**. In dieser Phase werden durch zusätzliche Mutationen und andere Faktoren die weitere Entdifferenzierung, die Wachstumsautonomie und die Malignität des tumoralen Herdes begünstigt und verstärkt (Knasmüller *et al.*, 2001; Römpf, 2013).



**Abbildung 11.** Klassisches Drei-Stufen-Modell der chemischen Kanzerogenese. Abbildung modifiziert nach/figure adapted from: Radford *et al.*, *Int J Mol Sci*, **2013**, 14, 19416-33. Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from: MDPI - Open Access Publishing.

Die Beschreibung der Krebsentstehung anhand dieses klassischen dreistufigen Modells stellt eine starke Vereinfachung dar. Wie weiter oben bereits angeführt ist die Kanzerogenese sehr wahrscheinlich ein vielstufiger Prozess, wobei durch vielfältige exogene, endogene, genetische und epigenetische Faktoren eine progressive Umwandlung von gesunden Zellen/Geweben hin zu malignen Zuständen stattfindet. Erweiterte und detailliertere Modelle insbesondere in Hinblick auf Leberkrebs sind zusammengefasst in Khare *et al.*, 2013; Ramakrishna *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2011 sowie Hanahan und Weinberg, 2000.

## 2.5.2 Gentoxische und nicht-gentoxische Kanzerogene

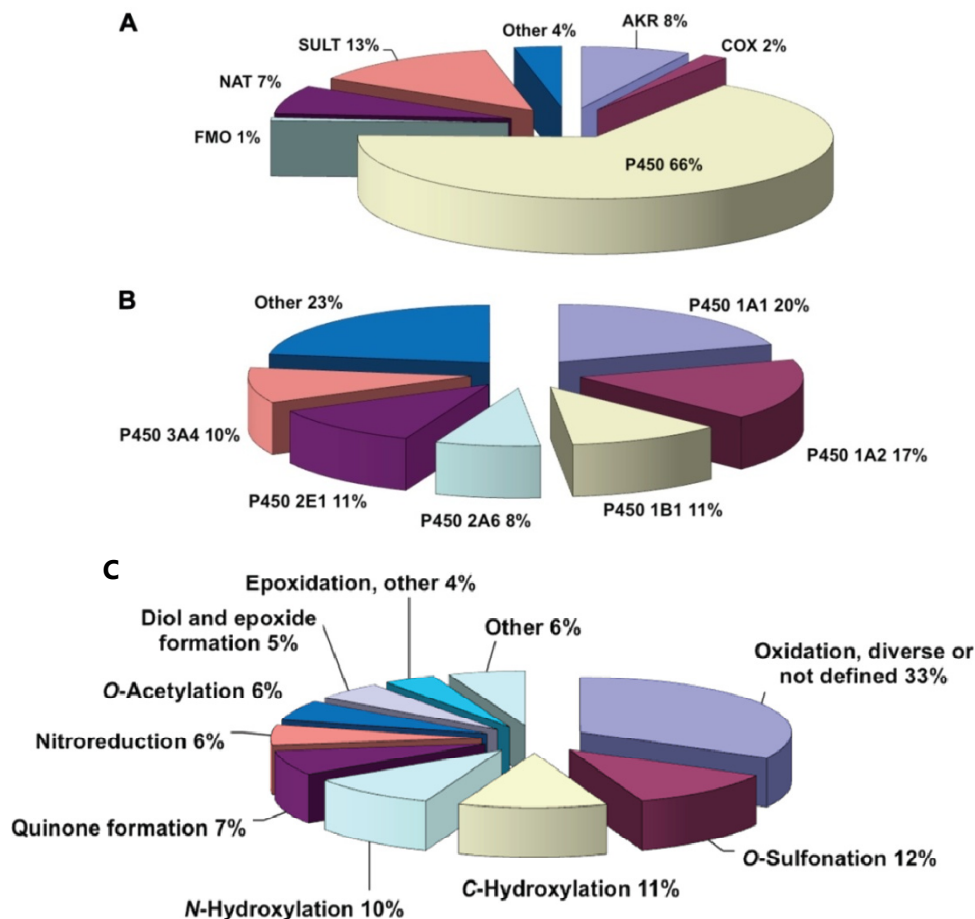
Es wird zwischen gentoxischen und nicht-gentoxischen Kanzerogenen unterschieden. Letztere sind nicht in der Lage einen DNA-Schaden und somit eine Initiation auszulösen, wirken aber auf bereits initiierte Zellen tumorpromovierend. Sie stören die Wachstumskontrolle transformierter Zellen und führen so zu unkontrollierter Proliferation und Hyperplasien. Typische potente Tumorpromotoren sind z. B. Phorbolester wie TPA (12-O-

Tetradecanoylphorbol-13-acetat). Insbesondere für die Leber wirken Dioxine wie TCDD, PCBs oder Phenobarbital (bei der Ratte) tumorpromovierend. Die molekularen Wirkmechanismen chemischer nicht-gentoxischer Kanzerogene sind vielfältig und reichen von Peroxisomenproliferation, Aktivierung des AhR über Induktion von oxidativem Stress bis hin zu Substanzen die eine generelle hormonelle Imbalance verursachen (Benigni *et al.*, 2013). Die Wirkung eines nicht-gentoxischen Kanzerogens ist oft organspezifisch und erfordert eine wiederholte oder andauernde Exposition oberhalb einer bestimmten Menge bzw. Schwellendosis. Im Gegensatz dazu lautet das Dogma der Kanzerogenese bei gentoxischen Kanzerogenen, dass diese keinen Schwellenwert besitzen, unterhalb dessen keine Wirkung beobachtet wird. Im Extremfall bedeutet dies, dass ein einzelnes Molekül einen DNA-Schaden verursachen und in der Folge einen Tumor auslösen kann (unter der Voraussetzung, dass das DNA-Addukt nicht repariert wird, in einem tumorigenen DNA-Abschnitt auftritt und zur Mutation führt). Tatsächlich konnte in vielen Studien bis in die analytisch geringstmöglichen messbaren Konzentrationen ein linearer Zusammenhang zwischen der Dosis/Konzentration eines gentoxischen Kanzerogens und der Menge an DNA-Addukten nachgewiesen werden. Dennoch wird der lineare Zusammenhang zwischen der Dosis eines gentoxischen Kanzerogens, der dadurch verursachten Menge von DNA-Addukten und der Erhöhung der Tumorzinzidenz seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert (Bailey *et al.*, 2009; Waddell 2002 und 2003; Bolt *et al.*, 2004; Swenberg *et al.*, 2000; Zarbl *et al.*, 2010).

### **2.5.3 Rolle fremdstoffmetabolisierender Enzyme bei der Aktivierung von gentoxischen Kanzerogenen**

Wie in Kapitel 2.2 mehrfach angesprochen wurde, sind nicht alle gentoxischen Kanzerogene *per se* kanzerogen, sondern müssen erst durch (fremdstoffmetabolisierende) Enzyme im Organismus zum ultimalen Kanzerogen aktiviert werden. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse einer umfangreichen Literaturrecherche die das Ziel hatte herauszufinden, welche Enzyme und Reaktionen an der Giftung bekannter (Pro-)Kanzerogene beteiligt sind (Rendic und Guengerich, 2012). Danach werden rund zwei Drittel der literaturbekannten Aktivierungen durch CYPs katalysiert (Abbildung 12A). Somit spielen CYPs nicht nur beim entgiftenden Fremdstoffmetabolismus eine herausragende Rolle, sondern auch bei der Aktivierung von Substanzen zu Kanzerogenen. Daneben spielen Sulfotransferasen (13 %), die Aldo-Keto-Reduktase (8 %) sowie die *N*-Acetyl-Transferase (7 %) eine gewisse Rolle. In Abbildung 12B ist die Beteiligung der einzelnen CYPs-Enzyme gezeigt. CYP1A1 und 1A2 sind mit zusammen 37 % die wichtigsten Vertreter für die Aktivierung zu Kanzerogenen. CYP3A4, 2E1, 2A6 und CYP1B1 machen zu ungefähr gleichen Anteilen zusammen rund 40 % aus. Schließlich sind in

Abbildung 12C die bei der Aktivierung zu Kanzerogenen ablaufenden Reaktionen gezeigt. Hierbei zeigt sich, dass die *N*- und *C*-Hydroxylierung, *O*-Sulfonierung, Chinonbildung sowie Epoxidierung/Diolbildung bedeutende aktivierende Reaktionen darstellen.

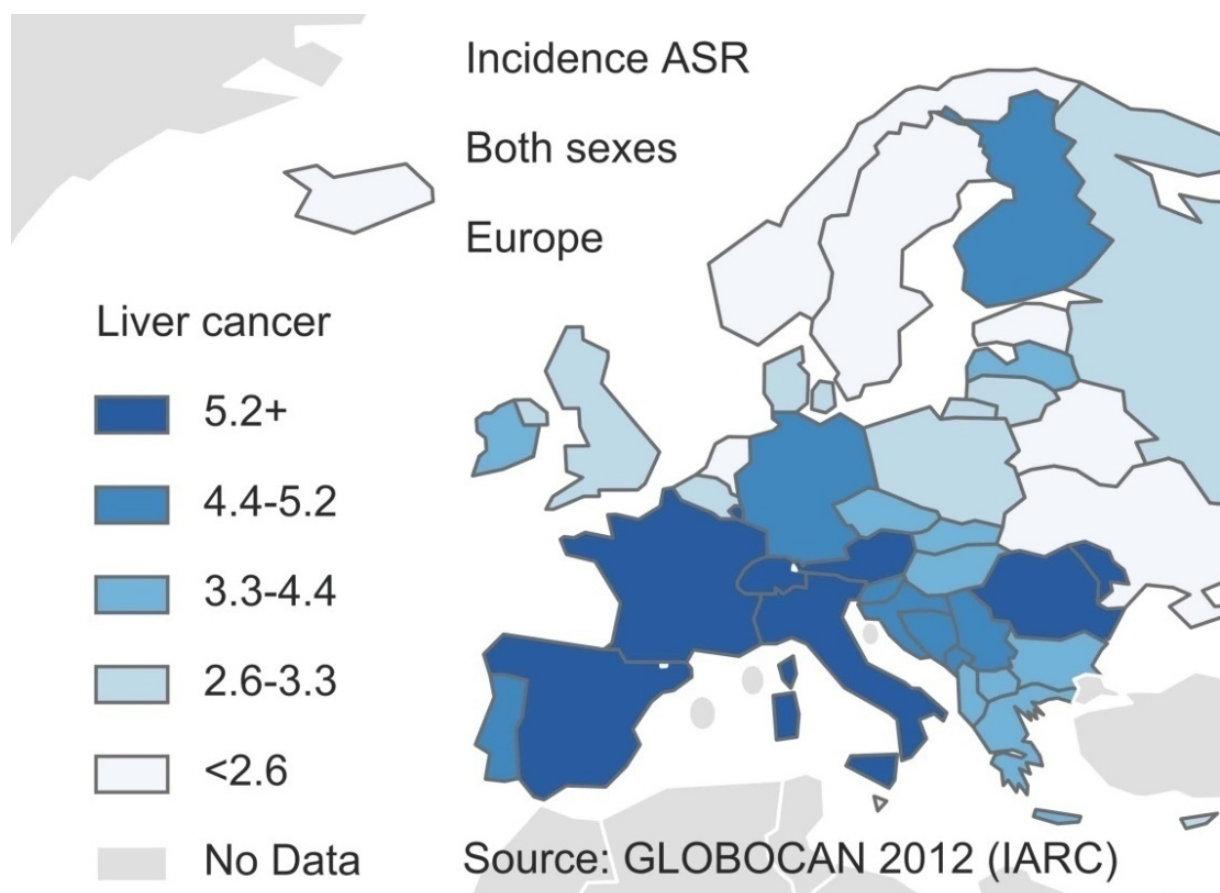


**Abbildung 12.** An der Aktivierung von Fremdstoffen beteiligte Enzyme. **A:** Alle Enzyme ( $n = 713$  Reaktionen), **B:** Anteil der verschiedenen CYP-Enzyme ( $n = 473$  Rkt.). **C:** Analyse der an der Aktivierung beteiligten Reaktionstypen ( $n = 799$  Rkt.). Abkürzungen: FMO: Flavin-abhängige Monooxygenase; NAT: N-Acetyltransferase; SULT: Sulfotransferase; AKR: Aldo-Keto-Reduktase; COX: Cyclooxygenase (Prostaglandin-H-Synthase); P450 = CYP: Cytochrom P450. Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from: Rendic and Guengerich, *Chem Res Toxicol*, **2012**, 25, 1316-83. © 2012 American Chemical Society.

## 2.5.4 Leberkrebs

Beim (primären) Leberkrebs werden zwei Formen unterschieden, die entweder die Leberzellen (hepatozelluläres Adenom, HCA, und -Karzinom, HCC) oder die Gallengänge (cholangiozelluläres Adenom oder -Karzinom) betreffen. Als Hepatom werden im Kontext dieser Arbeit sowohl gutartige (benigne) Adenome als auch bösartige (maligne) primäre

Tumoren der Leber bezeichnet. Bösartige Leberzellkarzinome stellen weltweit eine der häufigsten Krebsarten dar, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Die höchsten Inzidenzen treten im afrikanischen und asiatischen Raum auf. In Europa sind Leberzellkarzinome insgesamt seltener, es kann jedoch ein deutliches Süd-Nord-Gefälle der Leberkrebsinzidenzen (Abbildung 13) beobachtet werden, wobei sich Leberzellkarzinome in Europa hauptsächlich auf dem Boden bereits bestehender Leberzirrhosen entwickeln. Die epidemiologisch weltweit mit Abstand wichtigsten Ursachen für Leberkrebs sind Infektionen mit Hepatitis B und C, Alkoholkonsum sowie Exposition von Aflatoxinen. Risikofaktoren stellen Übergewicht, Diabetes mellitus, Tabakrauchen, die Besiedlung von Endoparasiten (z. B. Leberegel) oder bestehende primär sklerosierende Cholangitis dar.



**Abbildung 13.** Leberkrebsinzidenzen in Europa (Fälle pro 100.000; altersstandardisiert; beide Geschlechter).  
Quelle: Ferlay *et al.*; GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11; <http://globocan.iarc.fr>.

Epidemiologische Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme (-menge) von Phenylpropenen und Leberkrebsinzidenzen untersuchen, liegen – nach Kenntnis des Autors – derzeit nicht vor.

---

# 3

## Toxikologie der untersuchten Phenylpropene: Stand der Forschung

In diesem Kapitel wird der Kenntnisstand zur toxikologischen bzw. toxikologisch relevanten Forschung der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen zusammengefasst. Hierbei wird vornehmlich der aktuelle Stand der Forschung (Anfang 2014) wiedergegeben. Erkenntnisse, die seit dem Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation (Anfang 2010) veröffentlicht wurden, werden, sofern sie in direktem Bezug zu dieser Arbeit stehen, in Kapitel 6 „Zusammenfassung und Diskussion“, an entsprechender Stelle vorgestellt und diskutiert.

Zu Beginn dieses Kapitels werden die verfügbaren Daten zur Toxikokinetik und zum Metabolismus der Verbindungen **1–5** zusammengefasst. Den Hauptteil des Kapitels stellen die Daten zur Kanzerogenität und Genotoxizität dar. Hiernach wird jeweils kurz auf die subchronische/subakute und akute Toxizität, Zytotoxizität und Reproduktionstoxizität eingegangen. Am Ende des Kapitels werden kurz Konzepte und Resultate zur Risikobewertung der Verbindungen vorgestellt und die bestehenden staatlichen Regulierungen zusammengefasst.

Methyleugenol (**1**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) wurden mehrfach von verschiedenen Organen in Hinblick auf ein mögliches humanes Krebsrisiko evaluiert. Wegen der vergleichsweise hohen humanen Exposition wurde **1** im Rahmen des *National Toxicology Program* im Auftrag des U. S.-Gesundheitsministeriums (*United States Department of Health and Human Services*) in einer Zweijahresstudie an Ratten und Mäusen untersucht. Somit liegen für **1** relativ viele toxikologische Daten vor, während zu **4** und  $\alpha$ -Asaron (**3**) nur wenige und zu Methylisoeugenol (**2**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) fast keine Daten verfügbar sind.

## 3.1 Toxikokinetik

### 3.1.1 Methyleugenol (1) und Methylisoeugenol (2)

Die Toxikokinetik von **1** wurde im Tierversuch und am Menschen untersucht. Zur Toxikokinetik von Methylisoeugenol (**2**) liegen keine Daten vor.

Barr *et al.* (2000) etablierten eine GC-ID-HRMS-Methode für die Quantifizierung von **1** in humanem Blutserum. Die Nachweisgrenze (LOD) betrug dabei 3,1 pg **1** pro g Serum (3,1 ppt). In der Folge untersuchten die Autoren 206 erwachsene Probanden (US-Einwohner) und wiesen in 98 % der untersuchten Blutproben messbare Gehalte von **1** nach ( $w \leq 3,1$ –390 pg/g; Mittelwert; MW = 24; Median = 16 pg/g).

Schechter *et al.* (2004) untersuchten die Toxikokinetik von **1** an neun gesunden erwachsenen Probanden. Den nüchternen Probanden wurde ein Frühstück bestehend aus zwölf kommerziell erhältlichen Keksen (*ginger snaps*), zusammen mit Orangensaft gereicht. *Ginger snaps* sind klassisch mit Zimt, Gewürznelken und Ingwer aromatisierte Plätzchen und weisen, verglichen mit anderen Lebensmitteln, besonders hohe Gehalte an **1** auf. Im konkreten Fall betrug die Gesamtmenge 216  $\mu\text{g}$  **1**, was bei dem durchschnittlichen Gewicht der Probanden (68,3 kg) einer Dosis von 3,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG entsprach. Die nüchternen Probanden wiesen nüchtern Levels von  $w \leq 3,1$ –37 pg/g (MW = 16,2; Median = 13 pg/g) **1** im Serum auf. 15, 30, 60 und 120 min nach Verzehr wurden Blutproben genommen. Maximale Serumgehalte wurden nach 15 min mit Levels von 25–100 pg/g (MW = 53,9; Median = 54,0 pg/g) erreicht. Nach zwei Stunden waren noch 15–61 pg/g (MW = 25,2; Median = 20 pg/g) **1** nachweisbar. Aus den Daten wurde eine ungefähre Plasmahalbwertszeit von 90 min abgeleitet.

Die rasche Resorption von **1** beim Menschen ist vergleichbar mit der Toxikokinetik von oral verabreichtem **1** an männliche und weibliche Ratten (F344/N) und Mäuse (B6C3F<sub>1</sub>) (NTP, 2000). Die maximalen Plasmakonzentrationen nach Dosierungen von je 37, 75 und 150 mg/kg KG/d **1** erwiesen sich in beiden Spezies und Geschlechtern als relativ einheitlich. Beispielsweise betrug die maximalen Plasmakonzentrationen von **1** in männlichen Ratten  $\rho_{\text{max}} = 0,66$ ; 1,52 bzw. 3,84  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nach  $t_{\text{max}} = 5$  min. Die Plasmahalbwertszeiten lagen im Bereich von 1–2 h (Ratten) bzw. bei rund 30 min (Mäuse). Die Bioverfügbarkeit von **1** stieg dosisabhängig an und erreichte Werte zwischen 3–20 % bei Dosierungen zwischen 25–150 mg/kg KG in beiden Spezies und Geschlechtern. Diese geringe Bioverfügbarkeit spricht für einen ausgeprägten *First-pass*-Effekt. Dafür spricht auch, dass 85 % der Dosis **1** innerhalb von 72 h metabolisiert eliminiert wurden (Ratte und Maus, beide Geschlechter).



### 3.1.2 Asarone

Oswald *et al.* (1969) detektierten nach oraler oder intraperitonealer Gabe von  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) an männliche Ratten Ninhydrin-positive Substanzen im Urin (DC), die im Urin von Kontroll- bzw. unbehandelten Tieren nicht nachweisbar waren. Dabei wurden nach Behandlung mit **3** deutlich höhere Mengen als nach Gabe von **4** und jeweils höhere Mengen als nach Gabe von Safrol, Isosafrol oder Myristicin detektiert. Die Autoren vermuteten, dass es sich dabei wahrscheinlich um substituierte Phenylisopropylamine (Amphetamine) handelt.

Meng *et al.* (2013) entwickelten eine Methode zur simultanen Bestimmung von  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**) und Methyleugenol (**1**) im Rattenplasma ( $m, n = 6, SD$ ) nach einmaliger Gabe eines ätherischen Öles (200 mg/kg KG; oral) aus *Acorus tatarinowii* SCHOTT bestehend aus 0,50 % **1**; 11,4 % **3** und 74,0 % **4** (Messzeitpunkte: 0–20 h). Die Toxikokinetik ließ sich dabei im Falle von **1** am besten durch ein (offenes) Ein-Kompartimentenmodell, die Toxikokinetik von **3** und **4** durch ein (offenes) Zwei-Kompartimentenmodell beschreiben. Die maximalen Plasmakonzentrationen betragen  $\rho_{\max} = 0,021 \mu\text{g/ml}$  (**1**;  $t_{\max} = 10,0 \text{ min}$ ),  $0,53 \mu\text{g/ml}$  (**3**;  $t_{\max} = 11,3 \text{ min}$ ) und  $2,47 \mu\text{g/ml}$  (**4**,  $t_{\max} = 13,8 \text{ min}$ ). Die Plasmahalbwertszeiten lagen im Bereich von einer Stunde. Die drei Substanzen wurden somit ähnlich schnell resorbiert wie **1** in Ratten und Mäusen in der NTP-Studie (2000). Die Ergebnisse sprechen für eine geringe Bioverfügbarkeit oder einen ausgeprägten *First-pass*-Effekt der Substanzen.

Fang *et al.* untersuchten die allgemeine Toxikokinetik von  $\beta$ -Asaron (**4**) im Kaninchen ( $m$  und  $f$ , je  $n = 6$ ) (2012a) und die Toxikokinetik im Hinblick auf die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (2012b). Den Tieren wurde **4** in einer Dosis von 30 mg/kg KG *i. v.* verabreicht. Urin und Fäzes wurden nach 6, 12 und 24 h gesammelt und untersucht, die Gallenflüssigkeit nach 24 h. Der Großteil **4** wurde innerhalb der ersten zwölf Stunden ausgeschieden (80 % der initialen Dosis). Dabei wurden 22 % **4** in  $\alpha$ -Asaron (**3**) umgewandelt, während  $\gamma$ -Asaron (**5**) nicht detektierbar war. Rund 62 % der eingesetzten Dosis **4** wurden innerhalb von 24 h renal und 22 % mit dem Fäzes ausgeschieden. Weitere 16 % waren zu diesem Zeitpunkt biliär nachweisbar (Fang *et al.*, 2012a). Die Plasmahalbwertszeit von **4** wurde zu  $t_{1/2} = 83 \text{ min}$  bestimmt. **4** wurde ebenfalls in verschiedenen Hirngeweben mit den höchsten Gehalten in Hippocampus und Cerebellum (bis zu 2,37 mg/l) und langen Halbwertszeiten von bis zu  $t_{1/2} = 8,15 \text{ h}$  detektiert, was die Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von **4** belegt (Fang *et al.*, 2012b).

Lu *et al.* (2014) untersuchten die Resorption und Kompartimentierung von **3** nach peroraler, und intranasaler (und intravenöser) Applikation. **3** wurde in allen Fällen schnell resorbiert und überwand in hohen Konzentrationen die Blut-Hirn-Schranke.

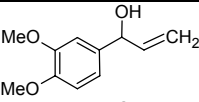
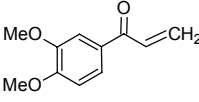
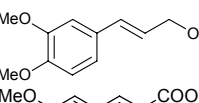
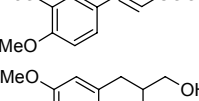
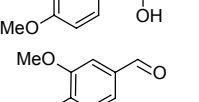
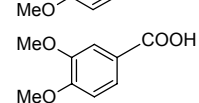
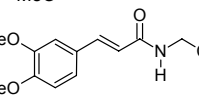
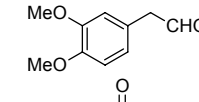
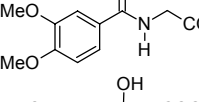
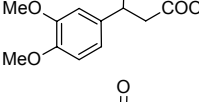
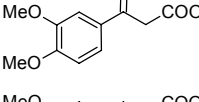
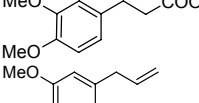
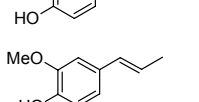
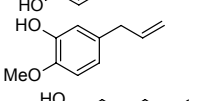
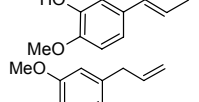
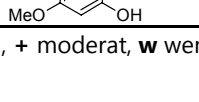


## 3.2 Metabolismus

Der *in vivo* Metabolismus von **1** und **2** wurde von Solheim und Scheline an männlichen Wistar-Ratten nach oraler und *i. p.*-Gabe von 200 mg/kg KG untersucht (Solheim und Scheline, 1976). Nach Behandlung des Urins mit Sulfatase/Glucuronidase konnten nach 24 Stunden die in Tabelle 5 aufgeführten renal ausgeschiedenen Metaboliten identifiziert und quantifiziert werden, wobei die Gesamtwiederfindungen mit 95 % (**1**) und 78 % (**2**) sehr hoch waren und keine unmetabolisierten Muttersubstanzen detektiert wurden.

**Tabelle 5.** Identifizierte Metaboliten im gesammelten 24-Stunden-Urin nach Gabe von Methyleugenol (**1**) oder Methylisoeugenol (**2**). Dosis jeweils 200 mg/kg KG, Ratte, oral. Aus: Solheim und Scheline, 1976.

Metabolit	Struktur	Gehalt der Gesamtdosis [%]	
		ME (1)	MIE (2)
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-hydroxypropionsäure		20	
( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxycinnamoylglycin		24	26
3,4-Dimethoxybenzoylglycin		30	13
( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxyzimtsäure <b>(26)</b>		2	4
Ferulasäure ( <b>24</b> )		-	27
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxypropionsäure		2	4
(3,4-Dimethoxyphenyl)-essigsäure		3	
3,4-Dimethoxypropionsäure		-	1
Eugenol ( <b>6</b> )		7	
Isoeugenol ( <b>7</b> )		-	0,5
Chavibetol ( <b>8</b> )		4	
Isochavibetol ( <b>9</b> )		-	0,5
3,4-Dimethoxybenzoesäure		2	2
6-Hydroxymethyleugenol <b>(19)</b>		1	
	<b>Summe</b>	<b>95</b>	<b>78</b>

**Tabelle 6.** Relative Gehalte identifizierter biliärer Metaboliten nach Gabe von Methyleugenol (**1**) oder Methylisoeugenol (**2**). Dosis jeweils 400 mg/kg KG, Ratte, oral bzw. *i. p.* Aus: Solheim und Scheline, 1976.

Metabolit	Struktur	Relative Gehalte <sup>1</sup>	
		ME (1)	MIE (2)
1'-Hydroxymethyleugenol ( <b>11</b> )		+++	nd
1'-Oxomethyleugenol ( <b>22</b> )		+	nd
3'-Hydroxymethylisoeugenol ( <b>12</b> )		+	++
( <i>E</i> )-3,4-Dimethoxyzimtsäure ( <b>26</b> )		+	+++
( <i>RS</i> )-2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol ( <b>27</b> )		+	nd
Veratrumaldehyd ( <b>10</b> )		w	w
3,4-Dimethoxybenzoesäure		w	w
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-hydroxypropionsäure		w	++
3,4-Dimethoxyphenylacetaldehyd		w	nd
3,4-Dimethoxybenzoylglycin		w	nd
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxypropionsäure		++	nd
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-oxopropionsäure		w	nd
3,4-Dimethoxypropionsäure		w	w
Eugenol ( <b>6</b> )		++	nd
Isoeugenol ( <b>7</b> )		nd	++
Chavibetol ( <b>8</b> )		++	nd
Isochavibetol ( <b>9</b> )		nd	++
6-Hydroxymethyleugenol ( <b>19</b> )		w	nd

<sup>1</sup>Relative Gehalte: +++ sehr viel, ++ viel, + moderat, w wenig, nd nicht detektiert.

Die biliären Metaboliten wurden in dieser Studie teilweise identifiziert, jedoch nicht quantifiziert. Nach oraler bzw. *i. p.*-Gabe einer Dosis von 400 mg/kg KG **1** bzw. **2** und Nachbehandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase konnten die in Tabelle 6 aufgelisteten Metaboliten detektiert werden.

Zum *in vitro*-Metabolismus von **2** lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Daten vor. Die Daten zum *in vitro*-Metabolismus von **1** beschränkten sich auf die Untersuchung des wahrscheinlichen proximalen Kanzerogens 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) (Gardner *et al.*, 1996 und 1997; Jeurissen *et al.*, 2006) und die mögliche Bildung von Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**; Delaforge *et al.*, 1980).

Zum Metabolismus von  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) gibt es bislang weder *in vitro*- noch *in vivo*-Studien. Hasheminejad *et al.* (1994) berichteten, dass wahrscheinlich (*Z*)- und (*E*)-3,4,6-Trimethoxyzimtsäure (**31**) die Hauptmetaboliten von **4** bzw. **3** in Inkubationen primärer Rattenhepatozyten (pRH) mit diesen Substanzen darstellen. Sie zeigten ebenfalls, dass mit zunehmender Cimetidinkonzentration (einem unspezifischen CYP-Inhibitor) die Menge von nicht-metabolisiertem **3** in Koinkubationen von pRH mit **3** und Cimetidin anstieg.

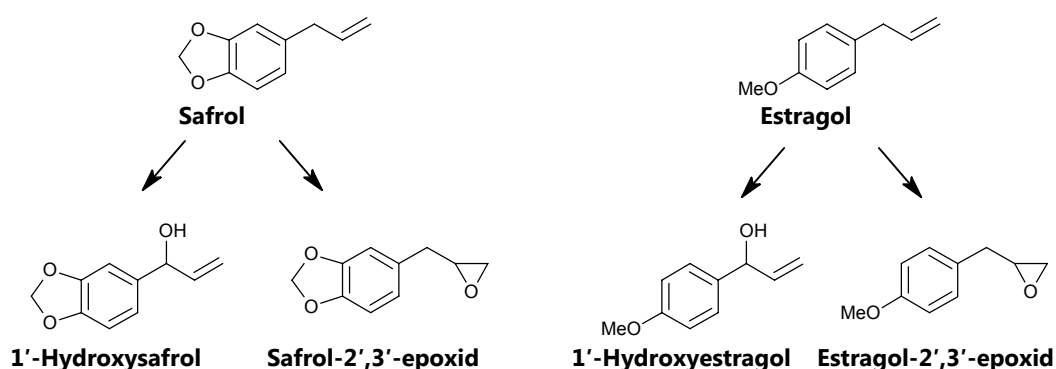
Björnstad *et al.* (2008) untersuchten den Urin von sieben Patienten, die durch orale Einnahme von Kalmusöl einen Rauschzustand herbeiführen wollten. Dabei konnte **3** und **4**, jedoch nicht **31** im Urin der Patienten nachgewiesen werden. Mutmaßlich wurden hydroxylierte Metaboliten sowie (*Z*)-3,4,6-Trimethoxyzimtsäure detektiert.

### 3.3 Kanzerogenität von Phenylpropenen

Das toxikologische Interesse an Phenylpropenen (PP) begründet sich damit, dass einige Verbindungen dieser Substanzklasse im Tierversuch kanzerogen wirken. Bereits 1895 berichtete Heffter (1895) über Leberveränderungen nach Gabe von Safrol bzw. verschiedenen Safrolderivaten bei Kaninchen und Katzen. Seit den 1960er Jahren wurden weitere Versuche an Ratten und Mäusen unternommen, welche die Leberkanzerogenität von Safrol belegten (Abbott *et al.*, 1961; Homburger *et al.*, 1961; Long *et al.*, 1963; Hagan *et al.*, 1965; Epstein *et al.*, 1970). In der Folge beschäftigte sich insbesondere die Arbeitsgruppe von Elisabeth C. und James A. Miller seit den frühen 1970er Jahren mit der Untersuchung von Safrol und weiterer PPs wie z. B. Estragol und Methyleugenol sowie deren propenylischen Analoga in Hinblick auf deren Kanzerogenität.

### 3.3.1 Mechanismus der Kanzerogenität von Safrol und Estragol: Historischer Überblick

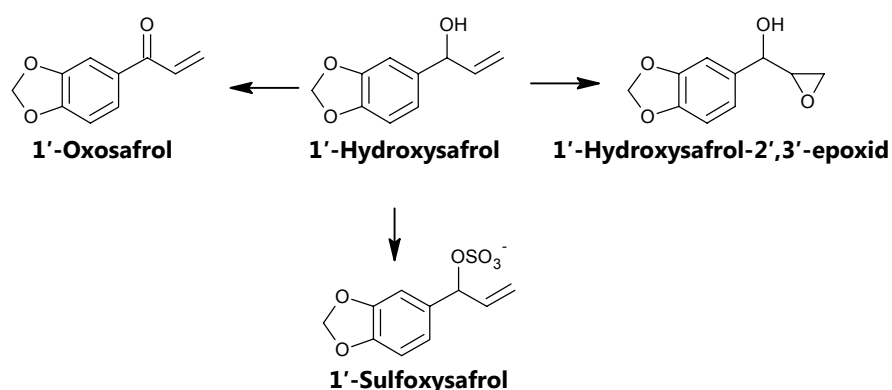
In Folge der Untersuchung des hepatischen Metabolismus von Safrol und Estragol *in vivo* und *in vitro* (Ratten und Mäuse) wurden zunächst jeweils zwei (Haupt-)Metaboliten identifiziert: 1'-Hydroxysafrol bzw. 1'-Hydroxyestragol sowie Safrol-2',3'-epoxid bzw. Estragol-2',3'-epoxid (s. Abbildung 14; Borchert *et al.*, 1973a und 1973b; Drinkwater *et al.*, 1976; Solheim und Scheline 1973; Janiaud *et al.*, 1976; Stillwell *et al.*, 1974; Swanson *et al.*, 1979 und 1981; Delaforge *et al.*, 1980 und 1980b; Ioannides *et al.*, 1981).



**Abbildung 14.** Lebermikrosomale Metaboliten von Safrol und Estragol.

Daraufhin wurden Safrol und Estragol sowie deren Metaboliten im Ames-Test untersucht, wobei die Muttersubstanzen kein bzw. ein sehr geringes mutagenes Potential in allen untersuchten Stämmen mit und ohne metabolische Aktivierung zeigten. Die 1'-Hydroxyderivate erwiesen sich im Stamm TA100 und die Epoxide in Stamm TA1535 als potente Mutagene (Swanson *et al.*, 1979), während die potentielle Mutagenität der 3'-Hydroxyderivate wegen der hohen Zytotoxizität nicht messbar war. In weiteren *in vivo* Versuchen wurden Mäusen die vier in Abbildung 14 gezeigten Metaboliten (oral und *i. p.*) verabreicht (Borchert *et al.*, 1973a und 1973b; Miller *et al.*, 1983; Wiseman *et al.*, 1987). Hierbei zeigte sich, dass die Inzidenzen für Leberzellkarzinome bei der Gabe der 1'-Hydroxyderivate deutlich höher waren als bei den Tieren, die mit der jeweiligen Muttersubstanz behandelt wurde. Die untersuchten Epoxide und 3'-Hydroxyderivate erwiesen sich hingegen als negativ. Hieraus schloss man, dass die 1'-Hydroxyderivate die proximalen Kanzerogene von Safrol bzw. Estragol darstellen. In weiteren Experimenten wurde der Metabolismus von 1'-Hydroxysafrol *in vitro* (Lebermikrosomen und -zytosol) untersucht, wobei die Bildung von 1'-Oxosafrol, 1'-Sulfoxysafrol und 1'-Hydroxysafrol-2',3'-epoxid beobachtet bzw. auf deren Bildung zurückgeschlossen wurde (Abbildung 15; Wislocki *et al.*, 1976; Phillips *et al.*, 1981a; Fennel *et al.*, 1984). Da auch die orale Gabe von 1'-Oxosafrol keine

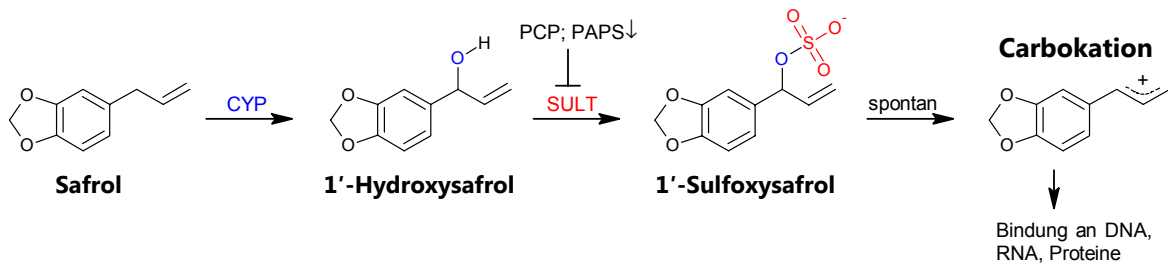
Erhöhung der Leberkrebsinzidenzen in männlichen Ratten zur Folge hatte (Wislocki *et al.*, 1977), lautete die Hypothese, dass intermediär gebildetes 1'-Sulfoxysafrol und/oder 1'-Hydroxysafrol-2',3'-epoxid die ultimalen Kanzerogene von Safrol darstellen und deren Wirkung über die kovalente Bindung an DNA hervorgerufen wird. Philipps *et al.* (1981a-c) behandelten Mäuse mit Tritium-markiertem 1'-Hydroxysafrol bzw. 1'-Hydroxyestragol und untersuchten die nachweisbaren DNA-Addukte vergleichend mit verschiedenen synthetisierten Addukten. Die synthetisierten Addukte wurden dabei aus den Reaktionen verschiedener Desoxynukleoside mit 1'-Hydroxysafrol, 1'-Oxosafrol, 1'-Hydroxysafrol-2',3'-epoxid und 1'-Acetoxysafrol, welches als Modell für das synthetisch nicht zugängliche 1'-Sulfoxysafrol diente, gewonnen.



**Abbildung 15.** Sekundärmetaboliten von 1'-Hydroxysafrol (Wislocki *et al.*, 1976).

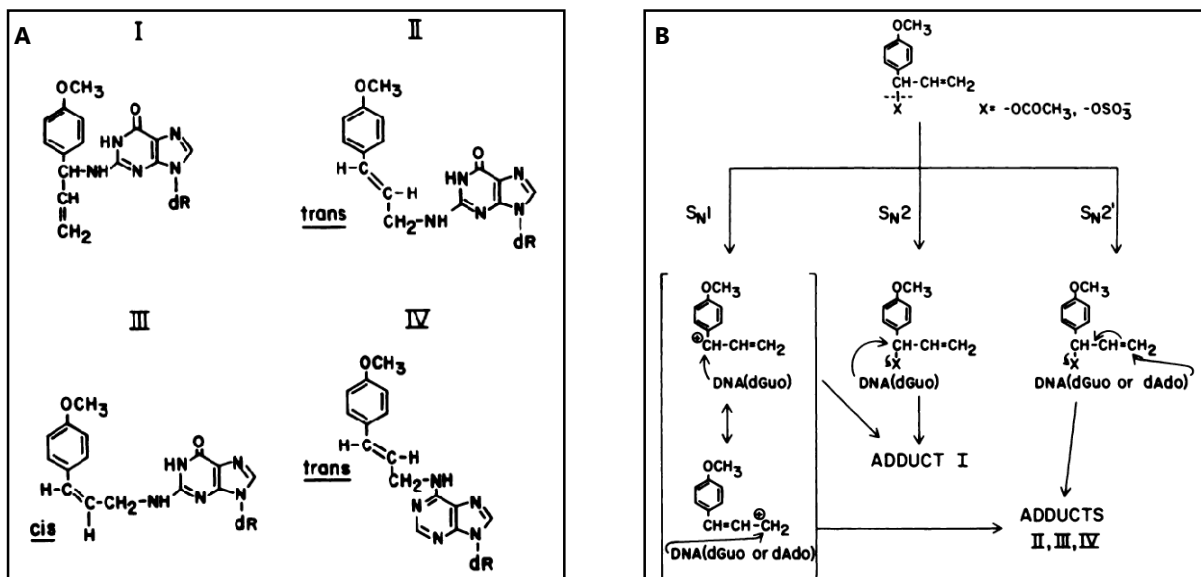
Die Eigenschaften der detektierten *in vivo* gebildeten DNA-Addukte zeigten, dass diese aus einem Ester gebildet wurden und somit höchstwahrscheinlich 1'-Sulfoxysafrol das ultimale Kanzerogen von Safrol darstellt (Philipps *et al.*, 1981a-c; Wiseman *et al.*, 1985). Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde überprüft, ob die Ausschaltung des Sulfotransferase-vermittelten Reaktionsweges *in vivo* einen Einfluss auf die Bildung von DNA-Addukten bzw. die Bildung von Leberkarzinomen hat. Tatsächlich konnte im Tierversuch an Mäusen gezeigt werden, dass durch gleichzeitige Gabe von Pentachlorphenol (PCP) mit Safrol bzw. Estragol (oral) oder deren 1'-Hydroxyderivate (*i. p.*) sowohl die Menge der DNA- und RNA-Addukte, als auch die Inzidenz der Hepatome im Vergleich zu den Behandlungsgruppen, welche die gleiche Dosis Safrol bzw. Estragol aber kein PCP erhielten, signifikant reduziert wurde bzw. kein statistischer Unterschied zur Vehikelkontrollgruppe zu verzeichnen war. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Behandlung brachyomorpher Mäuse mit Safrol, Estragol oder deren 1'-Hydroxyderivate beobachtet (Boberg *et al.*, 1983 und 1987; Wiseman *et al.*, 1987). Diese Tiere sind gekennzeichnet durch eine genetisch bedingte stark verminderte PAPS-Syntheserate, dem Kofaktor, der für die Sulfonierungsreaktion durch Sulfotransferasen benötigt wird (vgl. Kap. 2.2.2.1). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich der Hauptweg der

Bioaktivierung von Safrol (und Estragol) wie in Abbildung 16 gezeigt zusammenfassen.



**Abbildung 16.** Aktivierung von Safrol. CYP: Cytochrom P450; SULT: Sulfotransferase; PCP: Pentachlorphenol; PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; modifiziert nach Boberg *et al.*, 1983.

Im ersten Schritt wird durch CYPs die Bildung des proximalen Kanzerogens 1'-Hydroxysafrol katalysiert. Hiernach erfolgt eine Sulfotransferase-katalysierte Reaktion zum ultimalen Kanzerogen 1'-Sulfoxysafrol, welches spontan anorganisches Sulfat abspalten und ein mesomeriestabilisiertes Carbokation bilden kann. Dieses Carbokation kann nun kovalent an DNA, RNA oder Proteine binden (Wislocki *et al.*, 1976 und 1977).



**Abbildung 17.** **A:** Vermutliche Strukturen der *in vivo* gebildeten DNA-Addukte nach Gabe von 1'-Hydroxyestragol (*i. p.*, Maus, Leber); **B:** Mögliche Reaktionen von 1'-Sulfoxyestragol mit DNA bzw. Nucleosiden (Phillips *et al.*, 1981a; Miller und Miller, 1983). dR: Desoxyribose; dGuo: Desoxyguanosin; dAdo: Desoxyadenosin.

Adapted from/Abbildungen aus: *Cancer Research*, 1981(a), 41, 176-186, Phillips DH, Miller JA, Miller EC, Adams B, „Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole“, with permission from/mit freundlicher Genehmigung von American Association for Cancer Research (AACR).

Die gleichen Überlegungen treffen anhand der experimentellen Ergebnisse auch für Estragol zu. Im Falle von Estragol wurden *in vivo* (Maus; Leber) vier DNA-Addukte nachgewiesen, deren wahrscheinlichste Strukturen in Abbildung 17 gezeigt sind, wobei Addukt II (*N*<sup>2</sup>-(*trans*-Anethol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin) das Hauptaddukt darstellte. Als DNA-Reaktionspartner

können sowohl 1'-Sulfoxysafrol selbst ( $S_N2$ -Reaktion), als auch das daraus spontan entstehende Carbokation ( $S_N1$ -Reaktion) fungieren (Philipps *et al.*, 1981a–c; Miller und Miller, 1983). Gupta *et al.* (1993) untersuchten die Dosis- und Zeitabhängigkeit der hepatischen DNA-Adduktbildung von Safrol nach einzelner Gabe an CD1-Mäusen (f; 0,001–10 mg/kg KG; *i. p.*; *t* = 0,5–30 d) im  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling-Assay. Die maximale Anzahl an DNA-Addukten wurde dabei jeweils zwei Tage nach der Behandlung bestimmt, wobei die Werte in den folgenden 28 Tagen nur geringfügig abnahmen. Auch ein strenger Zusammenhang zwischen Dosis und DNA-Addukt-Konzentration konnte über die untersuchte Größenordnung der Dosis von 10.000 bestätigt werden. Im UDS-Assay (unplanmäßige DNA-Synthese) wurde eine erhöhte DNA-Syntheserate nur bei der höchsten Dosisgruppe festgestellt.

### 3.3.2 Einfluss der Phenylpropen-Struktur auf die Leberkanzerogenität im Tierversuch

In Tabelle 7 sind ausgewählte PP mit allylischer bzw. propenylischer Seitenkette und deren Kanzerogenität gegenübergestellt. Die Allylverbindungen Safrol, Estragol und **1** wurden als Hepatokanzerogene bei Mäusen und teilweise bei Ratten getestet, während die isomeren Propenylverbindungen Isosafrol und Anethol und negativ waren (Methylisoeugenol (**2**) wurde bislang nicht in Kanzerogenitätsstudien untersucht). Letzteres wurde auf die Unfähigkeit der Propenylverbindungen zurückgeführt einen 1'-Hydroxymetaboliten zu bilden. Ebenfalls negativ getestet wurde Eugenol, was man auf das Vorhandensein der freien phenolischen Hydroxygruppe zurückführte, welche *in vivo* effektiv glucuronidiert und sulfoniert wird und die gebildeten Konjugate ausgeschieden werden (Sutton *et al.*, 1985; Caldwell und Sutton, 1990; Fischer *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu erzeugte das in diversen Assays als nicht genotoxisch bewertete, propenylische Isoeugenol (**7**) bei männlichen Mäusen hepatozelluläre Adenome (HCA) und Karzinome (HCC; NTP, 2010). Neben **7** wurden auch die propenylischen Verbindungen  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) als hepatokanzerogen bei männlichen B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen getestet (Wiseman *et al.*, 1987). Asaronhaltiges europäisches Kalmusöl erzeugte ebenfalls HCAs und HCCs in Ratten (oral; JECFA, 1981). Die allylischen Verbindungen Apiol, dessen Isomer Dillapiol sowie Elemicin und Myristicin, welche vier bzw. drei Sauerstoff-funktionen am Aromaten besitzen, wurden negativ getestet, obwohl ein gewisses Potential zur Bildung von DNA-Addukten im  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling-Assay beobachtet wurde (Phillips *et al.*, 1984).  $\gamma$ -Asaron (**5**) wurde bislang nicht auf seine Kanzerogenität untersucht. Somit lassen sich keine allgemeingültigen Strukturmerkmale ableiten, welche die Kanzerogenität der Phenylpropene vorhersagen können. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Safrol, Estragol und Methyleugenol (**1**) über den gleichen, in Abbildung 16 für Safrol gezeigten Mechanismus aktiviert werden, wobei der Kanzerogenität von **3**, **4** und Isoeugenol (**7**) höchstwahrscheinlich



ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Dafür spricht, dass die gleichzeitige Gabe von **3** oder **4** mit PCP keinen Einfluss auf die Inzidenzen der Bildung von Hepatomen hatte (Wiseman *et al.*, 1987).

**Tabelle 7.** Auswahl einiger natürlicher Phenylpropene: Struktur, Vorkommen, und Kanzerogenität.

Allyl-Seitenkette				Propenyl-Seitenkette			
Name	Struktur	Vorkommen	Kanzerogenität im Tierversuch [Quelle]	Name	Struktur	Vorkommen	Kanzerogenität im Tierversuch [Quelle]
Methyleugenol (1)		Basilikum, Estragon, Fenchel, Piment, Muskatnuss, geringe Konzentrationen in Bananen, Orangen, Grapefruit.	positiv [1]	(E/Z)-Methyl-isoegenol (2)		<i>Asarum arifolium</i> , <i>Acorus gramineus</i> , <i>Cymbopogon javanensis</i>	nicht untersucht keine adversen Effekte bei subchronischer Gabe <sup>1</sup> [2]
Safrol		Sassafrasbaum, Kampherbaum, Lorbeere	positiv [1, 7]	(E/Z)-Isosafrol		Ylang-Ylang-Öl (Blüten des Kanangabaumes), <i>Illicium religiosum</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Mehrdeutig <sup>2</sup> [3, 5 – 7]
Estragol		Estragon, Kerbel, Sternanis	positiv [1, 10]	(E/Z)-Anethol		Anis, Fenchel, Sternanis	negativ [3, 9]
Eugenol		Gewürznelke, Piment, Bayöl, Zimt	negativ [1, 8]	(E/Z)-Isoegenol (7:1)		Ylang-Ylang-Öl, Muskatnuss, Gewürznelke	Positiv <sup>3</sup> [4]
$\gamma$ -Asaron (5)		schwarzer Pfeffer, Kalmus	nicht untersucht	$\alpha$ -Asaron (3)		Kalmus (europäische Varietät), Haselwurzgewächse	positiv [3]
Eiimicin		Muskatnuss, <i>Canarium luzonicum</i>	negativ [1]	$\beta$ -Asaron (4)		Kalmus (indische Varietät), Haselwurzgewächse	positiv [3]
Myristicin		Muskatnuss, Liebstöckel, Pastinaken	negativ [1]				
Apiol		Petersilie, Sellerie	negativ [1]				
Dillapiol		Dill, Fenchel	negativ [1]				

<sup>1</sup> 28-Tages-Studie; Ratte (SD); oral

<sup>2</sup> negativ bei B6CF<sub>1</sub>-Mäusen (*i. p.*) [3]; negativ bei Osborne-Mendel-Ratten (oral) [5]; mit geringen Inzidenzen positiv für die Bildung von hepatozellulären Adenomen und Karzinomen in (C57BL/6xC3H/Anf)F<sub>1</sub>- und (C57BL/6xAKR)F<sub>1</sub>-Mäusen; ♂ > ♀ [6]

<sup>3</sup> nur ♂ Mäuse (negativ bei ♀ Mäusen und Ratten)

**Quellen:** 1: Miller *et al.*, 1983; 2: Purchase *et al.*, 1992; 3: Wiseman *et al.*, 1987; 4: NTP, 2010; 5: Hagan *et al.*, 1965; 6: Innes *et al.*, 1969; 7: IARC, 1976; 8: NTP, 1983; 9: Truhaut *et al.*, 1989 und Kim *et al.*, 1999; 10: NTP, 2011

### 3.3.3 Kanzerogenitätsstudien der untersuchten Testsubstanzen

In Tabelle 8 sind die detaillierten Ergebnisse aus verschiedenen Kanzerogenitätsstudien der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen Methyleugenol (**1**),  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**), 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) und (E)-Asaronepoxid (**39a**) zusammengefasst. Die Verbindungen **1**, **3**, **4** und **11** sind dabei eindeutig als hepatokanzerogen getestet worden. **39a** zeigte in der höchsten Dosisgruppe eine statistisch signifikante Erhöhung der Hepatominzidenzen. **1** erhöhte dosisabhängig die Inzidenzen für HCAs und HCCs nach oraler wiederholter Gabe in weiblichen und männlichen Ratten und Mäusen (NTP, 2000) sowie bei Mäusen (♂) nach wiederholter intraperitonealer Gabe (Miller *et al.*, 1983). Das proximale Kanzerogen von **1**, **11**, erzeugte ebenfalls mit hoher Inzidenz HCAs und HCCs.

**Tabelle 8.** Daten aus Kanzerogenitätsstudien von Methyleugenol (**1**), 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**),  $\alpha$ -Asaron (**3**), (E)-Asaronepoxid (**39a**) und  $\beta$ -Asaron (**4**). Alle fettgedruckten Ergebnisse sind statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ( $p < 0,001$  für alle Daten aus Lit. 1–3;  $p < 0,01$  für **3** aus Lit. 4 und  $p < 0,05$  für **39a**).

Verbindung	Spezies		Tieranzahl <i>n</i> (pro Gruppe), Geschlecht	Administrations- route	Wiederholte Gabe (Dosis- verteilung)	Dosisgruppe ( $\Sigma$ = Gesamt- dosis)	Anzahl der Tiere mit hepatozellulären Karzinomen und/oder Adenomen in % (durchschnittliche Anzahl der Hepatome pro Maus)		Neoplastische Nebenbefunde (nur Behandlungsgruppen)	Studiendauer in Monaten	Quelle
	Maus B6C3F <sub>1</sub> Ratte F344/N	♂					♀				
<b>1</b>	Ratte	50, m	oral	5 x pro Woche über 105 Wochen	<b>37,5</b> <b>75</b> Kontrollgruppe	♂: <b>28</b> ♀: <b>16</b>	♂: <b>56</b> ♀: <b>29</b>	vielfältige Befunde an Leber und Magen; bei ♂ zusätzlich renale tubuläre Adenome; Mesotheliome; Fibroadenome; Fibrome und Fibrosarkome	bis zu 24	1	
		50, f									♂: <b>86</b> ♀: <b>2</b>
<b>1</b>	Ratte	60, m	oral	5 x pro Woche über 52 Wochen	<b>300 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	♂: <b>90</b> ♀: <b>86</b>	♂: <b>14</b> ♀: <b>2</b>	s. o.	bis zu 24	1	
		60, f									
<b>1</b>	Maus	50, m	oral	5 x pro Woche über 105 Wochen	<b>37,5</b> <b>75</b> <b>150 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	♂: <b>94</b> ♀: <b>100</b>	♂: <b>100</b> ♀: <b>100</b>	Hepatoblastome; nur ♀; Hepatocholangiokarzinome; nur ♂; bösartrige neuroendokrine Tumoren des Magens	bis zu 24	1	
		50, f									♂: <b>80</b> ♀: <b>98</b>
<b>1</b>	Maus	59, m	<i>i. p.</i>	Tag 1, 8, 15, 22 (1;2;4;12)	<b>0,85 mg/Tier</b> Kontrollgruppe	<b>96 (3,2)</b> 41 (0,5); <i>n</i> = 60	♂: <b>96</b> ♀: <b>100</b>	Fibrosarkom Lymphom	13–18	2	
		44, m									<b>93 (3,5)</b> 41 (0,5); <i>n</i> = 60
<b>3</b>	Maus	47, m	<i>i. p.</i>	Tag 1, 8, 15, 22 (1;2;4;12)	<b>1,00 mg/Tier</b> Kontrollgruppe	<b>89 (1,8)</b> 10 (0,1); <i>n</i> = 31	♂: <b>89</b> ♀: <b>85</b>	Hämangiosarkom (Milz)	13	3	
		39, m									<b>17 (0,2)</b> ; <i>n</i> = 59
<b>3 + PCP<sup>1</sup></b>	Maus	37, m	<i>i. p.</i>	einmalig	<b>156 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	<b>86 (1,8)</b> 9 (0,1); <i>n</i> = 45	♂: <b>91 (2,2)</b> ♀: <b>91 (2,7)</b>	Hämangiosarkom (Leber)	10–11	4	
		~35, m									6 (0,1)
<b>39a</b>	Maus	~35, m	<i>i. p.</i>	einmalig	<b>28</b> <b>56</b> <b>112 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	10–11	4	
<b>4</b>	Maus	43, m	<i>i. p.</i>	Tag 1, 8, 15, 22 (1;2;4;12)	<b>1,00 mg/Tier</b> Kontrollgruppe	<b>83 (2,3)</b> 10 (0,1); <i>n</i> = 31	♂: <b>69 (1,1)</b> ♀: <b>62 (1,1)</b>	Hämangiosarkom (s. c.)	13	3	
		30, m									9 (0,1); <i>n</i> = 32
<b>4</b>	Maus	35, m	<i>i. p.</i>	einmalig	<b>52,1 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	<b>62 (1,1)</b> 17 (0,2); <i>n</i> = 59	♂: <b>79 (1,5)</b> ♀: <b>94 (2,1)</b>	-	10	3	
		39, m									9 (0,1); <i>n</i> = 45
<b>4 + PCP<sup>1</sup></b>	Maus	18, m	<i>i. p.</i>	einmalig	<b>104 mg/kg KG</b> Kontrollgruppe	<b>94 (2,1)</b> 17 (0,2); <i>n</i> = 59	♂: <b>94 (2,1)</b> ♀: <b>17 (0,2)</b>	-	10	3	

<sup>1</sup> Pentachlorphenol; 0,04  $\mu$ mol/g KG (10,7 mg/kg KG); *i. p.* 45 min vor der Gabe der Phenylpropene.  
Quellen: 1: NTP, 2000; 2: Miller *et al.*, 1983; 3: Wiseman *et al.*, 1987; 4: Kim *et al.*, 1999.  
Abkürzungen: KG: Körpergewicht; m: männlich; f: weiblich; *i. p.*: intraperitoneal.

**Tabelle 9.** Kanzerogenitätsstudien von  $\beta$ -Asaron (**4**), indischem (JOC) und europäischem (EOC) Kalmusöl. Studiendauer jeweils bis zu 24 Monate.

Verbindung	Spezies	Tierzahln (pro Gruppe), Geschlecht	Administrations- route	Wiederholte Gabe	Dosisgruppen [% in der Nahrung]	Befunde (nur Behandlungsgruppen)	Quelle
<b>4</b>	Ratte	25, m	oral	kontinuierlich	0,04	Konzentrationsabhängige erhöhte Mortalität ( $\sigma > \text{♀}$ ; 84 Wochen in der höchsten Dosisgruppe); vielfältige Veränderungen an Leber und Nieren; koagulative Nekrose (Leber); Leiomyosarkome (Dünndarm; nur $\sigma$ ); Atrophie der Herzmuskelzellen; kardiale Fibrose; fettige Degeneration und Infiltration des Herzens; intrakardiale Thrombosen; seröse Effusion in Pleurazwischenraum und Abdomen	1
		25, f			0,08		
					0,2		
<b>JOC<sup>1</sup></b>	Ratte	25, m	oral	kontinuierlich	0,005	Konzentrationsabhängige erhöhte Mortalität ( $\sigma > \text{♀}$ ; 45, 68 bzw. 104 Wochen in den höchsten Dosisgruppen); makroskopische und mikroskopische regenerative und degenerative Leberschäden (nicht näher bezeichnet); Leiomyosarkome (hauptsächlich Zwölffingerdarm); fokale und diffuse myokardiale Degenerationen; seröse Effusion in Pleura und Abdomen	1, 2
		25, f			0,01		
					0,05		
					0,1		
					0,25 0,5		
<b>EOC<sup>2</sup></b>	Ratte	25, m	oral	kontinuierlich	0,1	<b>Hepatozelluläre Adenome und Karzinome</b> ; fokale noduläre Hyperplasien; Leberzellnekrose; Leberhyperämie; Vakuolation; gesteigerte Gallengangzellenproliferation; Leiomyosarkome; myokardiale Atrophie; kardiale Fibrose, fettige Degeneration und Infiltration des Herzens	1
		25, f			0,5		
					1,0		
					2,0		

<sup>1</sup> JOC: Indisches Kalmusöl aus der Jammu-Region bestehend aus ca. 76 % **4** und 3 % **3**.

<sup>2</sup> EOC: Europäisches Kalmusöl; Zusammensetzung unbekannt.

 Quellen: 1: Taylor, 1981 (zitiert in JECFA, 1981); 2: Taylor *et al.*, 1967

Hierbei wurde **11** intraperitoneal verabreicht, was aus mehreren Gründen sinnvoll ist. Zum einen handelt es sich um einen Metaboliten, der natürlich (z. B. in Lebensmitteln) nicht vorkommt und erst nach oraler Aufnahme von **1** gebildet wird, wodurch die toxikokinetische Situation *i. p.* besser abgebildet wird als bei peroraler Administration. Zum anderen ist **11** säurelabil (Umlagerung zu **12**; vgl. Kap. 7.6.6), weshalb bei oraler Gabe im sauren Magenmilieu die Stabilität von **11** bis zur Aufnahme nicht sichergestellt werden kann (Herrmann *et al.*, 2014).

$\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) erhöhten ebenfalls die Inzidenzen von HCAs und HCCs bei männlichen Mäusen (*i. p.*), wobei nach Koadministration mit Pentachlorphenol jeweils keine Reduktion der Inzidenzen beobachtet wurde (Wiseman *et al.*, 1987). Die durchschnittliche Anzahl der Hepatome (Adenome + Karzinome) pro Tier lag bei den Untersuchungen von **3** und **4** im Bereich von eins bis zwei, während bei den Untersuchungen von **1** und **11** im Schnitt mehr als drei Herde pro Tier beobachtet wurden. Die neoplastischen Nebenbefunde bei der Fütterungsstudie des NTP (2000) betrafen hauptsächlich Leber (inkl. Gallengang) und Niere. Veränderungen des Vormagen und neuroendokrine Tumoren wurden beobachtet, haben aber wahrscheinlich keine humane Relevanz (JECFA, 2009; Herbert und Abdo, 2003). Die Nebenbefunde der *i. p.*-Studien waren jeweils singuläre Ereignisse.

Bereits in den 1960er Jahren wurden Kanzerogenitätsstudien mit  $\beta$ -Asaron (**4**) und asaronhaltigen Kalmusölen an Ratten durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 9 zusammengefasst sind. Diese Studien sind histopathologisch weniger dezidiert und detailliert beschrieben als die Studien in Tabelle 8, weshalb auf quantitative Angaben verzichtet wurde. Hierbei wurden **4** und indisches Kalmusöl als nicht hepatokanzerogen beschrieben, aber vielfältige sonstige Veränderungen und Neoplasien der Leber angegeben. Daneben wurden Veränderungen insbesondere der Nieren und des Herzens beschrieben. Maligne Veränderungen (Leiomyosarkome) betrafen Dünn- bzw. Zwölffingerdarm. Lediglich bei der Gabe von europäischem Kalmusöl (oral, Ratte) wurden dosisabhängig zusätzlich eindeutig HCAs und Adenokarzinome diagnostiziert (Taylor *et al.*, 1967; Taylor, 1981).

Williams *et al.* (2013) veröffentlichten kürzlich eine Studie, in der Ratten (m, F344,  $n(\text{initial}) = 12$  bzw. 20 pro Gruppe) dreimal pro Woche oral mit **1** (62; 125 und 250 mg/kg KG) behandelt wurden, was der gleichen Wochendosis der NTP-Studie (NTP, 2000) entspricht. Nach 16 Wochen wurde die Gabe von **1** beendet und die Hälfte der Tiere für weitere 24 Wochen mit Phenobarbital (PB<sup>+</sup>, 500 ppm in der Nahrung, kontinuierlich) behandelt, während die anderen Tiere eine Standarddiät erhielten (PB<sup>-</sup>). Nach insgesamt 8, 16 und 40 Wochen (W)

wurden aus jeder Gruppe Tiere ( $n \geq 3$ ) untersucht. Statistisch signifikant erhöhte relative Lebergewichte wurden in der mittleren und hohen Dosisgruppe in W8 (sowie bei den PB<sup>+</sup>-Tieren in W40) beobachtet. Die klinischen Leberwerte (ALAT, AST, alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Sorbitdehydrogenase) waren in W16 in allen Dosisgruppen unauffällig. Die Autoren beobachteten eine dosisabhängige Steigerung der Zellproliferation (immunohistologisch gemessen als *hepatocellular replicating fraction*) in der Leber in allen Dosisgruppen nach W8 und W16 um mindestens das doppelte ( $t = W40$  wurde nicht untersucht). Immunohistologisch GST- $\pi$  positive hepatische *Foci* wurden in allen Dosisgruppen ab W16 detektiert. In der höchsten Dosisgruppe lag die Inzidenz bereits ab W8 bei jeweils 100 % zu allen Zeitpunkten mit einer Multiplizität von im Schnitt 1,7 (W8; PB<sup>-</sup>); 3,7 (W16; PB<sup>-</sup>); 10 (W16; PB<sup>-</sup>) bzw. 30 (W40; PB<sup>+</sup>). In der niedrigsten Dosisgruppe sank die Zahl der *Foci* (67 % W16) in W40 wieder auf 15 % ab. HCA in W40 wurden bei 8 % in der mittleren und 100 % in der hohen Dosisgruppe beobachtet. Mit vorheriger Promotion durch PB lagen die Werte zum gleichen Zeitpunkt bei 21 bzw. 77 %, wobei hier Multiplizität und Größe der HCA im Vergleich zur PB<sup>-</sup>-Gruppe erhöht waren. Zudem detektierten die Autoren dosisabhängig jeweils drei verschiedene DNA-Addukte in den Lebern der behandelten Tiere im <sup>32</sup>P-Postlabelling-Assay. Die höchsten Gehalte wurden in W16 mit rund 28, 42 und 62 Addukten/10<sup>6</sup> Nukleosiden in der niedrigen, mittleren bzw. hohen Dosisgruppe detektiert (Kontrolle: 0,1 Addukte/10<sup>6</sup> Nukleoside). Nach W40 sank zwar die Zahl der DNA-Addukte ab, jedoch waren immer noch jeweils ungefähr 25 % der Addukte, die nach W16 detektiert wurden, nachweisbar. Nach W16 konnten auch in den *buffy-coats* (Leukozyten und Thrombozyten) Addukte in der Größenordnung von 0,5/10<sup>6</sup> Nukleosiden detektiert werden (Die anderen Zeitpunkte wurden nicht untersucht). Diese Ergebnisse zeigen, dass ME bereits früh initiiierende Effekte bei der männlichen Ratte verursachen kann.

## 3.4 Gentoxizität/-regulation

### 3.4.1 Methyleugenol (1)

Die Gentoxizität bzw. Mutagenität von Methyleugenol (**1**) konnte in mehreren Studien *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden (Burkey *et al.*, 2000; Levy und Weber, 1988; Chan und Caldwell, 1992; Howes *et al.*, 1990). Die gentoxischen Effekte werden dabei 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**, Chan und Caldwell, 1992; Jeurissen *et al.*, 2007; Gardner *et al.*, 1997), Methyleugenolepoxid (**15**, Delaforge *et al.*, 1980) und dem aus Eugenol (**6**) gebildeten Chinonmethid (Rietjens *et al.*, 2005) zugeschrieben, welche DNA- und Proteinaddukte bilden können (Gardner *et al.*, 1996; Jeurissen *et al.*, 2008).

### 3.4.1.1 DNA-Schäden

**1** induzierte unplanmäßige DNA-Synthese (UDS) in pRH (F344, m) sowie in prH weiblicher Mäuse (B6C3F<sub>1</sub>) ab einer Konzentration von 10 µM (Howes *et al.*, 1990; Chan und Caldwell, 1992; Burkey *et al.*, 2000) nach 18 bzw. 16 h, was auf eine Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und somit indirekt auf gentoxische Effekte schließen lässt. Die Koinkubation von **1** mit PCP (*c* = 15 µM; SULT-Inhibitor) konnte die UDS dabei komplett unterbinden, während die Zugabe von Epoxycyclohexan (*c* = 2 mM; kompetitiver Inhibitor der EHs) keinen Effekt hatte. Das proximale Kanzerogen von **1**, 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**), induzierte ebenfalls UDS in pRH (F344, m) ab *c* = 10 µM (Chan und Caldwell, 1992).

Ding *et al.* (2011) untersuchten die Wirkung von **1** *in vivo* im Comet-Assay. Hierzu wurde Ratten (m, F344, *n* = 3 pro Gruppe) **1** (400 und 1000 mg/kg KG) oral verabreicht und die DNA der Tiere drei und 24 h nach der Exposition untersucht. Dabei konnten keine signifikanten DNA-Schäden im Vergleich zu den Kontrolltieren in Leber, Lunge, Knochenmark, Blase und Niere detektiert werden. In einem weiteren Versuch wurde eine Dosis von 2000 mg/kg KG oral verabreicht und die DNA der gleichen Organe nach 1, 3, 6 und 8 h untersucht. Dabei konnte lediglich im Knochenmark nach 8 h eine leichte, aber signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchraten festgestellt werden, wobei die Autoren diesen Befund als zufällig interpretierten. Keine oxidativen DNA-Schäden konnten nach Fpg-Verdau (Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase; erkennt u. a. modifizierte Purinbasen, z. B. 8-Oxo-Guanin) in der Leber festgestellt werden jedoch, jedoch nach 6 und 8 h nach Digestion der DNA mit Endonuklease III (erkennt oxidierte Pyrimidinbasen; Collins *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 2013). Die Autoren schlossen daraus, dass **1** entweder keine DNA-Addukte bildete, diese nicht repariert wurden oder DNA-Addukte gebildet und repariert wurden, die resultierende Strangbruchrate jedoch unterhalb der Detektionsgrenzen lag.

Weiterhin induzierte **1** DNA-Schäden im *Bacillus subtilis*-DNA-Reparatur-Test (*Rec*-Test) ohne metabolische Aktivierung (Sekizawa und Shibamoto, 1982).

### 3.4.1.2 DNA-Addukte

Randerath *et al.*, 1984 detektierten im <sup>32</sup>P-Postlabelling-Assay DNA-Addukte in den Lebern von mit **1** (und weiteren Phenylpropenen) behandelten adulten, weiblichen Mäusen (CD1; Dosis 2 und 10 mg/Tier; *i. p.*; *n* = 3–4 pro Gruppe). Die Tiere wurden 24 h nach der Behandlung getötet und deren hepatische DNA untersucht. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen wiedergegeben. Bei der Behandlung mit **1** konnten zwei Haupt-DNA-

Addukte im Verhältnis von rund 1:7 identifiziert werden. Estragol, Safrol und Methyleugenol (**1**) bildeten die meisten DNA-Addukte.

Phillips *et al.*, (1984) untersuchten daraufhin die Zeitabhängigkeit der gebildeten DNA-Addukte im gleichen Assay in den Lebern von mit **1** behandelten neugeborenen, männlichen Mäusen (B6C3F<sub>1</sub>; Dosis 0,25–3,0 µmol/Tier an Tag 1, 8, 15 und 22; *i. p.*; *n* = 3 pro Gruppe). An Tag 23, 29 und 43 wurden die Tiere einer Gruppe getötet und DNA aus deren Lebern isoliert. Dabei wurden maximale Gehalte an DNA-Addukten von 72,7 pmol/mg DNA an Tag 23 und noch 25,6 pmol/mg DNA an Tag 43 detektiert, während in den Kontrollen keine Addukte nachweisbar waren.

**Tabelle 10.** Im <sup>32</sup>P-Postlabelling-Assay detektierte DNA-Addukte in Lebern von mit Phenylpropenen behandelten adulten, weiblichen CD1-Mäusen.

Compound	Dose (mg/mouse)	RAL x 10 <sup>2b</sup>		Total RAL x 10 <sup>2c</sup>
		Spot 1	Spot 2	
Allylbenzene	10	8.3 ± 1.4	2.0 ± 0.8	10.3 ± 1.4
Safrole	10	491 ± 129	140 ± 18	678 ± 151
	2	114 ± 50	29 ± 7.3	153 ± 27
Myristicin	10	134 ± 23	25 ± 9.4	165 ± 30
	2	45 ± 5.6	10 ± 3.6	56 ± 6.4
Dill apiol	10	113 ± 15	15 ± 0.8	133 ± 16
	2	22 ± 8.0	4.9 ± 1.8	27 ± 8.3
Parsley apiol	10	41 ± 6.4	5.1 ± 3.1	46 ± 9.5
	2	8.9 ± 2.4	3.2 ± 1.5	12 ± 3.5
Isosafrole	10	11.6 ± 1.8	3.4 ± 1.5	15 ± 3.2
	2	6.4 ± 1.4	3.0 ± 1.5	9.4 ± 2.3
Estragole	10	616 ± 106	327 ± 59	963 ± 51
	2	75 ± 15	33 ± 9.9	109 ± 8.2
Methyleugenol	10	560 ± 90	72 ± 14	646 ± 88
	2	127 ± 15	20 ± 5.9	150 ± 15
Elemicin	10	48 ± 5.2	5.5 ± 0.9	54 ± 5.3
	2	5.0 ± 0.6	1.2 ± 0.5	6.2 ± 0.7
Anethole	10	3.1 ± 1.0	1.3 ± 0.3	4.4 ± 0.7

<sup>b</sup>10<sup>-7</sup> RAL ± 0,3 pmol/mg DNA (RAL: *relative adduct labelling*)

<sup>c</sup>beinhaltet Spots zwei weiterer DNA-Addukte (vermutlich Adenin-Derivate) im Falle von Safrol, Myristicin, Dillapiol, Estragol und Methyleugenol (**1**). Für die anderen Testsubstanzen waren diese Spots nicht quantifizierbar.

Reprinted with permission by/Mit freundlicher Genehmigung von: Copyright © 1984 Oxford University Press from /aus: Randerath K, Haglund RE, Phillips DH, Reddy MV, „<sup>32</sup>P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice“, *Carcinogenesis*, 1984, 5, 12, 1613-22.

In Ratten konnten Willams *et al.* (2013) ebenfalls DNA-Addukte nach oraler Gabe von **1** nachweisen (s. Kap. 3.3.3).

Auch in einer humanen Hepatomzelllinie (HepG2) konnten im <sup>32</sup>P-Postlabelling-Assay nach Behandlung mit **1** (und weiteren Phenylpropenen; *c* = 50; 150 und 450 µM) zwei Hauptaddukte im Verhältnis von 1:11 detektiert werden (Zhou *et al.*, 2007). Dabei bildete **1** in der niedrigsten Konzentration mehr DNA-Addukte als Safrol und Estragol. Im Gegensatz zu den letztgenannten konnte jedoch keine Zunahme der DNA-Addukte mit der Inkubationskonzentration beobachtet werden.

### 3.4.1.3 Mutagenität

**1** wurde mehrfach negativ im Ames-Test ( $\pm$  S9) an den Stämmen *S. typhimurium* TA98, TA1537 (Leserasterverschiebung) TA100, TA1535 und *E. coli* WP2 *uvrA* (Basenpaar-substitution) getestet (Sekizawa und Shibamoto, 1982; Mortelmans *et al.*, 1986; NTP, 2000). Schiestel *et al.* (1989) detektierten eine minimale Steigerung der Mutationsfrequenzen von **1** an Stamm TA98 und TA102 nur mit metabolischer Aktivierung, während bei TA97 und TA100 keine Effekte beobachtet wurden ( $\pm$  S9). Diese negativen Ergebnisse können auf die Unfähigkeit der bakteriellen Systeme Sulfonierungsreaktionen zu katalysieren zurückgeführt werden (Greim *et al.*, 1980; Herrmann *et al.*, 2011 und 2014).

### 3.4.1.4 Chromosomenschäden

Eine konzentrationsabhängige Induktion intrachromosomaler Rekombination in Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durch **1** konnte nachgewiesen werden, wobei die beobachteten Effekte in Abwesenheit von S9-Mix ausgeprägter waren als mit metabolischer Aktivierung (Schiestl *et al.*, 1989; Brennan *et al.*, 1996).

In CHO-Zellen induzierte **1** konzentrationsabhängig den Schwesterchromatidaustausch (SCE) mit, aber nicht ohne, metabolischer Aktivierung (NTP, 2000). In der gleichen Zelllinie wurden keine Chromosomenanomalien in Konzentrationen von  $\rho(\mathbf{1}) = 50\text{--}500 \mu\text{g/ml}$  ( $\pm$  S9) beobachtet (NTP, 2000). Oral verabreichtes **1** (10–1000 mg/kg KG) an Mäuse (B6C3F<sub>1</sub>, m und f;  $n = 10$ ) über 14 Wochen erhöhte weder die Mikrokernfrequenz normochromatischer (ausgereifter), noch polychromatischer (unausgereifter) Erythrozyten im peripheren Blut. Letzteres wäre ein Indiz für Knochenmarks-Toxizität (NTP, 2000). Ferner wurden morphologische Zelltransformationen in primären Goldhamster-Embryozellen beobachtet (Kerckaert *et al.*, 1996).

### 3.4.1.5 Einfluss auf die Gen- oder Proteinexpression

Devereux *et al.* (1999) untersuchten die hepatische DNA der in der NTP-Studie (2000) mit Methyleugenol behandelten Mäuse, welche hepatozelluläre Adenome oder Karzinome ausgebildet hatten in Hinblick auf die Expression von  $\beta$ -Catenin und Mutationen in dessen Gen. Dabei identifizierten die Autoren in 69 % der DNA jeweils mehrere Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen (Basensubstitutionen sowie -deletionen) an Stellen, die man auch bei anderen Krebsarten (z. B. humanen hepatozellulären Krebsarten oder Kolonkrebs) beobachtet. Bei den spontan gebildeten Lebertumoren unbehandelter Tiere wurden nur bei 9 % Mutationen in diesem Gen gefunden. Korrespondierend konnten die Autoren auch zeigen, dass in hepatozellulären *Foci* bereits auf Proteinebene der  $\beta$ -Catenin-Gehalt deutlich vermehrt war. Immunhistologisch konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin hauptsächlich membran-nah zytosolisch, jedoch nicht nukleär akkumuliert wurde. Somit scheint der Wnt-Signalweg



(Proliferationssteigerung und Apoptosehemmung; s. Morin *et al.*, 1997) für die Kanzerogenese von **1** in der Leber eine Rolle zu spielen.

Um einen tiefergehenden mechanistischen Einblick zu erhalten untersuchten und verglichen Iida *et al.* (2005 und 2007) die Genexpression (Microarray) in den Lebern von Mäusen (B6C3F<sub>1</sub>), welche über zwei Wochen mit verschiedenen nicht-kanzerogenen Stoffen (z. B. Eugenol), gentoxischen Kanzerogenen (z. B. **1**; 75 mg/kg KG/d) und nicht-gentoxischen Kanzerogenen (z. B. Oxazepam) gefüttert wurden. In dieser sehr frühen Phase der Kanzerogenese bzw. nach der Exposition waren z. T. substanzspezifische Unterschiede in der Genexpression zu verzeichnen. Nach Behandlung mit **1** wurden insgesamt 47 Gene (von ~20.000 im Array untersuchten) signifikant reguliert.

U. a. wurden folgende Gene (Proteine) hochreguliert: *Cdkn1a* (p21; CDK-Inhibitor 1) und *Ccng1* (Cyclin-G1; Zellzyklus); *Egr1* (*Early growth response protein 1*; Transkriptionsfaktor; Zelldifferenzierung und Mitogenese; wahrscheinlich Tumorsuppressor), *Dnase2a* (saure DNase II $\alpha$ ; z. B. bei der Apoptose) und *Gadd45b* (*Growth arrest and DNA-damage-inducible-45 $\beta$* ; Apoptose); *Junb* (*Jun B proto-oncogene*), bzw. runterreguliert: *Fhit* (*fragile histidine triad protein*; Tumorsuppressor) sowie *Wwox* (*WW domain-containing oxidoreductase* [W = Tryptophan]; wahrscheinlich beteiligt an Apoptose und Wirkung als Tumorsuppressor); *InhbA* (Inhibin- $\beta_A$ ; Apoptose) und *Cish* (*Cytokine-inducible SH2-containing protein*; Apoptose). Anhand dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass **1** bereits in einer frühen Phase die Apoptose unterdrücken kann.

Ding *et al.* (2011) untersuchten die Genexpression von 84 Genen der Lebern von mit **1** (2000 mg/kg KG) oral behandelten Ratten (m, F344,  $n = 4$ ) nach 1, 3, 6 und 8 h. Davon wurden neun Gene zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verschieden reguliert. Drei Stunden nach der Behandlung waren folgende Gene signifikant herunterreguliert:

*Brca1* und *Rad1* (DNA-Schaden-Bindung); *Mpg* und *Ogg1* (DNA-Basenexzisionsreparatur); *Rad52* (Doppelstrangbruchreparatur); *Pms1*, *Pms2* und *Pold3* (Basenfehlpaarungsreparatur) sowie *Rad9* (Zellzyklus-*checkpoint*-Kontrolle). Zu den anderen Zeitpunkten wurden diese Transkripte teilweise wieder hochreguliert. Die Autoren schlossen daraus, dass die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen ein potentieller Mechanismus der gentoxischen oder kanzerogenen Wirkung von **1** sein könnte.

Gardner *et al.* (1997) untersuchten die Enzymgehalte und -aktivitäten einiger CYPs in Lebermikrosomen von mit **1** (10–300 mg/kg KG) behandelten Ratten. Dabei konnten die Autoren eine dosisabhängige Induktion der untersuchten CYP-Aktivitäten beobachten. Am

ausgeprägtesten waren diese Effekte in folgenden Assays: PROD (7-Pentoxyresorufin-O-Depentylase; CYP2B); EROD (7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase; CYP1A) sowie Testosteron-7 $\alpha$ - und -6 $\beta$ -Hydroxylase (CYP3A). Auf Proteinebene konnte eine Induktion von CYP1A2 nachgewiesen werden, wobei der CYP-Gesamtgehalt unbeeinflusst blieb.

### 3.4.2 Methylisoeugenol (2)

Für Methylisoeugenol (2) liegen keine Daten zur Genotoxizität/-regulation vor.

### 3.4.3 Asarone

#### 3.4.3.1 DNA-Schäden

Ramos-Ocampo und Hsia (1988) konnten keine UDS (unplanmäßige DNA-Synthese) in pRH detektieren während Hasheminejad und Caldwell (1994) in pRH ab einer Konzentration von 50–100  $\mu$ M UDS nach Inkubation von **3** und ausgeprägter von **4** detektierten. Die Koinkubation von **3** (100  $\mu$ M) mit steigenden Cimetidinkonzentrationen (1  $\mu$ M–10 mM; CYP-Inhibitor) senkte dabei konzentrationsabhängig die UDS-Rate. Die Koinkubation von PCP (5 und 10  $\mu$ M; SULT-Inhibitor) mit **3** verringerte geringfügig die UDS-Rate, führte aber auch zu einer gesteigerten Zytotoxizität.

**3** induzierte DNA-Strangbrüche im Comet-Assay ab einer Konzentration von 1,9  $\mu$ g/ml in L929-Zellen (adhärent wachsende Mausfibroblasten) nach 1 h (Marczewska *et al.*, 2013). **3**, **4** und **5** induzierten DNA-Strangbrüche (Comet-Assay) nach 1 und 24 h mit und ohne Fpg-Behandlung ab 5–10  $\mu$ M in V79 Zellen, jedoch keine zusätzlichen DNA-Schäden durch Fpg (Vallicotti, 2012).

Im *E. coli* PQ37 Genotoxizitäts-Assay (SOS Chromotest) erzeugte die Mischung von **3** und **4** (7:3; 0,05–6,3  $\mu$ g/Assay) eine konzentrationsabhängige SOS-Antwort bei Supplementation von S9-Mix (Kevekordes *et al.*, 1999).

#### 3.4.3.2 Mutagenität

Die Ergebnisse zur Mutagenität von  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) im Ames-Test sind uneinheitlich: **3** und **4** waren negativ im Ames-Test an den *S. typhimurium* Stämmen TA98, TA100, TA1535, 1537 und 1538 in Konzentrationen von 2–200  $\mu$ g/Platte mit und ohne metabolischer Aktivierung (Hsia *et al.*, 1979). In anderen Untersuchungen wurden **4** und verschiedene nicht spezifizierte kalmushaltige Pflanzenpräparate auf deren mutagenes Potential getestet. Dabei zeigte **4** geringe mutagene Effekte in TA100 mit metabolischer

Aktivierung ab 43 µg/Platte, aber nicht in TA98, 1535, 1537 und 1538 (±S9). Von den asaronhaltigen Arzneimitteln zeigte eines erhöhte Mutagenität an TA100 (+S9) (Göggelmann und Schimmer, 1983; Abel und Göggelmann, 1986). Mohar *et al.* (1986) berichteten über mutagene Effekte von **3** im Ames Test an Stamm TA100. Sie untersuchten ferner den Urin von mit **3** gefütterten Ratten und detektierten dort an TA100 und UTH8414 mutagen wirkende Glucuronide. In einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde **3** jedoch negativ an Stamm TA97, 98, 100 und 102 in Konzentrationen von 19,5–78,1 µg/Platte (± S9-Mix) getestet (Marczewska *et al.*, 2013).

(*E*)-1',2'-Asaronepoxid (**39a**) zeigte deutliche, konzentrationsabhängige mutagene Effekte im Ames-Test in TA100 > TA1535 > TA98 ab einer Konzentration von ca. 10 µg/Platte (Kim *et al.*, 1999).

### 3.4.3.3 Chromosomenschäden

Abel (1987) untersuchte die chromosomenschädigende Wirkung eines Stoffgemisches von **3** und **4** (7:3; 107 µg/ml) in humanen Lymphozyten. Eine starke Induktion von Chromatidtyp-Abberationen wurde bei Zugabe von Lebermikrosomen (LM) detektiert, welche eine maximale Zahl der Bruchereignisse bei einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml erzeugten. Daneben wurden *Gaps* und Translokationen beobachtet. Mit höheren mikrosomalen Konzentrationen sank die Zahl der Abberationen, jedoch zugleich auch der Mitoseindex, was die Autorin auf eine starke Zellschädigung zurückführte. Neben den klastogenen Effekten wurde eine geringe, aber signifikante Zunahme der Schwesterchromatidaustauschrates (SCE) durch das Stoffgemisch von **3** und **4** beobachtet.

Reines **3** induzierte ebenfalls – gering, aber signifikant – die SCE *in vitro* in humanen Lymphozyten und *in vivo* in Knochenmarkszellen (Maus, Balb/c, m, *n* = 4 pro Gruppe, Dosis 25–100 mg/kg KG, *i. p.*) (Morales-Ramírez *et al.*, 1992).

**4**, nicht jedoch **3**, (jeweils 50–200 µg/ml), erhöhte statistisch signifikant die Mikrokernfrequenz in HepG2-Zellen mit aber nicht ohne Zusatz von S9-Mix, wobei bei den Konzentrationen mit positivem Ergebnis bereits zytotoxische Effekte beobachtet wurden (Unger und Melzig, 2012). In einer weiteren Untersuchung erhöhte **4** ebenfalls die Mikrokernrate in HepG2-Zellen (Kevekordes *et al.*, 2001). Keine mikrokerninduzierenden Effekte wurden hingegen bei Inkubation von **3**, **4** oder **5** (*c* = 10–100 µM) bei metabolisch weniger kompetenten V79-Zellen nach 1 und 24 h ohne metabolische Aktivierung beobachtet (Vallicotti, 2012).

## 3.5 Subakute und subchronische Toxizität

### 3.5.1 Methyleugenol (1) und Methylisoeugenol (2)

Nach oraler Gabe von **1** (18 mg/kg KG) an 24 weibliche und 24 männliche Sprague-Dawley-Ratten konnten nach 91 Tagen außer einer geringen Zunahme des Lebergewichtes keine Auffälligkeiten beobachtet werden (Osborne *et al.*, 1981).

Aus einer weiteren 14-Wochen-Studie an je 10 männlichen und weiblich F344-Ratten sowie B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen wurden die NO(A)EL zu je < 10 mg/kg KG abgeschätzt, wobei der LOAEL jeweils der niedrigsten Dosisgruppe entsprach (NTP, 2000; Abdo *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Dabei stellte man hauptsächlich die nachfolgenden Befunde: Ratte: Mikrozytose und Thrombozytose; ALAT- und Sorbitdehydrogenaseaktivität↑; Gallensäuren↑; hepatische Hypoproteinämie und Hypalbuminämie, Gastrin↑, Magensäure↑; hepatozelluläre Veränderungen wie Zytomegalie, Kupferzellpigmentierung, Foci↑, Gallenganghyperplasie; Atrophie und chronische Entzündung der Mukosa des Drüsenmagens. Maus: vielfältige zytologische Leberveränderungen, Nekrose, Gallenganghyperplasie, subakute Hepatitis; Drüsenmagen: Atrophie, Degeneration, Nekrose, Ödeme, mitotische Veränderungen und zystische Drüsenveränderungen im Bereich des Magenfundus.

Zur Studie von Williams *et al.* (2013) siehe Kap. 3.3.3.

In einer 28-Tage-Studie, bei der 16 weiblichen und 16 männlichen Sprague-Dawley-Ratten **2** in Dosen von 30, 100 und 300 mg/kg KG pro Tag oral verabreicht wurde, konnten, außer einer geringen Zunahme des Lebergewichtes, keine potentiell adversen Effekte beobachtet werden (Purchase *et al.*, 1992).

### 3.5.2 Asarone

β-Asaron (**4**, 100 mg/kg KG; *i. p.*; 5 Tage) verringerte bei jungen SD-Ratten ( $n = 4$ ) die Gewichtszunahme und die spezifischen Herz- und Thymusgewichte und erhöhte das Nierengewicht. Ebenso wurde eine höhere Inzidenz thymaler Einzelzelldegenerationen festgestellt. Die Behandlung hatte keinen Effekt auf die hepatische mikrosomale Proteinkonzentration, deren CYP-Gehalt und Serum-Transaminaselevel (ALAT, AST), welche klinisch-diagnostische Parameter für Leber- oder Gallenwegsschäden und -erkrankungen darstellen (Ramos-Ocampo und Hsia, 1987).

López et al. (1993) untersuchten in einer subakuten *in vitro*-Studie die von  $\alpha$ -Asaron (**3**, 1–50  $\mu\text{g/ml}$  im Inkubationsmedium) ausgelösten Effekte auf primäre Rattenhepatozyten in 3T3-Kokultur (Fibroblastenzelllinie). Die Autoren detektierten intrazytoplasmatische Fettvakuolen, eine 2,3-fache Erhöhung der Triglyceridgehalte, die Vergrößerung und Vakuolisierung der Mitochondrien, eine bis zu 67 % verminderte Proteinsynthese und -sekretion, zytotoxische Effekte und Strukturveränderungen.

Zu  $\gamma$ -Asaron (**5**) liegen keine Daten vor.

### 3.5.3 Kalmusöle

Indisches Kalmusöl aus der Jammu-Region (JOC) wurde in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 % für 18 Wochen dem Futter von Ratten (m, f) zugesetzt. Die Hauptbefunde waren erhöhte Sterblichkeit; verringerte Gewichtszunahme sowie degenerative Veränderungen an Leber und Herz (Taylor *et al.*, 1967; Hagan *et al.*, 1967). In einer weiteren Studie wurde der hydroalkoholische Extrakt des Rhizoms von europäischem Kalmus (EOC) an je 11 männliche und 11 weibliche Ratten in einer Konzentration von 0,27–5,3 % ( $\beta$ -Asarongehalt 30–583 ppm) in der Nahrung über 13 Wochen verfüttert. Hierbei wurden keine makroskopischen oder histopathologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (JECFA, 1981).

Die subchronische Toxizität von JOC, EOC und indischem Kalmusöl aus der Kashmir-Region (KOC) wurde ferner an Gruppen von je 10 Ratten jedes Geschlechts getestet. Dabei wurden die Kalmusöle in zwei Experimenten einmal der Nahrung zugesetzt (1 %) oder oral verabreicht (250 mg/kg KG JOC; 847 mg/kg KG EOC; 1082 mg/kg KG KOC). Die Behandlungs- und Beobachtungsdauer betrug 9–14 Wochen. In der Fütterungsstudie wurden Veränderungen an Herz (Atrophien der Herzmuskelzellen; nur JOC: fettige Infiltrationen des Myokards; JOC und EOC: kardiale Fibrosen) und Leber (zentrolobuläre fettige Degenerationen, indikativ für eine chronische passive Hyperämie resultierend aus einer Herzinsuffizienz; zentrolobuläre koagulative Nekrose, Fibrose, Gallengangshyperplasien) beobachtet. Bei Sondenfütterung wurden die gleichen Befunde erhalten, wobei die meisten bzw. schwerwiegendsten Schäden durch JOC, die geringsten durch KOC verursacht wurden (JECFA, 1981).

Keine Effekte wurden hingegen an Hausmeerschweinchen (je  $n = 4$ ; m und f; *i. p.*) nach Dosierung von 1  $\mu\text{l/kg KG}$  indischem Kalmusöls an sechs Tagen pro Woche über sechs Wochen beobachtet (Chopra *et al.*, 1957).

### 3.6 Akute Toxizität

In Tabelle 11 sind die verfügbaren LD<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen **1–4** und verschiedener Kalmusöle zusammengefasst. Die akute Toxizität dieser Verbindungen war in allen untersuchten Spezies und Administrationsrouten mit LD<sub>50</sub>-Werten von 112–8800 mg/kg KG relativ gering. Eine Ausnahme bildete die intraperitoneale Gabe von indischem Kalmusöl beim Hausmeerschweinchen, für das ein LD<sub>50</sub>-Wert von 2,75 mg/kg KG berichtet wurde.

**Tabelle 11.** LD<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Phenylpropene **1–4** sowie verschiedenen Kalmusölen.

Substanz	Administrationsweg	Spezies	LD <sub>50</sub> [mg/kg KG]	Quelle	
<b>Methyleugenol (1)</b>	oral	Ratte	810–1560	1, 2	
	oral	Ratte	1179	3	
	oral	Maus	540	1	
	dermal	Kaninchen	> 2025	2	
	<i>i. p.</i>	Maus	540	17	
	<i>i. v.</i>	Maus	112	17	
	inhalativ	Ratte	> 4,8 mg/l	3	
<b>Methylisoeugenol (2)</b>	oral	Ratte	2500	6	
	<i>(cis)</i> <i>i. p.</i>	Maus	500	4	
	<i>(trans)</i> <i>i. p.</i>	Maus	350	4	
	dermal	Kaninchen	> 5000	5	
	<i>i. v.</i>	Maus	181	6	
	<i>i. p.</i>	Maus	570	6	
	<i>(cis)</i> oral	Maus	300	7	
	<i>(cis)</i> oral	Kaninchen	3200	7	
<b>α-Asaron (3)</b>	<i>(cis)</i> oral	Ratte	980	7	
	oral	Maus	418	8	
	<i>i. p.</i>	Maus	310	8	
	<i>i. p.</i>	Maus	225,5	9	
<b>β-Asaron (4)</b>	<i>i. p.</i>	Maus	245,2	16	
	oral	Ratte	1010	10	
	<i>i. p.</i>	Maus	184,2	9	
<b>γ-Asaron (5)</b>	oral	Ratte	770	11	
	keine Daten bekannt				
<b>Kalmusöl</b>	europäisch	oral	Ratte	8800	12
	europäisch	<i>i. p.</i>	Maus	1139	9
	europäisch, frei von <b>3, 4</b>	<i>i. p.</i>	Maus	1709	9
	europäisch, ~ 5% <b>4</b>	oral	Ratte	3497	10
	indisch; "Jammu", ~ 75 % <b>4</b>	oral	Ratte	777	2
	indisch; "Kashmir", ~ 5 % <b>4</b>	oral	Ratte	4331	10
	indisch	<i>i. p.</i>	Maus	154,5	9
	indisch	<i>i. p.</i>	Maus	177	14
	indisch	<i>i. p.</i>	Ratte	221	13
	indisch	<i>i. p.</i>	Meerschweinchen	2,75	15

**Quellen:** 1: NTP, 2000; 2: Jenner *et al.*, 1964; 3: Beroza *et al.*, 1975; 4: Caujolle und Meynier, 1960; 5: Keating, 1972; 6: MSDS Sigma-Aldrich CAS 93-16-3; 7: MSDS Clearsynth CAS 6380-24-1; 8: Belova *et al.*, 1985; 9: Yabiku *et al.*, 1980; 10: JECFA, 1981; 11: Taylor *et al.*, 1967; 12: Opdyke, 1977; 13: Dandiya und Cullumbine, 1959; 14: Dandiya *et al.*, 1959; 15: Chopra *et al.*, 1957 (referenziert in 10); 16: Morales-Ramírez *et al.*, 1992; RTECS, 2008.

### 3.7 Zytotoxizität

In Tabelle 12 sind die verfügbaren Daten zur Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanzen **1–5** und Kalmusöl zusammengefasst.

**Tabelle 12.** Daten zur Zytotoxizität der untersuchten Phenylpropene **1–5** und von Kalmusöl.<sup>a</sup>

Substanz	Zell-system	Spezies, Geschlecht	Assay	EC <sub>50</sub> [µM]	Quelle
<b>Methyleugenol (1)</b>	prH	Fischer-344-Ratte, m	LLA	3000	1
	prH	B6C3F1-Mäuse, w	LLA	1000	1
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	>2000	2
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	307	2
	prH	Fischer-344-Ratte, m	LLA	~3000	3
	prH	Fischer-344-Ratte, m	LLA	>1000	4
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	- <sup>b</sup>	5
<b>(E)-Methylisoeugenol (2)</b>	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	164	6
<b>α-Asaron (3)</b>	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	1067	7
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	230	7
	prH	Fischer-344-Ratte, m	LLA	~1000	8
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	>100	9
<b>β-Asaron (4)</b>	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	201	7
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	92	7
	prH	Fischer-344-Ratte, m	LLA	~1000	8
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	> 100	9
<b>γ-Asaron (5)</b>	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	890	7
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	182	7
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	>100	9
<b>Kalmusöl</b> , indisch, ca. 92 % <b>4</b> und 4 % <b>3</b>	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	610	7
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	471	7

<sup>a</sup>Alle Werte gemessen nach 18–24 h Inkubationsdauer; <sup>b</sup>keine signifikante Effekte bis 100 µM nach 24, 48 und 72 h. **Abkürzungen:** EC<sub>50</sub>: mittlere effektive Konzentration (schließt IC<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> ein); prH: primäre Hepatozyten; V79: Lungenfibroblastenzelllinie; LLA: LDH-*leakage assay*; RRT: Resazurinreduktionstest; SRB: Sulforhodamin-B-Test. **Quellen:** 1: Burkey *et al.*, 2000; 2: Cartus *et al.*, 2012; 6: Weishaupt, 2010; 7: Stegmüller, 2012; 8: Hasheminejad und Caldwell, 1994; 9: Vallicotti, 2012; 3: Howes *et al.*, 1990; 4: Chan *et al.*, 1992; 5: Groh *et al.*, 2012.

Je nach Testsystem lagen die beobachteten EC<sub>50</sub>-Werte (bzw. IC<sub>50</sub>- oder LC<sub>50</sub>-Werte) der Substanzen im mittleren µM- bis unteren mM-Bereich und somit vergleichsweise hoch. Die Muttersubstanzen sind also moderat oder wenig zytotoxisch, während die Phase-I-Metaboliten der Verbindungen **1–5** teilweise deutlich höhere Zytotoxizitäten aufweisen.

In Tabelle 13 sind die Zytotoxizitäten einiger Metaboliten der Verbindungen **1–5** zusammengefasst. Die geringsten EC<sub>50</sub>-Werte und somit die höchsten Zytotoxizitäten wurden für die 1'-Oxomethyleugenol (**22**) und 1'-Oxoasaron (**30**) ermittelt. Etwas geringer zytotoxisch waren

die entsprechenden Alkohole **11** und **29**. Die anderen Metaboliten wiesen Zytotoxizitäten im mittleren  $\mu\text{M}$ -Bereich auf und sind somit ähnlich zytotoxisch wie deren Muttersubstanzen.

**Tabelle 13.** *In vitro*-Zytotoxizitäten der untersuchten Phenylpropene **1–5** und von Kalmusöl.<sup>a</sup>

Substanz	Zell-system	Spezies, Geschlecht	Assay	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	Quelle
1'-Hydroxymethyleugenol ( <b>11</b> )	prH	Fischer-344-Ratte,	LLA	>100	1
	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	46	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	93	2
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	>100	3
1'-Oxomethyleugenol ( <b>22</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	13	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	116	2
6-Hydroxymethyleugenol ( <b>19</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	463	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	550	2
Methyleugenolepoxid ( <b>15</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	310	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	1342	2
	HT29	human, f	SRB	>100	4
	V79	Chin. Hamster, m	WST-1	>100	3
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	>100 <sup>b</sup>	3
<i>(E)</i> -3'-Hydroxymethyl-isoeugenol ( <b>12</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	1397	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	1183	2
<i>(E)</i> -3'-Oxomethylisoeugenol ( <b>23</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	328	2
	prH	Wistar-Ratte, m	LLA	1478	2
	HT29	human, f	SRB	>100 <sup>c</sup>	4
	V79	Chin. Hamster, m	SRB	>100 <sup>b</sup>	3
	V79	Chin. Hamster, m	WST-1	>100	3
<i>(E)</i> -3'-Hydroxyasaron ( <b>33</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	388	5
1'-Hydroxyasaron ( <b>29</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	147	5
1'-Oxoasaron ( <b>30</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	27	5
<i>threo</i> -1',2'-Dihydro-1',2'-dihydroxyasaron ( <b>39</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	- <sup>d</sup>	6
<i>erythro</i> -1',2'-Dihydro-1',2'-dihydroxyasaron ( <b>40</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	- <sup>d</sup>	6
<i>(RS)</i> -2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxyasaron ( $\gamma$ A-Diol; <b>41</b> )	prH	Wistar-Ratte, m	RRT	- <sup>d</sup>	6

<sup>a</sup>Alle Werte gemessen nach 18–24 h Inkubationsdauer; <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> zwischen 69–83  $\mu\text{M}$  nach 48 h und 72 h; <sup>c</sup>EC<sub>50</sub> nach 48 h und 72 h  $\sim$ 100  $\mu\text{M}$ ; <sup>d</sup>keine zytotoxischen Effekte bis 2000  $\mu\text{M}$ . **Abkürzungen:** EC<sub>50</sub>: mittlere effektive Konzentration (schließt IC<sub>50</sub> und LC<sub>50</sub> ein); prH: primäre Hepatozyten; V79: Lungenfibroblastenzelllinie; HT29: Kolonkarzinomzelllinie; LLA: LDH-*leakage assay*; RRT: Resazurinreduktionstest; SRB: Sulforhodamin-B-Test; WST-1: *water soluble tetrazolium assay*. **Quellen:** 1: Chan und Caldwell, 1992; 2: Cartus *et al.*, 2012; 3: Groh *et al.*, 2013; 4: Groh *et al.*, 2012; 5: Stegmüller, 2012; 6: Simson, 2012.



### 3.8 Proteinaddukte

Gardner *et al.* (1996 und 1997) brachten 1'-Acetoxymethyleugenol bzw. 3,4-Dimethoxyzimtsäure (**26**) mit Kaninchen-Serumalbumin (*rabbit serum albumine*, RSA) zur Reaktion. Mit diesen Konjugaten wurden dann Kaninchen immunisiert und polyklonale Antisera gewonnen. Nun wurden Ratten mit **1** behandelt (F344, m, *i. p.*, 10–300 mg/kg KG/d über 5 Tage, Tötung an Tag 6; bzw. Einzeldosis 10 und 100 mg/kg KG, Tötung 4 h nach Gabe) und aus den Lebern zytosolische, subzelluläre und mikrosomale Fraktionen gewonnen. Diese wurden mit den polyklonalen Antikörpern inkubiert und Proteinaddukte im ELISA detektiert. Nach SDS-PAGE konnte ein Haupt-Proteinaddukt (44 kDa) nachgewiesen werden. Quantitativ wurde eine dosisabhängige Zunahme der Adduktlevel in den behandelten Tieren festgestellt. Die höchsten Gehalte wurden in der mikrosomalen Fraktion, die geringsten im Zytosol detektiert. Ein gleichschweres Addukt wurde nach Inkubation von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) mit pRH beobachtet, jedoch nicht nach Inkubation mit **1** (jeweils 50–500 µM, 3 h). Nach Inkubation von LM unbehandelter Ratten mit **1** (200 µM) konnten vielfältige Proteinaddukte (> 44 kDa) detektiert werden. In Inkubationen hepatischer postmitochondrialer Fraktionen unbehandelter Ratten mit **1** (500 µM) wurden Proteinaddukte nur in Gegenwart von PAPS oder NADPH detektiert. **11** (500 µM) bildete in diesem Versuch nur Proteinaddukte in Anwesenheit von PAPS, während 3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**; 500 µM) und Eugenol (**6**; 500 µM) inaktiv waren. Aus letzterem Befund schlossen die Autoren, dass die Bildung einer Chinonmethid-Spezies aus **1** (über **6**) nicht an der Bildung von Proteinaddukten beteiligt ist. Das beobachtete 44 kDa-Proteinaddukt, bzw. das betroffene Protein wurde in dieser Studie nicht näher charakterisiert.

### 3.9 Reproduktionstoxizität und Teratogenität

$\alpha$ -Asaron (**3**) wurde im 'Dominant-Lethal-Test' (OECD Nr. 478) untersucht, wobei nach oraler Gabe von 10 und 20 mg/kg KG **3** an fünf Tagen pro Woche über acht Wochen bei CF<sub>1</sub>-Mäusen keine Effekte gesehen wurden (Chamorro *et al.*, 1999). Im gleichen Test wurde **3** für fünf Tage in Dosen von 10 und 30 mg/kg KG oral CF<sub>1</sub>-Mäusen verabreicht. Dabei wurde eine erhöhte Inzidenz für Postimplantationsverluste sowie verringerte Spermienkonzentration und -motilität beobachtet (Chamorro *et al.*, 1998). Anhand dieser Ergebnisse wurde auf dominant letale Keimzellmutationen und eine direkte substanzvermittelte Toxizität geschlossen. Das gleiche Ergebnis wurde an Wistar-Ratten (5, 10, 15 mg/kg KG **3** über 5 Tage, oral) beobachtet (Chamorro *et al.*, 1996). Signifikante teratogene Effekte wurden ebenfalls bei Mäusen identifiziert, denen täglich **3** (60 mg/kg KG) oral verabreicht wurde (Salazar *et al.*, 1992).

Mit **4** (0,04–4,0 mg) okulierte Hühnerembryos wiesen eine Überlebensrate von 43 % bzw. 0 % auf. Demgegenüber wurde nach Behandlung mit europäischem Kalmusöl, indischem Kalmusöl, welchem **4** entzogen wurde (je 0,15 und 15 mg) oder **3** (0,04–4,0 mg) keine erhöhte Sterblichkeit oder teratogene Effekte beobachtet (Yabiku, 1980 in JECFA, 1981).

Für **1**, **2** und **5** liegen keine Daten zu Reproduktionstoxizität oder Teratogenität vor.

### 3.10 Pharmakologische Wirkungen

Asaronhaltigen Pflanzen werden in vielen traditionellen Medizinen (TM) umfangreiche Wirkungen, u. a. magenberuhigende, krampflösende, appetitanregende und antidiarrhoische Wirkungen zugeschrieben. Daneben wurden schmerzlindernde, entzündungshemmende, antibiotische, antidepressive und sedative Wirkungen sowie positive Effekte bei Epilepsie, Hypercholesterinämie, Gedächtnisschwäche, Bluthochdruck und Hyperventilation beschrieben (Pandit *et al.*, 2011; Poplawski *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2007a-c; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011; Karwicka *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2014). Die Liste der berichteten (positiven) Effekte *in vitro* und *in vivo* lässt sich nahezu beliebig fortsetzen. In der mexikanischen TM wird die Yumel-Pflanze (*Guatteria gaumeri* Greenman) zur Behandlung von Gallensteinen und Senkung des Cholesterinspiegels eingesetzt, wobei die Wirkung  $\alpha$ -Asaron (**3**) zugeschrieben wurde (Antúnez-Solís *et al.*, 2009). In der chinesischen TM werden „Shui-Chang-Pu“ (*Acorus calamus* L.), „Qian-Chang-Pu“ (*A. gramineus* Soland) und „Shi-Chang-Pu“ (*A. atatarinowii* SCHOTT) u. a. zur Behandlung von Demenz eingesetzt (Hu und Feng, 2000).

Auch in der westlichen humanen Phytotherapie und Homöopathie finden asaronhaltige, getrocknete Kalmuswurzeln oder etherisches Kalmusöl als Inhaltsstoffe für Präparate und Zubereitungen (z. B. Tees, Tropfen oder Tonika) sowie zur Herstellung bzw. Aromatisierung von Kräuterschnäpsen, -likören und Magenbittern zur Behandlung von Magenproblemen Verwendung (Rajput *et al.*, 2013; Göggelmann und Schimmer, 1983; Stahl und Keller, 1981).

Daneben wurde nach hochdosierter Einnahme von Kalmusölen oder -zubereitungen in seltenen eine halluzinogene Wirkung beschrieben. Die Hypothese, dass **3** oder **4** *in vivo* zum potenten Halluzinogen 2,4,5-Trimethoxyamphetamin oder Derivaten davon metabolisiert wird, konnte wissenschaftlich nicht bestätigt werden (Björnstad *et al.*, 2009; Schultes, 1976; EMCDDA, 2004; Hoffer und Osmond, 1967).

## 3.11 Risikobewertung und Regulation

### 3.11.1 Methyleugenol (1)

In verschiedenen Lebensmitteln wie Eiscreme, nicht-alkoholischen Getränken und auch Backwaren wird der Gehalt von Methyleugenol (**1**) mit bis zu 45 ppm angegeben (Burdock, 2004). Ferner ist **1** als Inhaltsstoff diverser Kosmetika wie Seifen, Haarwaschmitteln oder Parfums (Burkey *et al.*, 2000; FCT, 1975) mit Gehalten von bis zu 1 % enthalten (IARC, 2012). Schechter *et al.* (2004) bestimmten **1** in Gehalten von bis zu 3,3 µg/kg in kommerziellen Lebensmitteln wie Backwaren, Kaugummis, Salatsaucen, Cola-Getränke sowie aromatisierten Haferflocken. Siano *et al.* (2003) untersuchten ebenfalls verschiedene kommerzielle Lebensmittel und detektierten **1** in Gehalten von 0,01–0,33 mg/kg (Tomatensaucen), 0,01–0,52 (Basilikumpesto); 0,10–0,14 mg/kg (Wiener Würstchen); 0,03–0,06 (Cola-Getränke) und 0,49–0,75 mg/kg (frisches Basilikum). In einer aktuelleren Arbeit wurden teilweise hohe maximale Methyleugenolgehalte von bis zu 9,3 g/kg (Piment), 4,7 g/kg (Muskatnuss) und 1,2 g/kg (Basilikum) nachgewiesen. Basilikumreiches, verzehrfertiges Pesto ( $n = 8$ ) enthielt im Gegensatz dazu mit durchschnittlich 1,1 und maximal 5,3 mg/kg zwar weniger **1**, wird aber in höheren Mengen verzehrt als die genannten Gewürze (Grosch *et al.*, 2013).

Die jährliche Produktionsmenge von **1** in den USA wurde für das Jahr 1990 auf 11,4 t geschätzt (NTP, 2000). Neuer Daten geben 62 kg (Burdock, 2004) bzw. 77 kg (Gavin *et al.*, 2010) an, was eine deutliche Reduktion darstellt. Jedoch beträgt die jährliche Aufnahme von **1** allein durch ein einzelnes Gewürz (Piment) nach Berechnungen von Smith (2010) 1170 kg/a für die Gesamtbevölkerung der USA. Die FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*) gab einen PADI (*possible average daily intake*) von 5,485 mg für **1** an (Burdock, 2004).

Smith *et al.* (2002) berechneten die geschätzte tägliche Aufnahme von **1** auf 0,77 µg/kg KG/d für die Bevölkerung der USA. Williams und Mattia (2009) berechneten die geschätzte tägliche Aufnahme von **1** natürlichen Ursprungs (Minimum–Maximum; Median) auf 2,5–424; 80,5 µg/d für die USA und 0,6–39; 9,6 µg/d für Europa unter Einbeziehung der jeweiligen Gesamtbevölkerung. Für die europäische Bevölkerung wurde ein TAMDI (*theoretical added maximum daily intake*) von 4,6 mg/d bzw. 66 µg/kg KG/d berechnet (Smith *et al.*, 2010)

Somit liegt die durchschnittliche Exposition von **1** für die Gesamtbevölkerung in der Größenordnung von 0,13–1,35 µg/kg KG/d und die durchschnittliche Exposition für den Teil der Bevölkerung, der regelmäßig **1**-reiche Lebensmittel konsumiert in der Größenordnung von 66–514 µg/kg KG/d (IARC, 2012; Smith *et al.*, 2010). Aus diesen Daten wurde ein *Margin*

of exposure (MOE) von 100–800 abgeleitet (Smith *et al.*, 2010), wobei die Autoren von Grosch *et al.* (2013) anhand der identifizierten Gehalte in Lebensmitteln einen MOE von 3084 ableiteten.

In der Europäischen Union darf **1** als solches Lebensmittel oder Kosmetika nicht zugesetzt werden (AromV; Verordnung (EG) Nr. 1334/2008; KosmetikV Anlage 1 zu § 1). Für bestimmte zusammengesetzte Lebensmittel, denen Aromen und/oder Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zugesetzt wurden, gelten Höchstmengen für **1**, welches von Natur aus in Aromen und Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften vorkommt. Die Höchstmengen reichen von 1 mg/kg für alkoholische Produkte bis 60 mg/kg für Suppen und Saucen. Für die Verwendung frischer, getrockneter oder tiefgekühlter Kräuter oder Gewürze (z. B. **1** in einem Basilikum-Pesto) gelten keine Höchstwerte (AromV; Verordnung (EG) Nr. 1334/2008). Für kosmetische Produkte gelten Höchstmengen für den aus ätherischen Ölen stammenden natürlichen Gehalt von **1** zwischen 0,01 % in Parfüm und 0,0002 % in Erzeugnissen zur Mundpflege und sonstigen Mitteln, die auf der Haut verbleiben (KosmetikV Anlage 1 zu § 1).

In den USA wurde **1** als synthetischer Aromastoff im Jahr 1965 durch die U. S. *Food and Drug Administration* (FDA) als *generally recognized as safe* (GRAS) eingestuft (21 CFR 121.1164; *Code of Federal Regulations*) und dieser Status 2009 bestätigt (21 CFR 172.515), vorausgesetzt, der Einsatz erfolgt unter der allgemeinen Bedingung, dass der Stoff in der für den gewünschten Effekt geringstmöglichen Menge eingesetzt oder der Einsatz unter den allgemeinen Regeln und Prinzipien der *Good Manufacturing Practice* (GMP) erfolgt (21 CFR §172.515a).

Das *Scientific Committee on Food* (SCF) der Europäischen Union (EU) evaluierte Methyleugenol (**1**) im Jahr 2001 (SCF, 2001) und kam zu dem Schluss, dass **1** ein gentoxisches Kanzerogen darstellt und der Einsatz daher – auch wenn humane Daten fehlen – eingeschränkt werden sollte. Andererseits kam das *Expert Panel* der FEMA (Smith *et al.*, 2002) zu dem Schluss, dass **1** kein signifikantes humanes Krebsrisiko darstelle. Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) evaluierte **1** 2012 als möglicherweise krebserzeugend für den Menschen (Kategorie 2B).

Obgleich der direkte Einsatz von Methyleugenol (**1**) als Duftstoff für Kosmetika oder als Aromastoff in Lebensmitteln in manchen Ländern verboten ist, unterliegen die natürlichen Gehalte dieser Stoffe in Pflanzen oder pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln (PFS) zumeist keiner Regulierung. Somit können im Einzelfall beträchtliche Mengen dieser Stoffe aufge-

nommen werden. Van den Berg *et al.* (2011a, b) berechneten MOE-Werte für den laut Herstellerangaben empfohlenen Verzehr von basilikum-, zimt-, muskatnuss- oder sassafras-haltigen, kommerziell gehandelten PFS, wobei MOEs von bis zu minimal 5 für **1** resultierten.

### 3.11.2 Methylisoeugenol (2)

In Lebensmitteln ist Methylisoeugenol mit Gehalten bis zu 110 ppm enthalten (Fenaroli, 1975) und wurde beispielsweise in Tomaten, Pflaumen, Dill, Nelken, Kaffee und Tees nachgewiesen. Die durchschnittlichen Gehalte verschiedener Lebensmittel betragen von 2,45 (nicht-alkoholische Getränke) bis 10,2 ppm (Puddinge) (Burdock, 2004).

Der Europarat listete **2** 1974 mit einer duldbaren täglichen Aufnahmemenge (ADI) von 5 mg/kg KG (COE, 1974), wobei eine provisorische Höchstmenge von 30 ppm (4 ppm alkoholische Getränke) angeführt wird. Die FEMA gibt einen PADI von 1,614 mg für **2** an (Burdock, 2004).

In den USA hat **2** GRAS-Status (21 CFR §121.1164; *Code of Federal Regulations*).

### 3.11.3 Asarone

Der gezielte Zusatz von **4** zu Lebensmitteln ist in der EU verboten. Es gelten Höchstmengen für natürliche Gehalte von **4** von 0,1 mg/kg für *Acorus calamus*- oder *Asarum europæum*-haltige Lebensmittel und 1 mg/kg für alkoholische Getränke (COE 2005; 88/388/EEC, 1981; AromV, Art. 22, 1981; AromV; Verordnung (EG) Nr. 1334/2008). Die heutige Hauptexpositionsquelle für **4** stellen somit höchstwahrscheinlich mit *Acorus calamus* L. aromatisierte alkoholische Getränke dar. In seiner Evaluierung von **4** aus 2005 gibt der Europarat eine wahrscheinliche Aufnahme von 8,5–49 µg/d (0,12–0,7 µg/kg KG/d) an (COE, 2005).

Das *Joint Expert Committee on Food Additives* der WHO (JECFA) bewertete β-Asaron 1981, konnte keine duldbare tägliche Aufnahmemenge ableiten und empfahl die Aufnahmemenge so gering wie möglich zu halten. Zu diesem Ergebnis kam 2001 auch das *Scientific Committee on Food* (SCF) der EU. Aufgrund unzureichender Datenlage und des Verdachts auf einen gentoxischen Wirkmechanismus konnten keine Grenzwerte bestimmt werden, jedoch wurden die bestehenden Höchstmengeempfehlungen bestätigt (SCF, 2002). Als „*active principle*“ in *Acorus* ssp. und *Asarum* ssp. sieht das Komitee **4**, wobei eine Abschätzung der Zufuhr über die Nahrung bei maximal 100 µg pro Tag liegt.

Bis 1970 hatte  $\beta$ -asaronhaltiges Kalmusöl in den USA GRAS-Status. Seither ist der Gebrauch von Kalmus in jeglicher Zubereitung für den menschlichen Verzehr verboten (21 CFR §189.110, 1968; *Code of Federal Regulations*).

Teilweise hohe Gehalte, welche nicht in die Expositionsrechnungen einfließen, weisen natürliche pharmazeutische Erzeugnisse auf. Zuba und Byrska *et al.* (2012) untersuchten mehrere kalmushaltige Pflanzenpräparate und detektierten dabei Gehalte von bis zu 1526  $\mu\text{g}$  **4** und 51,4  $\mu\text{g}$  **3** pro Tablette bzw. Darreichungsform. Das *Committee on Herbal Medicinal Products* (HMPC) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) empfiehlt, die Gehalte von **3** und **4** in pflanzlichen Arzneimitteln so gering wie möglich zu halten und die diploiden Kalmusvarietäten stets zu bevorzugen. Temporär könne eine  $\beta$ -Asaron-Aufnahme von 115 mg/d ( $\approx 2$  mg/kg KG/d) akzeptiert werden (HMPC, 2005). Die in den Untersuchungen von van den Berg *et al.* (2011a, b) erhaltenen MOE-Werte für **4** beim Konsum kommerziell gehandelter, kalmushaltiger PFS nach Herstellerangaben, lagen im Bereich von 7000–60.

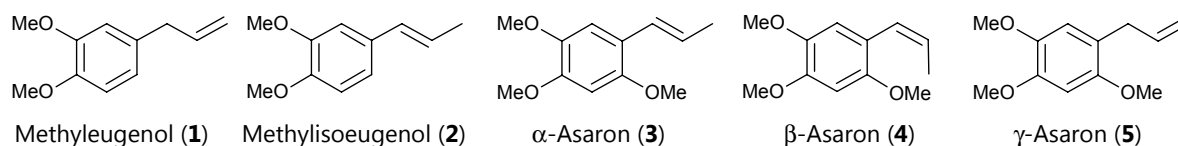
Zu  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) liegen keine Daten vor.

---

# 4

## Problemstellung

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**),  $\alpha$ - (**3**),  $\beta$ - (**4**), und  $\gamma$ -Asaron (**5**) sind natürliche Pflanzeninhaltsstoffe, die z. B. in Basilikum, Gewürznelke und Kalmus vorkommen und somit einen Bestandteil in der menschlichen Ernährung darstellen. Strukturell unterscheiden sich diese fünf Verbindungen zum einen in der Substitution des Benzenringes bzw. der ungesättigten Seitenkette (s. Abbildung).



Die Verbindungen **1** sowie **3** und **4** wirkten hepatokanzerogen im Tierversuch. Zu **2** liegen lediglich Daten zur subchronischen Toxizität und zu **5** keine Daten vor. Während es neben **1** weitere hepatokanzerogene Phenylpropene (PP) mit allylischer Seitenkette (Safrol und Estragol) gibt, stellen die Mehrzahl der PP mit propenylischer Seitenkette keine oder sehr schwache Hepatokanzerogene dar. Die propenylischen Verbindungen **3** und **4** sind insofern eine Ausnahme. Der molekulare Mechanismus, der zur Aktivierung der allylischen Verbindungen Safrol und Estragol führt, ist bekannt und erfolgt im Zuge des Fremdstoffmetabolismus durch die von Cytochrom P450-Enzymen (CYP) katalysierte Bildung eines 1'-Hydroxymetaboliten, welcher anschließend über Sulfotransferasen in 1'-Position sulfoniert wird. Der Sulfatester kann spontan anorganisches Sulfat abspalten und es resultiert ein reaktives, elektrophiles Carbokation, welches in der Lage ist, kovalent an nukleophile Zentren von Zellbestandteilen (z. B. DNA) zu binden, was in der Folge zu DNA-Addukten, Mutationen und schließlich zur Bildung von Tumoren führen kann. Ob auch **1** über diesen Mechanismus aktiviert wird, war zu Beginn der Arbeiten an der vorliegenden Dissertation nicht untersucht. Auch liegen bislang keine Untersuchungen zum Metabolismus der Asarone **3–5** vor.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den hepatischen Metabolismus der Verbindungen **1–5** zu untersuchen und dadurch Hinweise auf deren mögliche Mechanismen der Gentoxizität zu erhalten. Konkret sollte die Frage beantwortet werden, ob **1** über den gleichen Wirkmechanismus wie Safrol und Estragol aktiviert wird und ob andere Metaboliten gebildet werden, die potentiell adverse Effekte verursachen können. Weiterhin sollte untersucht werden, welcher Metabolit bzw. welche Metaboliten für die gentoxischen bzw. kanzerogenen Wirkungen der Verbindungen **3** und **4** verantwortlich sein können. Im Falle der Verbindungen **1** und **2** lag das besondere Interesse in der Untersuchung des hepatischen Stoffwechsels weiterhin darin, die Unterschiede zu identifizieren, die zu den unterschiedlichen toxikologischen Eigenschaften dieser beiden Verbindungen beitragen.

Um diese Ziele zu bewerkstelligen, sollten die Verbindungen **1–5** mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies inkubiert werden und die gebildeten Metaboliten mit Hilfe geeigneter flüssigchromatographischer und  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischer Methoden detektiert, charakterisiert, isoliert und identifiziert werden. Nach erfolgreicher Identifizierung der Metaboliten sollten diese synthetisiert werden und als Referenzverbindungen für deren Quantifizierung in mikrosomalen Inkubationen dienen. Im nächsten Schritt sollte die Metabolitenbildung zeitabhängig untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es, die Substanzen **1–5** über einen weiten Konzentrationsbereich mit verschiedenen Lebermikrosomen zu inkubieren, um enzymkinetische Parameter abzuleiten zu können. Anhand dieser quantitativen Daten ist es möglich, Aussagen über die Metabolitenbildung und -verteilung bei sehr kleinen Substratkonzentrationen, wie sie bei der humanen Ernährung wahrscheinlich sind, zu treffen. Die Untersuchungen von Lebermikrosomen verschiedener Spezies bzw. verschiedener Enzymstatus, sollten Hinweise zu speziesspezifischen Unterschieden liefern, z. B. in Hinblick auf die Frage, ob Daten aus Kanzerogenitätsstudien am Tier auf den Menschen übertragbar sind oder welchen Einfluss ein veränderter Enzymstatus auf den Phase-I-Metabolismus der Substanzen hat. Da der Phase-I-Metabolismus der Substanzen (wahrscheinlich) hauptsächlich auf CYPs zurückzuführen ist, war die Untersuchung der Beiträge wichtigster humaner CYPs zum humanen Metabolismus der Substanzen eine weitere Zielsetzung. Dies geschah in Hinblick auf bekannte Polymorphismen dieser Enzyme und verschiedene Enzymaktivitäten *in vivo*, welche z. B. durch Wechselwirkungen mit Arzneimitteln, Lebensmittelbestandteilen oder den Konsum von Genussmitteln bewirkt werden.

Abschließend sollten der Phase-I- und -II-Metabolismus von **1** als auch die DNA-Adduktbildung von **1** und **2** sowie deren Metaboliten primären Hepatozyten untersucht werden um die Frage zu klären, ob die mikrosomalen Phase-I-Metaboliten auch in metabolisch kompetenten Zellen gebildet werden und gentoxisch wirken können.



---

# 5

## Ergebnisse

### 5.1 Gliederung und Darstellung der Ergebnisse

Zu Beginn dieses Kapitels werden die bisher nicht veröffentlichten Metaboliten-Synthesen beschrieben und diskutiert (Kap. 5.2). Im Anschluss daran wird kurz auf die verwendeten flüssigchromatographischen analytischen Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten und Muttersubstanzen eingegangen (Kap. 5.3). Den Hauptteil dieses Kapitels stellen dann die Ergebnisse zum Metabolismus der fünf untersuchten Verbindungen (Kap 5.4.2–5.4.8) in der folgenden Reihenfolge dar:

Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**),  $\beta$ -Asaron (**4**),  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**)

Zu jeder untersuchten Substanz gibt es folgende Unterkapitel:

1. **Identifizierung** der gebildeten Metaboliten,
2. Untersuchung des **Zeitverlaufes** der Metabolitenbildung durch verschiedene **Lebermikrosomen**,
3. Metabolismus durch **Supersomes<sup>TM</sup>**,
4. Bestimmung **kinetischer Parameter** in **Lebermikrosomen**,
5. Bestimmung **kinetischer Parameter** in **Supersomes<sup>TM</sup>** und **Beteiligung der humanen CYPs** am Metabolismus durch HLM.

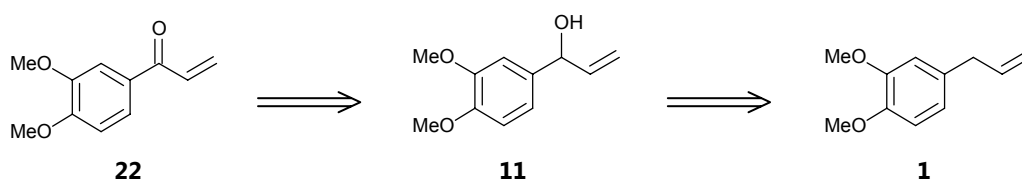
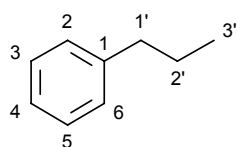
Um Wiederholungen zu vermeiden wurden die allgemeinen Aspekte zu diesen vier Punkten vor diesem eigentlichen Hauptteil beschrieben und diskutiert (Kap. 5.4.1).

Weiterhin sind im Ergebnisteil folgende Einzelkapitel enthalten:

- 5.4.2.6 Phase-II-Metabolismus** von Methyleugenol (**1**) in primären Rattenhepatozyten,
- 5.4.4 Ausmaß der DNA-Addukt-Bildung** in pRH durch Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und deren Metaboliten.

## Nomenklatur

Die verwendeten Bezeichnungen von Substanzen und Metaboliten entsprechen nicht der IUPAC-Nomenklatur, sondern sind an die Nummerierung des Grundgerüsts der Muttersubstanzen **1-5** angelehnt. Die IUPAC-Bezeichnungen sind im Kontext dieser Arbeit zu unübersichtlich, aber im Kapitel 7.6, Seite 272 ff. (Synthesen) jeweils rechts unter der Überschrift aufgeführt. Die Nummerierung der Verbindungen folgt entsprechend dem links abgebildeten Schema. Diese Wahl der Lokanten wird durchgehend für alle Metaboliten und der Konsistenz wegen auch für alle Synthesevor- und -zwischenstufen verwendet. So wird z. B. Trimethoxyiodbenzen **36** nicht mit 2,4,5-, sondern mit 3,4,6-Trimethoxy... nummeriert. Dies bietet mehrere Vorteile: Zum einem bleibt die Nummerierung des Aromaten stets gleich, was zum Beispiel den Vergleich von NMR-spektroskopischen Daten erleichtert. Zum anderen ist die Historie eines Metaboliten so aus dem Namen leichter ersichtlich. Beispielsweise ist sofort ersichtlich, dass es sich bei 1'-Oxomethyleugenol (**22**) um das oxidierte 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**), gebildet aus Methyleugenol (**1**), handelt:



Da selbst die Verwendung der z. T. sehr langen Trivialnamen bisweilen umständlich ist, wurden, um die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse weiter zu erleichtern, allen Substanzen Nummern zugewiesen. Diese sind für alle Substanzen, zusammen mit den Trivialnamen und der Retentionszeiten in Tabelle 1 (Seite X ff.) am Anfang dieser Arbeit zusammengefasst. Zusätzlich sind diese Angaben auf einem Beiblatt, welches dieser Arbeit beigelegt ist, zusammengefasst.

Weiterhin ist mit „**Propenyl**“-Seitenkette im Kontext dieser Arbeit immer eine Prop-1-en-, bzw. Prop-1'-en-Gruppe gemeint. Eine Prop-2-en- bzw. Prop-2'-en-Seitenkette wird unzweideutig als **Allyl**-Seitenkette bezeichnet.

Bei der Beschreibung detektierter Metaboliten bedeutet ein Pluszeichen, dass die Konzentration der Metaboliten als Summe bestimmt wurde (z. B. steht „**6+8**“ für die Summe von Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**)). Bei nicht eindeutig identifizierten bzw. zugeordneten Verbindungen markiert ein Schrägstrich, dass es sich um eine dieser Verbindungen oder deren Summe handelt (z. B. steht „**39a/40a**“ für **39a** und/oder **40a**).

---

## Anhang/Rohdaten

In dieser Arbeit werden Diagramme oder Tabellen gezeigt, die hauptsächlich aus den Daten von HPLC-UV-Chromatogrammen generiert wurden. Die Form des Diagrammes eignet sich für die Darstellung im Ergebnisteil besonders, da die resultierenden Aussagen schneller erfassbar sind, wenngleich sie weniger präzise sind als in numerischer tabellarischer Form. Die zu den Diagrammen gehörenden Tabellen sind unter Referenzierung der jeweiligen Abbildungsnummer, zusammen mit den Massen-, UV- und NMR-Spektren dem elektronischen Anhang (pdf) beigelegt. Zu jedem Diagramm(typ) wird jeweils ein beispielhaftes Chromatogramm im Ergebnisteil, die weiteren im Anhang abgebildet.

## 5.2 Synthesen

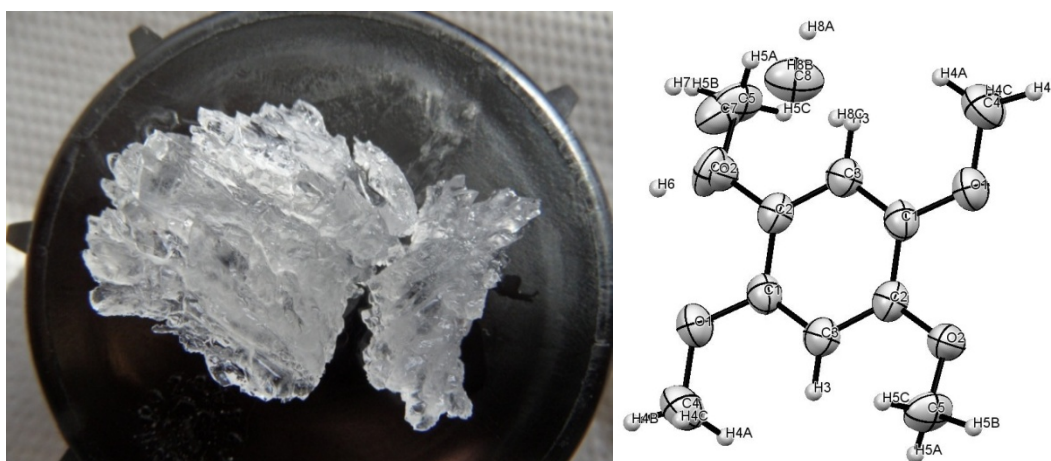
Die Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der nachfolgend aufgeführten Verbindungen erfolgte im Wesentlichen nach den Vorschriften, die bereits in der Diplomarbeit des Autors (Cartus, 2009) entwickelt wurden oder in den Publikationen Cartus *et al.* (2011, 2012) beschrieben sind: (*RS*)-1'-Hydroxymethyleugenol (**11**); (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**); 1'-Hydroxy-1',2'-dihydromethylisoeugenol-*meta*-chlorbenzoat (**13**); (*RS*)-2'-Methyleugenol-epoxid (**15**); 3,4-Dihydroxyeugenol (**16**); 3,4-Dimethoxypropylbenzen (**21**); 1'-Oxomethyleugenol (**22**); (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**); (*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäuremethylester (**25**); (*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäure (**26**) und (*RS*)-2',3'-Dihydroxymethyleugenol (**27**).

Die Synthese der Asaron-Diole **39**, **40** und **41** erfolgte durch Frau Dipl.-Chem. Nadine Simson im Rahmen ihres Forschungspraktikums (Simson, 2012). Die Syntheseplanung und Charakterisierung erfolgte durch den Autor dieser Arbeit. Viele Synthesen zu den genannten Verbindungen konnten in der Zwischenzeit in Hinblick auf Reinheit und Ausbeute verbessert werden. Jedoch wird hier nicht erneut auf Einzelheiten eingegangen. Im Folgenden wird lediglich auf bisher nicht veröffentlichte oder bedeutend verbesserte Darstellungen eingegangen.

### 5.2.1 Isolierung von $\beta$ -Asaron (**4**) aus Kalmusöl

Da  $\beta$ -Asaron (**4**) kommerziell lediglich als Mischung zusammen mit 30 %  $\alpha$ -Asaron (**3**) erhältlich ist (Aldrich Nr. 221074; ca. 40 €/g) und eine Auftrennung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asaron ( $\Delta t_R = 1,5$  min) im präparativen Maßstab unbefriedigende Ergebnisse lieferte, wurde nach einer alternativen Quelle hierfür gesucht. Eine Synthese kam zunächst nicht in Betracht. Da bekannt ist, dass das etherische Öl bestimmter Kalmus-Varietäten hohe Gehalte **4** enthält

(Stahl und Keller, 1981) wurde Kalmusöl (*Oleum calami rectificatum*) der indischen Varietät *Acorus calamus* L. für 0,20 €/ml im Naturwarenhandel beschafft. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war  $\beta$ -Asaron (**4**) mit 90 % der Hauptbestandteil dieses Kalmusöls. Daneben sind 6,3 %  $\alpha$ -Asaron (**3**) sowie nicht näher charakterisierte Komponenten (3,7 %) enthalten. Daraufhin wurde das Kalmusöl sowohl säulenchromatographisch, als auch mittels präparativer HPLC aufgereinigt, wobei sich erstere Methode bewährte. Aus den beiden reinsten Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung von 10 ml Kalmusöl ( $\rho = 1,06 \text{ g/ml}$ ) konnten 6,9 g (69 %; 33,1 mmol) analysenreines  $\beta$ -Asaron (**4**) in Form farbloser Kristalle (Abbildung 18) erhalten werden. Trotz des geringen Schmelzpunktes von ca. 16–18 °C, gelang es von den Kristallen eine Röntgenstruktur anzufertigen. Diese bestätigte die Identität der Verbindung, wobei eine statistische Fehlordnung der Propenylseitenkette und der Methoxyfunktion in Position 4 beobachtet wurde.

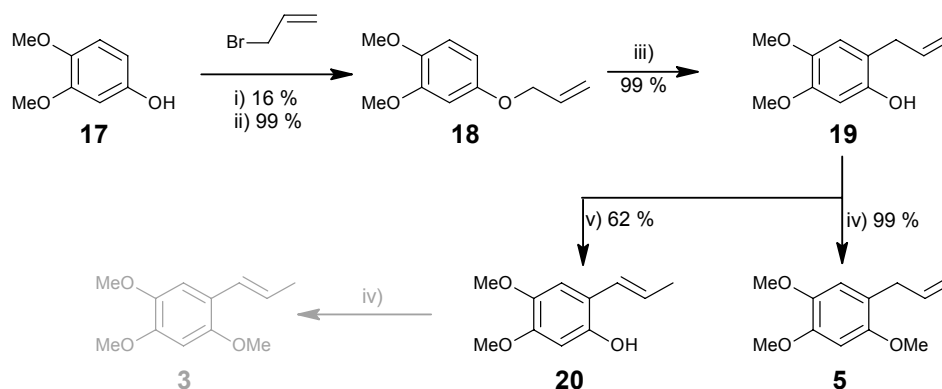


**Abbildung 18.** Links:  $\beta$ -Asaron-Kristalle (**4**). Rechts: Kristallstruktur von **4** (Bindungsverhältnisse s. Anhang).

### 5.2.2 Synthese von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**), 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) und $\gamma$ -Asaron (**5**)

Die Ausbeute von 1-Allyloxy-3,4-dimethoxybenzen (**18**), welches die Vorstufe für 6-Hydroxymethyleugenol (**19**),  $\gamma$ -Asaron (**5**) und 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) ist, war nach der bisherigen Synthesemethode (Cartus, 2009) mit 16 % (i) sehr gering. Deshalb wurde eine alternative Syntheseroute durchgeführt (ii): Hierzu wird die *O*-Allylierung von 3,4-Dimethoxyphenol (**17**) statt mit Natriumhydrid in THF bei 0 °C analog zu Benbow *et al.* (2001) mit Kaliumcarbonat als Base und katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) in Aceton unter Rückfluss durchgeführt (Abbildung 19). Somit konnte eine nahezu quantitative

Ausbeute und eine sehr gute Reinheit der Zwischenstufe **18** und der folgenden Produkte erzielt werden. Der Methyleugenol-Metabolit **19** ist gleichzeitig die Vorstufe für die Synthese von **5** und **20**. Somit konnte **5** ausgehend von **17** in drei Stufen synthetisiert werden. Durch O-Methylierung von **19** mit Dimethylsulfat entstand **5** in praktisch quantitativer Ausbeute und in einer Reinheit von über 99 %.



**Abbildung 19.** Darstellung von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**), 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) ausgehend von 3,4-Dimethoxyphenol (**17**). Reaktionsbedingungen: **i**) 1,4 eq. NaH, 1,07 eq. Allylbromid, THF, 0 °C, 12 h; **ii**) 2,0 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,5 eq. Allylbromid, 0,2 eq. TBAI, Aceton, reflux, 2 h; **iii**) Et<sub>2</sub>NPh, reflux, 2,5 h; **iv**) 2,7 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3,0 eq. (MeO)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, Aceton, reflux, 1 h; **v**) 12 eq. KOH, EtOH, reflux, 72 h.

Die Isomerisierung von **19** zu **20** verlief unter forcierten Reaktionsbedingungen (Abbildung 19) nahezu quantitativ (ca. 90 % Umsatz) zu Gunsten der energetisch favorisierten Propenylverbindung **20**. Da **19** und **20** wegen der nicht unterscheidbaren Retentionsfaktoren nicht mit klassischer Säulenchromatographie trennbar waren und auch eine Trennung mit Hilfe der präparativen HPLC wegen der wenig unterschiedlichen Retentionszeiten schwierig war, wurde **20** aus Ethylacetat/Pentan kristallisiert. So konnte **20** in einer Reinheit von 98,5 % und einer Ausbeute von 62 % in Form hellgelber Kristallnadeln isoliert werden. Wie Abbildung 19 illustriert, stünde mit **20** auch eine direkte Vorstufe für die Synthese von  $\alpha$ -Asaron (**3**) zur Verfügung. Weil  $\alpha$ -Asaron kommerziell in guter Qualität erhältlich war und die Synthese keine Kostenersparnis bedeutete, wurde diese Route zur Synthese von **3** nicht verfolgt, sondern das kommerzielle Produkt verwendet (Sigma-Aldrich Nr. 11107).

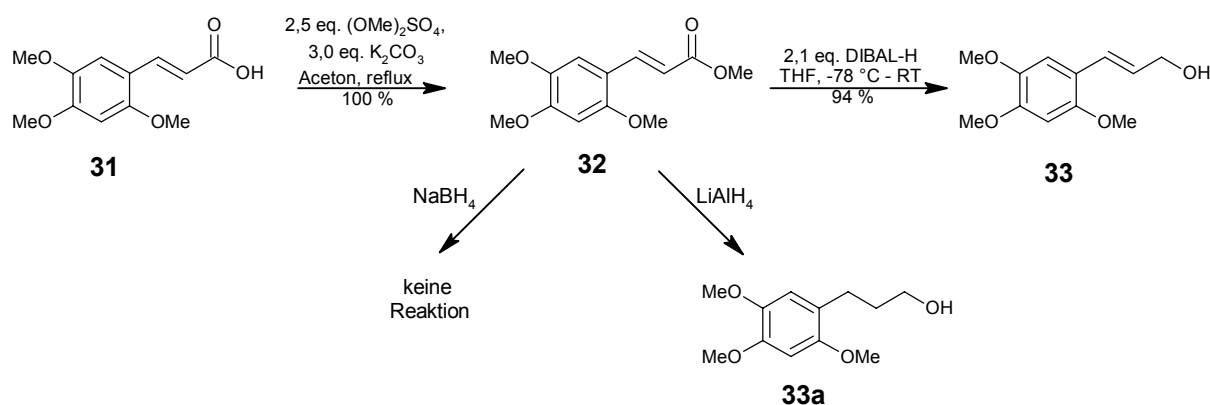
### 5.2.3 Synthese von 1'-Hydroxyasaron (**29**)

1'-Hydroxyasaron (**29**) konnte analog zur Synthese von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**, Cartus *et al.*, 2012) aber ausgehend von 3,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**28**) in einer Ausbeute von 90 % als farbloses Öl dargestellt werden.

## 5.2.4 Synthese von (*E*)- und (*Z*)-3'-Hydroxyasaron

### 5.2.4.1 Synthese von (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**)

(*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) konnte ausgehend von (*E*)-3,4,6-Trimethoxyzimtsäure in zwei Stufen dargestellt werden. Hierbei wurde die Säure **31** zunächst mit Dimethylsulfat in den Methylester überführt und anschließend mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) zum *trans*-Alkohol **33** reduziert (s. Abbildung 20).

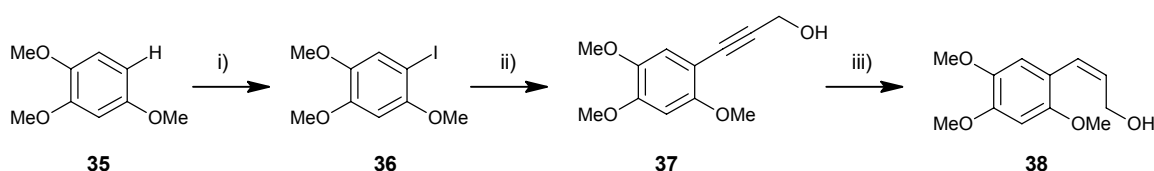


**Abbildung 20.** Darstellung von (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) ausgehend von (*E*)-3,4,6-Trimethoxyzimtsäure (**31**).

Prinzipiell ist die direkte Reduktion von **31** zu **33** mit DIBAL zwar auch möglich, erfordert aber drei Reduktionsäquivalente, also eines mehr als es beim Ester der Fall ist. Ferner sind die Ausbeuten bei Reduktion der Ester gewöhnlich höher als im Falle der Säuren (Miller *et al.*, 1959; Zakharkin und Khorlina, 1962; Ziegler *et al.*, 1964). Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung muss leicht basisch erfolgen, da bereits bei schwach saurem pH-Wert die Zersetzung des Produktes einsetzt. Die Reaktivität von DIBAL (in THF) liegt zwischen der von Natriumborhydrid (keine Reaktivität gegenüber Estern) und Lithiumaluminiumhydrid. Letzteres reduziert den Ester **32** zwar ebenfalls bis zum Alkohol, jedoch auch die Doppelbindung in Position 1' der Seitenkette, so dass **33a** entstand. Wegen der Säurelabilität des Produktes erwies sich die Aufarbeitung als schwierig. Unter neutralen bis leicht basischen Verhältnissen lässt sich das Ausfällen von Aluminiumsalzen nicht umgehen. Diese sind generell gelatinös und erschweren so die Phasentrennung. Gute Ergebnisse wurden erzielt, indem mit großen Volumina gearbeitet und das Gemisch während der Aufarbeitung kühl ( $T < 10^\circ\text{C}$ ) gehalten wurde. Filtrationsversuche über Celite waren nicht gewinnbringend. Das Rohprodukt wurde dann an Aluminiumoxid mit Dichlormethan/Methanol säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase führte wegen der angesprochenen Säurelabilität von **33** zur Zersetzung des Produktes.

### 5.2.4.2 Synthese von (Z)-3'-Hydroxyasaron (38)

Nach Kenntnis des Autors ist dies die erste Beschreibung einer Synthese von **38** und dessen Vorstufe **37** (Recherche Reaxys und SciFinder; Stand Februar 2014). Das Reaktionsschema der geplanten Synthese ist in Abbildung 21 dargestellt. Aus retrosynthetischer Sicht ist die Einführung der stereospezifischen Information in die Seitenkette, welche *cis* konfiguriert sein soll, der Schlüsselschritt für die Synthese von **38**. Die einfachste Methode, dies zu bewerkstelligen, ist die stereoselektive *cis*-Hydrierung einer Dreifachbindung mit Hilfe eines Lindlar-Katalysators. Da die Alkoholfunktion in Position 3' bei der Hydrierung nicht stört, stellt das Propinol **37** die geeignete Vorstufe dar. **37** ist ausgehend von 3,4,6-Trimethoxyiodbenzen (**36**) in einer Palladium- und Kupfer-katalysierten Sonogashira-Kreuzkupplung darstellbar. Iodbenzen **36** wiederum ist zugänglich ausgehend von 3,4,6-Trimethoxybenzen (**35**).



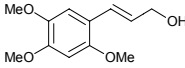
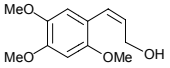




**Abbildung 21.** Darstellung von (Z)-3'-Hydroxyasaron (**38**) ausgehend von 3,4,6-Trimethoxybenzen (**35**). Reaktionsbedingungen: **i)** 1,1 eq. NIS; 0,3 eq. CF<sub>3</sub>COOH; MeCN, RT, 30 min; 89 %; **ii)** 1,2 eq. Propargylalkohol; 5 % Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 10 % CuI; NEt<sub>3</sub>; RT; 2 h; 92 %; **iii)** 10 Gew.-% Lindlar-Katalysator (5 % Pd auf CaCO<sub>3</sub>/3 % Pb); 18 Gew.-% 3,6-Dithiaoctan-1,8-diol (bezogen auf Katalysator); EtOH; RT, 2 d; 99 %.

Tatsächlich konnte **36** ausgehend von 3,4,6-Trimethoxybenzen (**35**) mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluoressigsäure als Katalysator regioselektiv in einer Ausbeute von 89 % dargestellt werden. Die anschließende Sonogashira-Kupplung mit Propargylalkohol und Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-dichlorid sowie Kupfer(I)-iodid als Katalysatoren gelang problemlos in einer Ausbeute von 92 %. Die stereoselektive *cis*-Hydrierung von **37** verlief nach zwei Tagen Reaktionsdauer praktisch quantitativ. Die Reaktionszeit könnte wahrscheinlich durch einen sparsameren Einsatz des verwendeten Katalysatorgiftes 3,6-Dithiaoctan-1,8-diol verkürzt werden. Über drei Reaktionsstufen konnte **38** somit in einer Gesamtausbeute von 81 % ausgehend von 3,4,6-Trimethoxybenzen (**35**) dargestellt werden.

### 5.2.4.3 Bestätigung der *E*- und *Z*-Konfiguration von **33** und **38**

In Tabelle 14 (S. 80) sind die gemessenen und berechneten Werte der Kopplungskonstanten sowie der chemischen Verschiebungen der Protonen in Position 1' und 2' von (*E*)-3'-OH-Asaron (**33**) und (*Z*)-3'-OH-Asaron (**38**) zusammengefasst.

**Tabelle 14.** Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen der Protonen in Position 1' und 2' von (*E*)-3'-OH-Asaron (**33**) und (*Z*)-3'-OH-Asaron (**38**).

Verbindung		( <i>E</i> )-3'-OH-Asaron ( <b>33</b> )	( <i>Z</i> )-3'-OH-Asaron ( <b>38</b> )
<b>Struktur</b>			
<b>Signalform der 2'-Protonen</b>	ber.		
	gem.		
$^3J_{H1',H2'}$ [Hz]	gem.	16,0	11,7
$\delta_{H1'}$ [ppm]	ber.	6,92	6,88
	gem.	6,70	6,44
$\delta_{H2'}$ [ppm]	ber.	6,08	5,98
	gem.	6,21	5,65

ber.: berechnet mit ChemDraw 10.0

gem.: gemessen; **33**,  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum PAC100; **38**,  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum PAC99

Anhand der Kopplungskonstanten kann unterschieden werden, ob die Verbindungen in *trans*- (**33**) bzw. *cis*-Konfiguration (**38**) vorliegen. Für olefinische Protonen sind  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 14–19 Hz für *trans*-konfigurierte, und 7–12 Hz für *cis*-ständige Protonen in der Literatur angegeben (Karplus-Beziehung; Hesse *et al.*, 2002). Somit ist gezeigt, dass bei **33** eine *trans*-Stellung der Seitenkette mit einer Kopplungskonstante von 16,0 Hz vorliegt und bei **38** eine *cis*-Stellung mit  $^3J_{H1',H2'} = 11,7$  Hz. Die chemischen Verschiebungen dieser Protonen untermauern diesen Befund weiter. Abbildung 78 (Seite 165) zeigt Ausschnitte der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **33** und **38**. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signale von **38** stimmen mit denen in der Literatur berichteten überein (Kim *et al.*, 2012; **38** wurde dort als Bestandteil des ätherischen Öls von *Acorus gramineus* SOL. identifiziert).

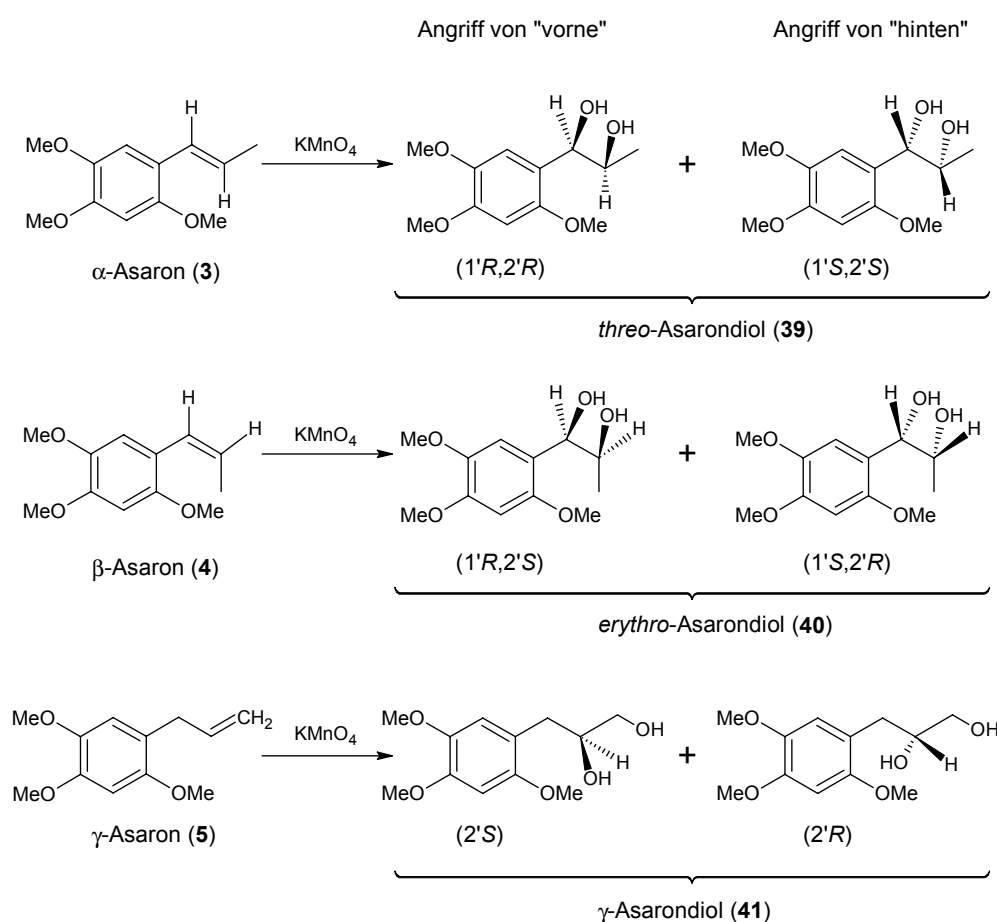
### 5.2.5 Synthese von 1'-Oxoasaron (30) und (*E*)-3'-Oxoasaron (34)

Die Oxidation der Alkohole **29** und **33** gelang analog zu den Reaktionen der Methyl- und Methylisoeugenolderivate **22** und **23** durch Oxidation mit großem Überschuss Mangandioxid ( $\text{MnO}_2$ ) in Dichlormethan. Die Ausbeuten betragen 66 % für **29** bzw. 58 % für **33**, und konnten trotz verlängerter Reaktionsdauer und erhöhter Menge an Oxidationsmittel nicht weiter zu Gunsten des gewünschten Produktes gesteigert werden. Die Doppelbindung in **34** kann *cis*- oder *trans*-konfiguriert vorliegen. Da das Edukt (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) als reines *trans*-Isomer eingesetzt wurde, war zu erwarten, dass auch das Reaktionsprodukt in dieser Konfiguration vorliegen wird. Anhand der vicinalen olefinischen Kopplungskonstante von  $^3J_{H1',H2'} = 15,8$  Hz sieht man, dass **34** *E*-konfiguriert vorliegt.



## 5.2.6 Synthese von Asaron-Diolen

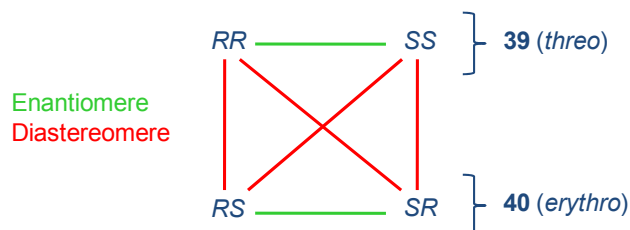
Die Synthese der Asaron-Diole **39**, **40** und **41** gelang durch Oxidation der Asarone **3–5** mit Kaliumpermanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) in neutraler wässrig/ethanolischer Lösung. Diese Reaktion verläuft selektiv *syn*, was bedeutet, dass beide in das Molekül eingeführte Sauerstoffatome auf der gleichen Seite stehen. Hierdurch entstehen z. B. bei zyklischen Alkenen stereoselektiv vicinale *cis*-Dihydrodirole. Im Falle aliphatischer Alkene bestimmt die Konfiguration der Doppelbindung, welche Stereoisomere gebildet werden. Beim *cis*-konfigurierten  $\beta$ -Asaron (**4**) wurden als Produkte der *syn*-Dihydroxylierung mit Kaliumpermanganat die beiden *erythro*-Enantiomere **40** (s. Abbildung 22) gebildet, welche (1'S,2'R)- bzw. (1'R,2'S)-konfiguriert waren.



**Abbildung 22.** Darstellung der Asaron-Diole **39**, **40** und **41** und deren Stereochemie. Die Richtungsangaben „vorne“ und „hinten“ beziehen sich auf die Papierebene. Reaktionsbedingungen: 0,7 eq.  $\text{KMnO}_4$ ; EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  2:1; 0 °C; 3 min; Ausbeute 3–39 %.

Das *trans*-konfigurierte  $\alpha$ -Asaron (**3**) lieferte analog das *threo*-Enantiomerenpaar **39** mit (1'S,2'S)- und (1'R,2'R)-Konfiguration. Die 1',2'-Protonen der Diastereomere sind magnetisch nicht äquivalent und folglich chromatographisch und NMR-spektroskopisch unterscheidbar, während die einzelnen Enantiomere magnetisch äquivalent und chromatographisch (bei Verwendung achiraler Phasen) ununterscheidbar sind, was Abbildung 23 illustriert. Die NMR-

spektroskopischen Daten der beiden Diastereomerenpaare stimmen mit den in der Literatur publizierten Werte überein (Freire *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011; Green und October, 2011; Hu und Feng, 2000; Lander und Schreier, 1991; Koul *et al.*, 1993).



**Abbildung 23.** Stereochemische Verhältnisse der vier Asarondiolenomere **39** und **40** zueinander.

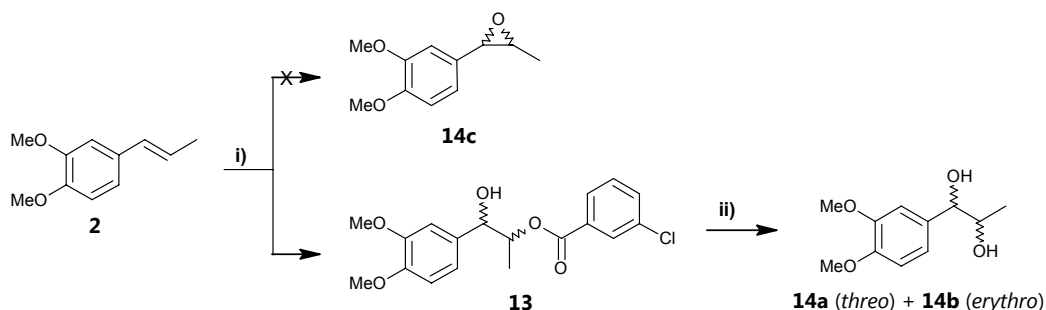
Das Oxidationsprodukt **41** der Reaktion von Kaliumpermanganat mit  $\gamma$ -Asaron (**5**) besitzt nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom, daher können lediglich zwei Enantiomere entstehen, welche chromatographisch (bei Verwendung achiraler Phasen) und magnetisch äquivalent sind (vgl. Abbildung 22 unten). Die Ausbeuten dieser Reaktion waren mit 17 % (**39**), 3 % (**40**) und 39 % (**41**) gering. Prinzipiell würde die Reaktion bei katalytischer Verwendung von Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) wahrscheinlich höhere Ausbeuten erzielen, weil beispielsweise eine Weiteroxidation (zu den entsprechenden Carbonsäuren), die bei Verwendung von  $\text{KMnO}_4$  selbst bei unterstöchiometrischem Verhältnis stattfindet, im Allgemeinen unterbleibt. Allerdings wurden die schlechteren Ausbeuten bei Verwendung von  $\text{KMnO}_4$  wegen der preisgünstigen und reichlich vorhandenen Edukte und nicht zuletzt wegen der hohen Toxizität von  $\text{OsO}_4$  in Kauf genommen.

Auch wenn **39** synthetisch ausgehend von  $\alpha$ -Asaron (**3**) und **40** ausgehend von  $\beta$ -Asaron (**4**) zugänglich war, ist zu beachten, dass CYP- bzw. CYP- und EH-katalysierte „netto-Dihydroxylierungen“ sowohl von **3**, als auch von **4** jeweils zu beiden Produkten (**39** und **40**) führen.

### 5.2.7 Synthese von 1',2'-Dihydrodihydroxymethylisoeugenol (**14**)

Die gleichen stereochemischen Überlegungen wie für die Diole aus propenylischen Asaronen, also **3** und **4**, betreffen auch die Synthese von **14**. Bei dessen Synthese (Cartus, 2009) wurde von Methylisoeugenol ausgegangen und dieses mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) umgesetzt. Das gewünschte Epoxid **14c** konnte nicht isoliert werden, jedoch der *m*-CPBA-Ester **13**, welcher dann basisch zum Diol hydrolysiert wurde (Abbildung 24). Bereits die Veresterung verlief nicht strikt stereoselektiv. Obwohl das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Methylisoeugenol (**2**; DAC02) zeigte, dass dieses nur etwa zu 1,2 % *cis*-konfiguriert vorlag, wurden 11 % desjenigen Enantiomerenpaares gebildet, welches der Theorie nach aus *cis*-**2** gebildet

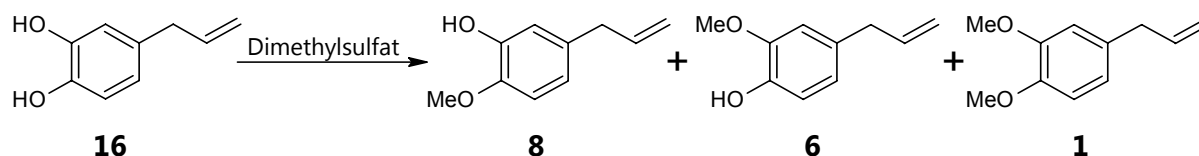
wird. Die anschließende Verseifung änderte dieses Verhältnis nicht mehr, so dass 10 % des *erythro*-Enantiomerenpaares (1'*R*,2'*S*)-**14a** und (1'*S*,2'*R*)-**14a** sowie 90 % des *threo*-Enantiomerenpaares (1'*R*,2'*R*)-**14b** und (1'*S*,2'*S*)-**14b** erhalten wurden. Das angefertigte HPLC-UV-Chromatogramm bestätigte diese Verteilung der beiden Diastereomere.



**Abbildung 24.** Syntheseweg zur Darstellung von 1',2'-Dihydroxymethylisoeugenol (**14**).  
Reaktionsbedingungen: **i)** 1,05 eq. *m*-CPBA; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/aq. NaHCO<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl (1,5:1:1); RT; 2 h; 98 %;  
**ii)** 7,5 eq. NaOH; MeOH; reflux; 1 h; 91 % (9:1 *threo*:*erythro*).

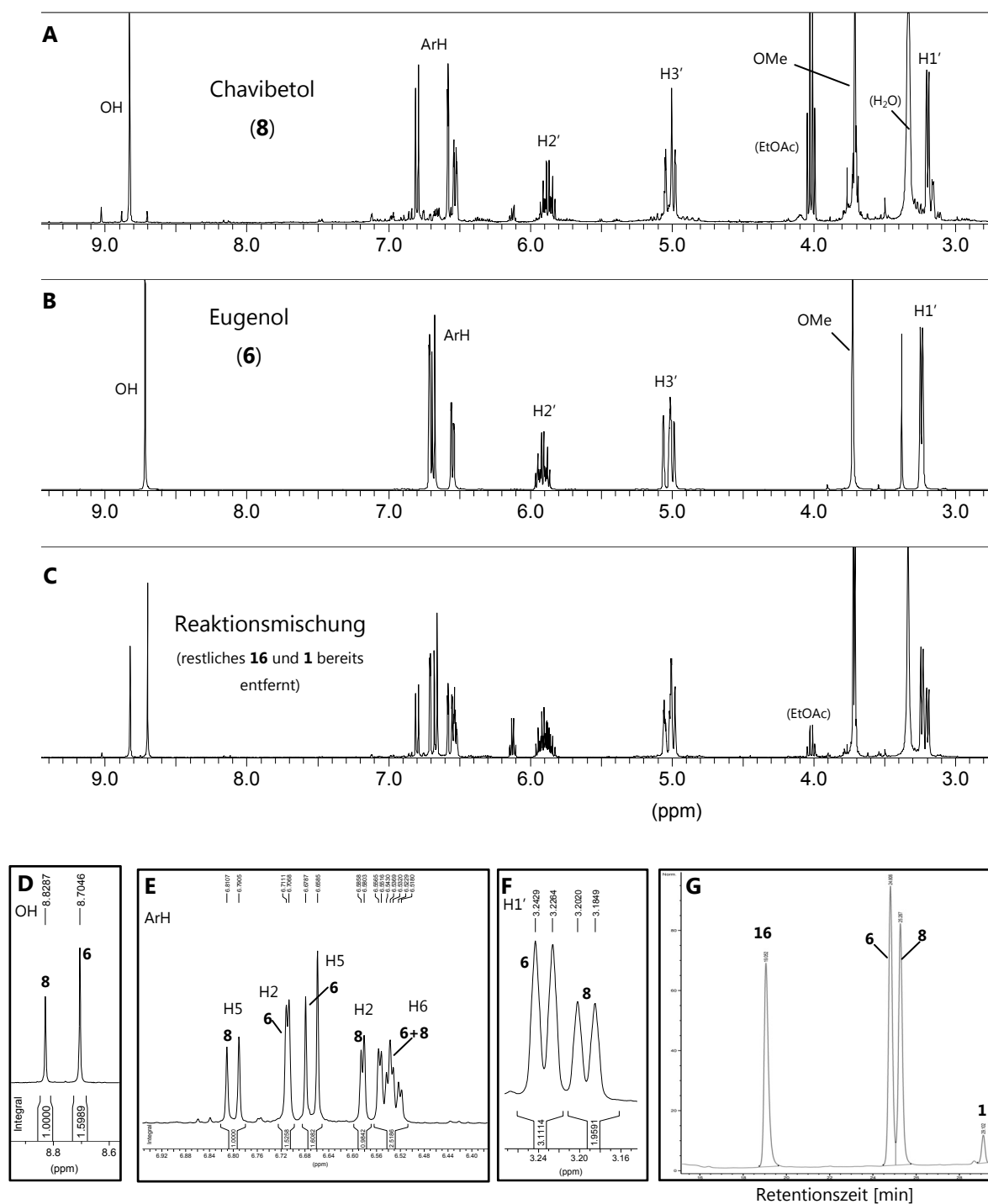
### 5.2.8 Synthese und Isolierung von Chavibetol (**8**)

Die Synthese bzw. die Isolierung von Chavibetol (**8**) konnte im Vergleich zur Methode von Cartus (2009) verbessert werden. Da keine sinnvolle gezielte Syntheseroute bekannt ist, wurde 3,4-Dihydroxyeugenol (**16**) mit 0,6 eq. Dimethylsulfat unselektiv methyliert. Hierbei wurde ein Gemisch, bestehend aus ca. 40 % Eugenol (**6**), 35 % Chavibetol (**8**), 15 % Methyleugenol (**1**) neben 10 % nicht umgesetzten Edukts **16**, erhalten.



**Abbildung 25.** Unselektive Methylierung von 3,4-Dihydroxyeugenol (**16**) zur Darstellung von Chavibetol (**8**).  
Reaktionsbedingungen: 2,6 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,6 eq. (MeO)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>; Aceton; reflux; 2 h.

Die Abtrennung von **8** aus dem Reaktionsgemisch gelang mittels präparativer HPLC, so dass insgesamt 50 mg **8** in einer Reinheit von  $\geq 85\%$  erhalten werden konnten. Anschließend erfolgte eine vollständige Charakterisierung der Verbindung, so dass ein Vergleich mit dem isomeren Eugenol (**6**) durchgeführt werden konnte (vgl. Kap. 7.6.4). Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **6** und **8** und das HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches sind in Abbildung 26 dargestellt.

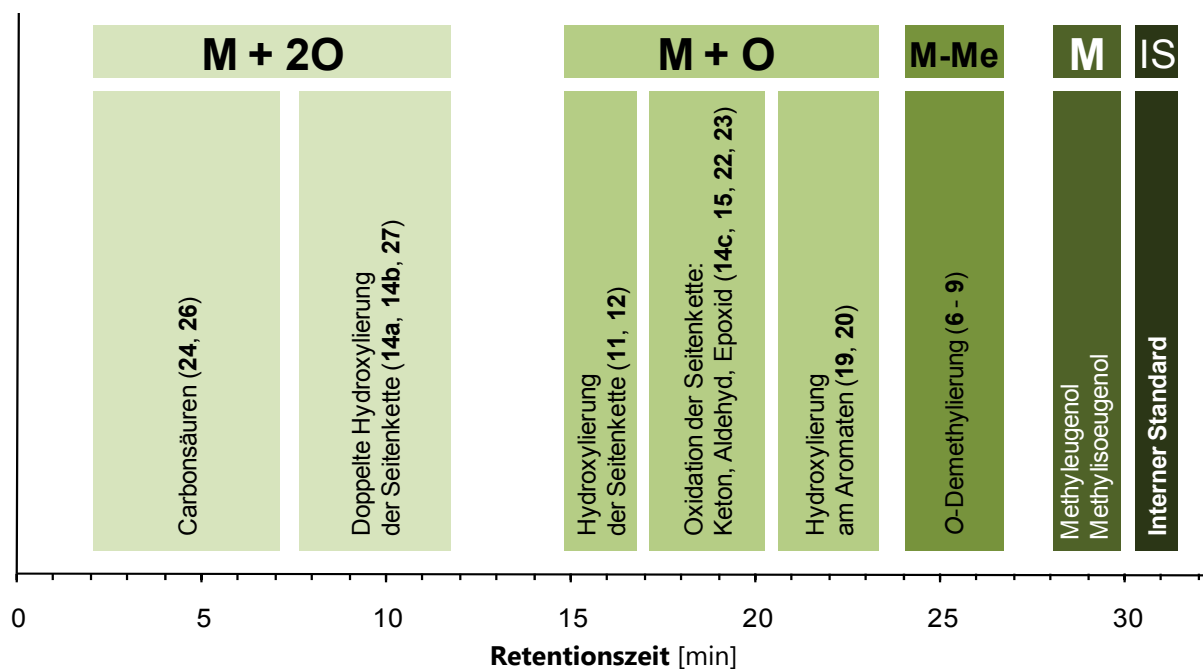


**Abbildung 26.** Synthese von Chavibetol (8):  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrn (Ausschnitt zwischen  $\delta = 2,8\text{--}9,5$  ppm) von synthetisiertem 8 (A) und kommerziellem Eugenol (6; B) sowie der Reaktionsmischung (C). Detailansichten der Protonen, die eine Unterscheidung zwischen 6 und 8 ermöglichen (D-F) und HPLC-Chromatogramm der Reaktionsmischung bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 280$  nm (G). 1: Methyleugenol; 16: 3,4-Dihydroxyeugenol.

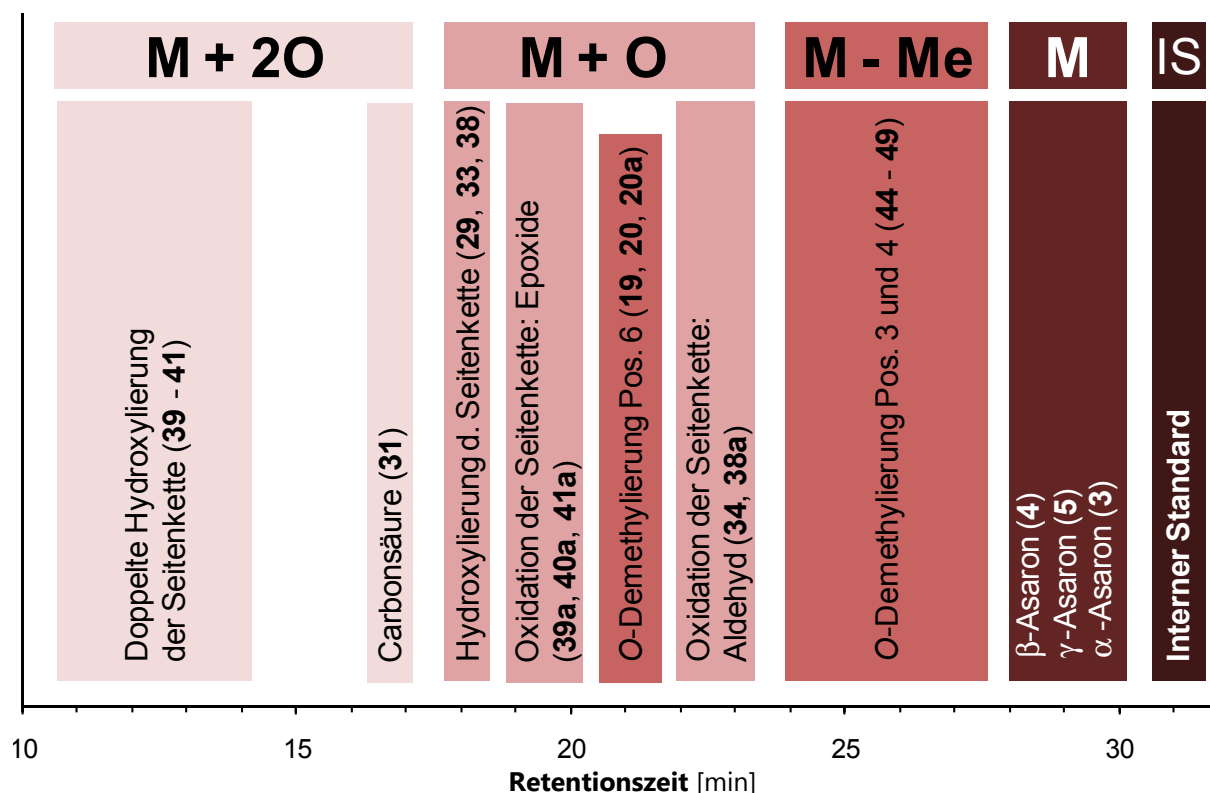
## 5.3 HPLC-UV-Analytik und LC-MS/MS

### 5.3.1 HPLC

Die Optimierung der Bedingungen der analytischen HPLC erfolgte bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Cartus, 2009) für Methyleugenol (**1**) und Methylisoeugenol (**2**). Diese Methode konnte ohne wesentliche Änderung auf die zu untersuchenden Asarone übertragen werden und wurde auch für LC-MS/MS-Messungen nicht bedeutend verändert. Somit wurden alle in dieser Arbeit gezeigten Chromatogramme unter vergleichbaren Bedingungen gemessen. Als Detektor diente ein Diodenarraydetektor (DAD) im UV/Vis-Bereich ( $\lambda = 190\text{--}800\text{ nm}$ ). Die Bedingungen für präparative HPLC-Trennungen wurden hingegen für jedes Trennproblem durch entsprechende Testsubstanzgemische neu optimiert. Die Retentionszeiten der Verbindungen sind keine Konstanten, sondern durchschnittliche Werte und variieren in Korrelation zum Alterungszustand von Vor- und Trennsäule und anderer Faktoren um bis zu  $\Delta t_R = 0,6\text{ min}$ . Als Bezugspunkt für die Retentionszeit und als Referenz für die Quantifizierungen wurde daher 3,4-Dimethoxypropylbenzen (**21**) als interner Standard (IS) synthetisiert, welches zwischen  $t_R = 31\text{--}32\text{ min}$  eluierte und somit später als alle Metaboliten und die Testsubstanzen **1–5**. Die Abbildungen 27 und 28 verdeutlichen in welchen Retentionsbereichen die Muttersubstanzen und deren Metaboliten jeweils in den UV-Chromatogrammen eluieren.



**Abbildung 27.** Elutionsbereiche von Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) sowie deren Metaboliten in den HPLC-UV-Chromatogrammen unter Verwendung des Wasser/MeOH-Gradienten. M = Muttersubstanz



**Abbildung 28.** Elutionsbereiche von  $\alpha$ -Asaron (3),  $\beta$ -Asaron (4) und  $\gamma$ -Asaron (5) sowie deren Metaboliten in den HPLC-UV-Chromatogrammen unter Verwendung des Wasser/MeOH-Gradienten. M = Muttersubstanz.

Als wichtigste Detektionswellenlängen dienen  $\lambda = 230$ , 261 und 280 nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm) sowie  $\lambda = 340$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm). Bei  $\lambda = 230$  nm absorbieren nahezu alle UV-aktiven Substanzen relativ stark, daher wurde diese Wellenlänge als unselektive aber sensitive Wellenlänge für die meisten Quantifizierungen herangezogen.  $\lambda = 261$  nm ist charakteristisch für Propenylverbindung, während im Bereich von  $\lambda = 280$  nm sowohl allylische, als auch Phenylpropanoide mit gesättigter Seitenkette ein Absorptionsmaximum aufweisen. Carbonylverbindungen mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigter Seitenkette (z. B. **22**, **23**, **26**, **34**) weisen starke Absorptionsbanden im Bereich von  $\lambda = 320$ – $360$  nm auf, weshalb die Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm nicht nur sensitiv, sondern auch selektiv für diese Verbindungen ist. In Chromatogrammen, die bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 280$  nm und einer Referenzwellenlänge von 360 nm wiedergegeben werden, erzeugen diese Verbindungen ferner Signale (Peaks) mit negativer Absorption, was zur Charakterisierung dieser Verbindungen ausgenutzt wurde. Alle Einstellungen und die verwendeten Messgeräte sind in Kap. 7.5 angegeben.

---

### 5.3.2 Quantifizierung der Substanzen

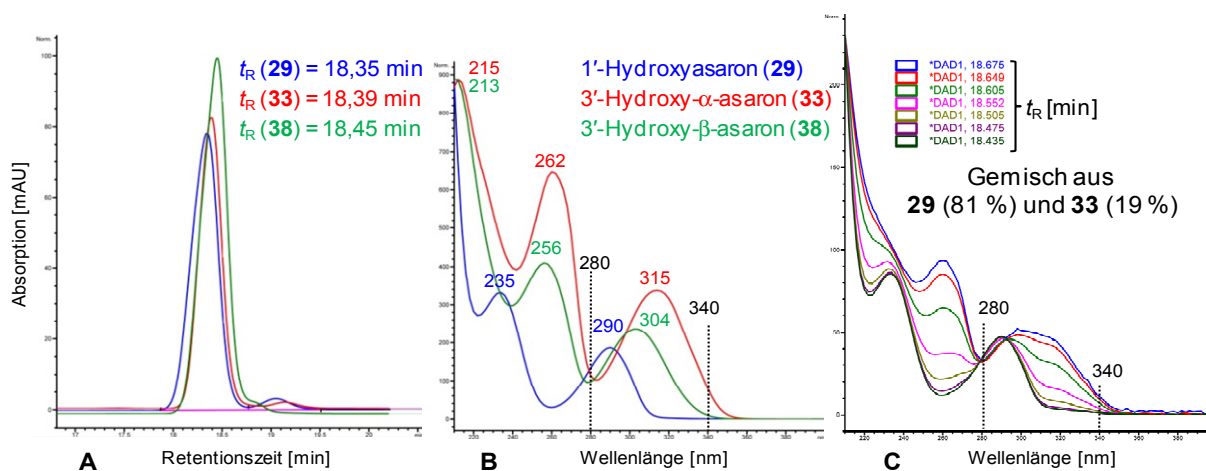
Da die zu untersuchenden Stoffe (Muttersubstanzen und wahrscheinlich alle Metaboliten) UV-aktiv sind und zumindest die Muttersubstanzen **1–5** durch LC-massenspektrometrische Verfahren sowohl im negativen, als auch positiven Messmodus sehr schlecht ionisierbar sind (ESI, APCI), wurde eine HPLC-UV-Methode zur Quantifizierung bevorzugt. Bei guter Ionisierbarkeit der Analyten erreicht eine massenspektrometrische Quantifizierung i. d. R. um Größenordnungen bessere Empfindlichkeiten. Jedoch sind die Sensitivitäten, die bei der entwickelten HPLC-UV-Methode erreicht wurden, für die in dieser Arbeit angestrebten Untersuchungen ausreichend. Zudem birgt die UV-Methode den Vorteil, dass unter bestimmten Bedingungen auch Signale koeluiender isobarer Verbindungen aufgelöst werden konnten und somit deren Komponenten quantifizierbar sind, was bei einer massenspektrometrischen Methode (wenn die gleichen Fragmente gebildet werden) nicht möglich ist. Grundlage dieser Quantifizierungsmethode ist die Annahme, dass die gleiche Menge (oder bei gleichem Injektionsvolumen die gleiche Konzentration) einer Verbindung in der HPLC-Analyse stets einen Peak der gleichen Fläche bzw. Höhe erzeugt. Dies ist nur dann reproduzierbar der Fall, wenn die chromatographischen Bedingungen möglichst konstant sind. Hierzu zählen u.a. die HPLC-Anlage selbst, die verwendete Säule, Vorsäule, Qualität des Lösungsmittels, Temperatur, pH-Wert, Flussrate, Gradientensystem und Injektionsvolumen.

Die zu quantifizierenden Substanzen, für die Referenzsubstanzen zur Verfügung standen oder synthetisiert werden konnten, wurden chromatographisch in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Durch Auftragen der von einer Substanz erzeugten Peakfläche bei gegebener Wellenlänge ( $A_\lambda$ ) gegen die injizierte Menge bzw. Konzentration erhält man als Steigung einen Absorptionsfaktor, mit welchem sich die unbekannte Konzentration einer Verbindung, beispielsweise eines Metaboliten in einer Inkubationslösung, bestimmen lässt. Da die chromatographischen Bedingungen tatsächlich nicht konstant sind, da z. B. die Chromatographiesäulen eine endliche Brauchbarkeitsdauer besitzen und sich deren chromatographische Eigenschaften mit der Zeit verändern, wurden die Absorptionsfaktoren gegen die erzeugte  $A_\lambda$  bei bekannter Konzentration des internen Standards (**21**) berechnet. Weitere Korrekturfaktoren mussten ggf. bei verschiedenen Verdünnungen (s. Kap. 7.2.3 und 7.5.5) oder Injektionsvolumina berücksichtigt werden. Die relative Genauigkeit dieser Vorgehensweise war mit Bestimmtheitsmaßen der Kalibriergeraden von  $R^2 > 0,99$  stets sehr gut. Allerdings hat die Methode, wie andere Arten der Quantifizierung auch, folgende Nachteile: Zum einen ist die Quantifizierung nur für identifizierte Metaboliten, die als synthetisch hergestellte Reinsubstanz zur Verfügung stehen, exakt möglich. Zum anderen ist die absolute Genauigkeit der Ergebnisse begrenzt durch die Reinheit der synthetisierten Verbindung sowie

die Einwaage- und Pipettiergenauigkeit bei der Herstellung der Kalibrier-Stammlösungen. Absorptionsfaktoren unbekannter Substanzen bzw. von Substanzen, für die keine Referenz zur Verfügung steht, können nur durch Inspektion derer UV-Spektren und Vergleich mit Absorptionsfaktoren strukturell ähnlicher Verbindungen abgeschätzt werden.

### Koeluirernde Verbindungen

Einen Sonderfall stellen die Seitenkettenalkohole 1'-Hydroxyasaron (**29**), (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) und (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (**38**) der drei Asaron-Isomere dar. Unerwarteterweise koeluirer alle drei Verbindungen bei einer Retentionszeit von  $t_R = 18\text{--}19$  min (Abbildung 29A) und bilden bei gleichzeitiger Injektion einen einzelnen, scharf begrenzten Peak. Die Quantifizierung der binären Gemische aus **29** und **33** bzw. **29** und **38** konnte trotz Koelution bewerkstelligt werden. Wie in Abbildung 29B, C zu erkennen ist, bilden beliebige binäre Gemische von **29** und **33** bei  $\lambda = 280$  nm und binäre Gemische von **29** mit **38** bei  $\lambda = 277$  nm einen isosbestischen Punkt. Dies ist eine Wellenlänge, bei der sich die Absorption überlagerter UV-Spektren mit beliebiger Zusammensetzung der Komponenten aber konstanter Gesamtkonzentration in einem Knotenpunkt kreuzen, die molaren Absorptionskoeffizient also gleich sind. Ferner absorbiert das allylische **29** bei  $\lambda = 340$  nm nicht, während **33** hier mäßig und **38** schwach absorbiert.

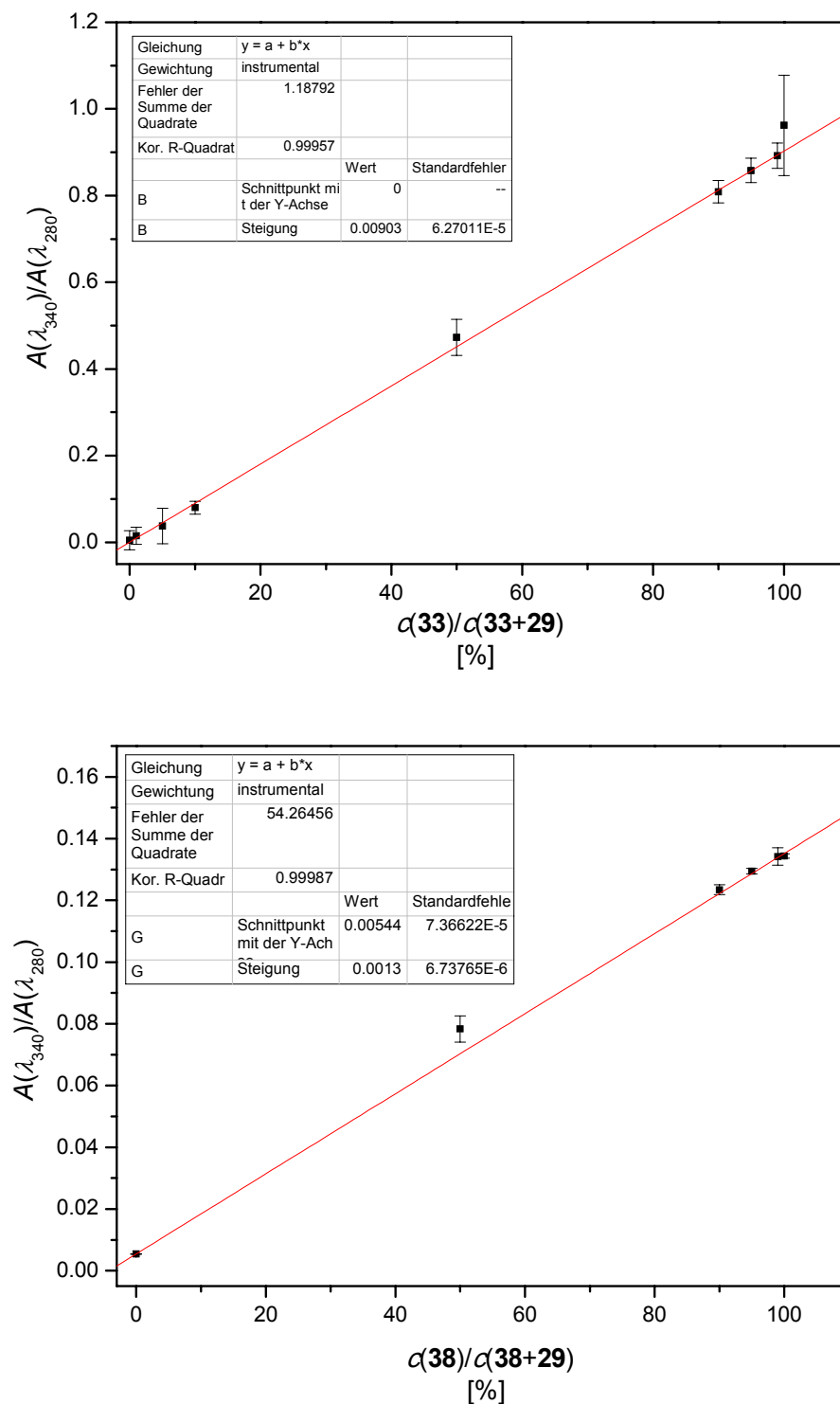


**Abbildung 29.** **A:** HPLC-Chromatogramme von **29**, **33** und **38** und deren Retentionszeit (je  $200 \mu\text{M}$ ,  $\lambda = 280$  nm). **B:** UV-Spektren der Referenzsubstanzen **29**, **33** und **38** (jeweils  $c = 200 \mu\text{M}$ ) sowie deren Absorptionsmaxima und **C:** zeitaufgelöste UV-Spektren der koeluirernden Verbindungen **29** und **33** aus der Inkubation von  $\gamma$ -Asaron (**5**;  $800 \mu\text{M}$ ; 20 min) mit HLM.

Durch Vergleich der Absorption am isosbestischen Punkt und bei  $\lambda = 340$  nm, sollte also die Quantifizierung der koeluirernden Verbindungen möglichen sein. Um dies zu überprüfen wurden Kalibrierlösungen mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen von **29** und **33** bzw. **29**



und **38** vermessen. Es wurden die Peakflächen  $A(\lambda)$  bei  $\lambda = 340$  nm und bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt und deren Verhältnis gegen den prozentualen Anteil von **33** bzw. **38** in der Mischung von **29** und **33** bzw. **29** und **38** aufgetragen (Abbildung 30).



**Abbildung 30.** Kalibriergeraden zur Bestimmung der Verhältnisse von **29** zu **33** (oben) bzw. **29** zu **38** (unten) in binären Gemischen. Die Messwerte sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Messreihen.

Nach Bestimmung des Verhältnisses der Peakflächen  $A(340\text{ nm})$  und  $A(280\text{ nm})$  eines Gemisches unbekannter Zusammensetzung kann durch lineare Kurvenanpassung der prozentuale Anteil der Verbindungen  $\%(\mathbf{a})$  und  $\%(\mathbf{b})$  in einem binären Gemisch (Peak zweier koluierenden Verbindungen) bestimmt werden. Mit Kenntnis der Absorptionsfaktoren  $\varepsilon_\lambda$  bei gegebener sensitivster Wellenlänge (hier  $\lambda = 230\text{ nm}$ ) in der Dimension  $c/A$  [ $\mu\text{M}/\text{mAU}$ s] (gemessen in Kalibrierreihen mit den Einzelsubstanzen) und der Gesamtpeakfläche bei dieser Wellenlänge  $A(230\text{ nm})$ , kann die Gesamtkonzentrationen des binären Gemisches  $c_{\text{ges}}$  über

$$c_{\text{ges}} = A(230\text{ nm}) \cdot [\{\%(\mathbf{a}) \cdot \varepsilon_\lambda(\mathbf{a})\} + \{\%(\mathbf{b}) \cdot \varepsilon_\lambda(\mathbf{b})\}]$$

berechnet werden. Die Konzentrationen von  $\mathbf{a}$  und  $\mathbf{b}$  ergeben sich dann durch Multiplikation von  $c_{\text{ges}}$  mit dem prozentualen Anteil der jeweiligen Komponente.

Die Methode funktionierte reproduzierbar für binäre Gemische aus 1'-Hydroxyasaron (**29**) und (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**), wie sie bei Inkubationen von Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup> mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) gebildet werden können. Während bei Inkubation von **3** mit Lebermikrosomen (LM) fast reines **33** detektiert wurde (93–100 %), wurden bei den Inkubationen von **5** mit LM im Schnitt Werte zwischen 15–30 % für **33** (= 85–70 % für **29**) gemessen und berechnet.

Für das Stoffgemisch des Peaks im Bereich von  $t_R \approx 18,5\text{ min}$  bei Inkubationen von Lebermikrosomen oder Supersomes<sup>TM</sup> mit  $\beta$ -Asaron (**4**) versagt diese Quantifizierungsmethode jedoch. Der Grund ist, dass hier weder reines (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (**38**), noch ein binäres Gemisch von **38** und **29** vorliegt, sondern ein ternäres Gemisch bestehend aus **29**, **38** und **33**, was <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch gezeigt werden konnte und in Kap. 5.4.6.1 ausführlich dargestellt wird. Da keine Wellenlängen existieren die selektiv für **33** und **38** bzw. **33**, **38** und **29** sind, kann eine Quantifizierung dieser Anteile nicht durchgeführt werden. Anhand der Integrale des angefertigten <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (vgl. Kap. 5.4.6.1) aus der Inkubation von **4** mit ARLM konnten folgende Anteile bestimmt werden: Hauptkomponente stellte mit 70 % (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (**38**) dar. Daneben konnten 18 % des allylischen Alkohols **29** sowie 12 % des *trans*-konfigurierten Alkohols **33** identifiziert werden. Für die Quantifizierung der Gesamtmenge aller drei Verbindungen wurde ein Absorptionsfaktor berechnet und verwendet, der dieses Verhältnis berücksichtigt. Da der Absorptionsfaktor von **29** größer ist, als der von **33** und **38**, ist dieses Modell überprädiktiv, wenn der tatsächliche Anteil **29** kleiner ist und unterprädiktiv, wenn der Anteil von **29** größer sein sollte. Der qualitative Nachweis, dass **29** im ternären Gemisch gebildet wird, gelingt bedingt durch Inspektion der UV-Spektren. Sind die Konzentrationen von **29** im Gemisch ausreichend hoch, ist bei den Wellenlängen  $\lambda = 235$  bzw.  $\lambda = 280\text{ nm}$  eine geschulterte Bande im UV-Spektrum erkennbar.

### 5.3.3 LC-MS/MS

Die synthetisierten Referenzsubstanzen sowie ausgewählte Inkubationsüberstände wurden qualitativ LC-MS- bzw. LC-MS/MS-spektrometrisch untersucht. Aus praktischen Gründen wurden diejenigen Inkubationsüberstände ausgewählt, welche das breiteste Metaboliten-spektrum und die größtmöglichen -ausbeuten der jeweiligen Testsubstanz aufwiesen. I. d. R. waren dies die Überstände von Inkubationen mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) nach ein bis drei Stunden Inkubationsdauer. Die massenspektrometrische Charakterisierung der Metaboliten ergänzt somit die Daten von bereits NMR-spektroskopisch identifizierten Metaboliten bzw. liefert, zusammen mit anderen chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften, weitere Hinweise zur Identität von Metaboliten, die nicht NMR-spektroskopisch untersucht werden konnten.

Die in dieser Arbeit untersuchten PP sind substituierte Phenol- bzw. Phenoether-Derivate und als relativ unpolare Verbindungen mit den verfügbaren Ionisierungsmethoden, Elektrosprayionisation (ESI) und *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) generell schlecht ionisierbar, was zu geringen Signalintensitäten führt (Hayen und Karst, 2003). Da alle untersuchten Metaboliten aber mindestens eine nicht veretherte Sauerstofffunktion haben, sind die erreichten Signalintensitäten für die Metaboliten relativ gut. APCI lieferte bessere Signalintensitäten für die Muttersubstanzen, während die polarerer/hydrophileren Metaboliten durch die ESI-Quelle besser ionisiert wurden. Da die Identifizierung der Metaboliten und nicht die Quantifizierung der Muttersubstanzen bei den massenspektrometrischen Untersuchungen im Vordergrund standen, wurde daher die Mehrheit aller Messungen mittels ESI durchgeführt. Die HPLC-chromatographischen Bedingungen wurden ohne Änderung von der analytischen HPLC übernommen. Da an der verwendeten LC-MS/MS-Apparatur eine andere HPLC-Anlage (Perkin-Elmer) benutzt wurde als für die sonstigen HPLC-Messungen (Agilent), ergeben sich hier andere Retentionszeiten. Im Vergleich zur Agilent-HPLC eluieren die Substanzen an der LC-MS/MS diskontinuierlich *ca.* 1,5–2,5 Minuten später. Die Signalintensitäten im positiven Messmodus waren im Schnitt um eine Größenordnung höher, als im negativen Modus. Im negativen Modus lieferten lediglich die phenolischen Metaboliten **6–9** höhere Signalintensitäten. Die Optimierung der MS-Einstellungen erfolgte durch Fließinjektionsanalyse (FIA) mit **11** als Testsubstanz. Die ermittelten Parameter und weiteren Einstellungen sind in Kapitel 7.5.3 aufgeführt. Für eine bessere Ionisierung der untersuchten Verbindungen, wurde als Fließmittel A eine 10 mM wässrige NH<sub>4</sub>OAc-Lösung verwendet. Dieser Elektrolytzusatz bewirkt eine indirekte Ionisation, die durch Protonierung, Kationenanlagerung, Deprotonierung, Anionenanlagerung oder Reaktion von Elektrolytionen mit Molekülen in der Gasphase erreicht wird. NH<sub>4</sub>OAc besitzt weiterhin den Vorteil, dass es rückstandslos verdampft (Schmelzeisen-Redeker *et al.*, 1989).

## 5.4 Metabolismus der Phenylpropanoide

Im Folgenden werden zunächst allgemeine und wiederkehrende Aspekte der Untersuchung des mikrosomalen Metabolismus erläutert und diskutiert. Die „eigentlichen“ Ergebnisse zum Metabolismus der untersuchten Substanzen beginnen mit Kapitel 5.4.2 (Seite 105).

### 5.4.1 Allgemeines

#### 5.4.1.1 Untersuchte Spezies

In dieser Arbeit wurden humane Lebermikrosomen (LM) sowie LM drei tierischer Spezies (Ratte, Rind und Schwein) untersucht. Die wesentlichen Fragen dieser Arbeit sollen die Grundlage für eine Risikoanalyse und -bewertung in Bezug auf die menschliche Ernährung bilden. Daher ist die Untersuchung humaner Modelle von vorrangiger Bedeutung. Hierzu wurden kommerziell erhältliche humane Lebermikrosomen (HLM) verwendet, welche aus Biopsieproben von 150 Spendern beider Geschlechter gewonnen wurden. Eine Liste, in der Alter, Geschlecht, Grund der Biopsie sowie Gewohnheiten der jeweiligen Spender in Bezug auf Alkohol- und Nikotinkonsum angegeben sind, ist im Anhang zu finden. Ferner wurden Supersomes<sup>TM</sup>, welche jeweils ein einzelnes humanes CYP exprimieren, in die Untersuchungen mit einbezogen. Maus und Ratte sind wegen diverser Vorteile die meistverwendeten Modellorganismen in der toxikologischen Forschung. Da also die meisten Versuche *in vivo* sowie *in vitro* an Ratten oder Mäusen erfolgen, muss zwingend überprüft werden, ob sich in diesen Spezies Unterschiede ergeben, die die Vorhersagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen schwächen oder sogar in Frage stellen. Daher wurden die Untersuchungen dieser Arbeit ebenfalls an verschiedenen tierischen Modellen überprüft. Es wurden zwei verschiedene Rattenlebermikrosomen verwendet; solche von unbehandelten Ratten (RLM) und von mit Aroclor 1254-vorbehandelten Ratten (ARLM). Wie in Kapitel 2.2.1.8 bereits erwähnt wurde, führt die Behandlung mit Aroclor 1254 zu einer starken Induktion verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Dadurch ist im Allgemeinen die Metabolisierungsrate hoch und das Metabolitenspektrum in solchen Mikrosomen breit. Wegen dieser Eigenschaften wurden ARLM für die initialen Versuche zur Identifizierung der Metaboliten eingesetzt, da so eine hohe Ausbeute an verschiedenen Metaboliten sichergestellt war. Im direkten Vergleich von RLM und ARLM lassen sich somit auch Rückschlüsse auf die metabolischen Auswirkungen der dioxinvermittelten Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme ableiten. Die Untersuchung der Rinder- (BLM) und Schweinelebermikrosomen (SLM) (Schlachttiere) erfolgte in Hinblick auf die Identifizierung genereller speziesspezifischer Unterschiede und um zu überprüfen, ob diese Mikrosomenarten mögliche Surrogate für die

humane Situation darstellen können. Ein Vorteil bei der Verwendung dieser Untersuchungsmaterialien sind die geringen Kosten und deren nahezu uneingeschränkte Verfügbarkeit. In grober Näherung gilt für den Stoffwechsel von vielen Säugetieren, dass dieser umso schneller und potenter abläuft, je kleiner der Organismus und geringer dessen Lebensspanne ist. So ist die Maus in der Regel ein um ein Vielfaches schnellerer Metabolisierer als der Mensch. Somit könnten, neben genetischen Faktoren, SLM und BLM ein besseres Abbild in Bezug auf die humane Situation liefern als die Untersuchung von RLM.

### 5.4.1.2 Mikrosomenpräparation

Zur Bestimmung von Phase-I-Metaboliten wurden (u. a.) Lebermikrosomen (LM) mit den in dieser Arbeit behandelten Verbindungen Methyleugenol (**1**), Methylisoeugenol (**2**),  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) inkubiert. Die Präparation von Mikrosomen erfolgte durch differentielle Zentrifugation (s. Kap. 7.2.1). Die Lebermikrosomen wurden photometrisch bezüglich ihres Proteingehaltes und ihres CYP-Gesamtgehaltes charakterisiert und der Proteingehalt danach auf die angegebenen Werte eingestellt (Tabelle 15).

**Tabelle 15.** Ursprung, Bezeichnung sowie Protein- und CYP-Gehalte der verwendeten Lebermikrosomen.

Spezies, Geschlecht	Ursprung	Induktion Aroclor 1254	Labor- bezeichnung <sup>a</sup>	Proteingehalt <sup>b</sup> [mg/ml]	Cytochrom P450 <sup>c</sup> [nmol/mg Protein]
Ratte, m	Charles-River	–	RLM-1	5	0,33
Ratte, m	Charles-River	–	RLM-2	5	0,28
Ratte, m	Charles-River	–	RLM-3	5	0,34
Ratte, m	Charles-River	+	ARLM-2	30	1,34
Ratte, m	Charles-River	+	ARLM-3	30	1,67
Ratte, m	Charles-River	+	ARLM-4	30	1,55
Rind <sup>d</sup> , f	Schlacht tier	–	BLM	10	0,88
Schwein, f	Schlacht tier	–	SLM	5	0,39
Mensch, m/f	BD Bioscience <sup>e</sup>	–	HLM	20	0,35 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> RLM 1–3 und ARLM 2–4 stammen von sechs Individuen

<sup>b</sup> bestimmt nach Bradford (1976) und mit NaP<sub>i</sub>-Pufferlösung auf den angegebenen Wert eingestellt

<sup>c</sup> bestimmt nach Omura und Sato (1962)

<sup>d</sup> Rinderlebermikrosomen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand, TU Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt

<sup>e</sup> Ultra Pool HLM 150, Art.-Nr. 452117, BD Bioscience, Heidelberg

<sup>f</sup> bestimmt nach Omura und Sato (1962) von BD Bioscience, Heidelberg

Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen wiesen erwartungsgemäß die höchsten, LM unbehandelter Ratte sowie humane LM die geringsten Cytochrom P450-Gehalte auf. Alle ermittelten Werte liegen im erwarteten Bereich (Parkinson *et al.*, 1983).

### **5.4.1.3 Mikrosomale Inkubationen**

Alle Inkubationen wurden in einem auf pH 7,4 gepufferten wässrigen System bei 37 °C durchgeführt. Als Lieferant für die benötigten Reduktionsäquivalente wurde ein NADPH-generierendes System bestehend Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und  $\beta$ -NADP verwendet. Bei jeder oder zumindest jeder erstmals durchgeführten Messung wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt (ohne NADPH-generierendes System bzw. mit hitzeinaktivierten Mikrosomen). Die genauen Inkubationsbedingungen sind in Kap. 7.2.2 wiedergegeben. Die bei den abgebildeten Chromatogrammen angegebenen Konzentrationen beziehen sich im Falle der Testsubstanzen auf die Inkubationskonzentration und im Falle des internen Standards (**21**) auf die Konzentration in der Messlösung.

### **5.4.1.4 Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen mit Lebermikrosomen**

Zunächst wurden die jeweiligen Substanzen mit den verschiedenen Lebermikrosomen (LM) inkubiert und der Zeitverlauf der Metabolitenbildung verfolgt. Auch wenn die Metaboliten dabei natürlich quantifiziert wurden, dient dies vornehmlich einer qualitativen Untersuchung, während die Messung der apparenten bildungskinetischen Parameter in Kapitel 5.4.2.4 eher quantitative Fragestellungen beantworten sollen.

Vier Fragen sollen durch Messung des Zeitverlaufs beantwortet werden: i) Welche Metaboliten können von den verschiedenen LM überhaupt gebildet werden?; ii) Welche sind die Hauptmetaboliten?; iii) Finden ausgeprägte Weitermetabolisierungsreaktionen statt, d. h. verschiebt sich das Metabolitenspektrum durch längere Inkubationszeiten?; iv) Bis zu welcher Inkubationsdauer bleiben die Bildungsraten der Metaboliten in einem linearen Bereich? Insbesondere die letztere Fragestellung bildet die Grundlage für die Untersuchung der kinetischen Parameter. Dabei muss eine Inkubationsdauer gewählt werden, die zwischen zwei gegenläufigen Extremen liegt: einerseits muss eine ausreichende Menge an quantifizierbaren Metaboliten gebildet werden, andererseits soll die Inkubationsdauer aber möglichst kurz sein, damit die Messungen in einem linearen Bildungsbereich bleiben.

### **5.4.1.5 Metabolismus der Testsubstanzen durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme**

Um herauszufinden, welche CYPs prinzipiell in der Lage sind, die zu untersuchenden Substrate umzusetzen, wurde eine Auswahl der wichtigsten humanen CYPs (CYP1A2, 2A6, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4), exprimiert in Insektenzellen (Supersomes<sup>TM</sup>, BD, Heidelberg),

untersucht. Die Auswahl wurde entsprechend der allgemeinen Relevanz dieser CYPs für den Fremdstoffmetabolismus und auf Grundlage der Ergebnisse von Jeurissen *et al.* (2006), welche die Aktivität verschiedener CYPs in Hinblick auf die Bildung von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) untersuchten, getroffen (vgl. Abbildung 127, Seite 231).

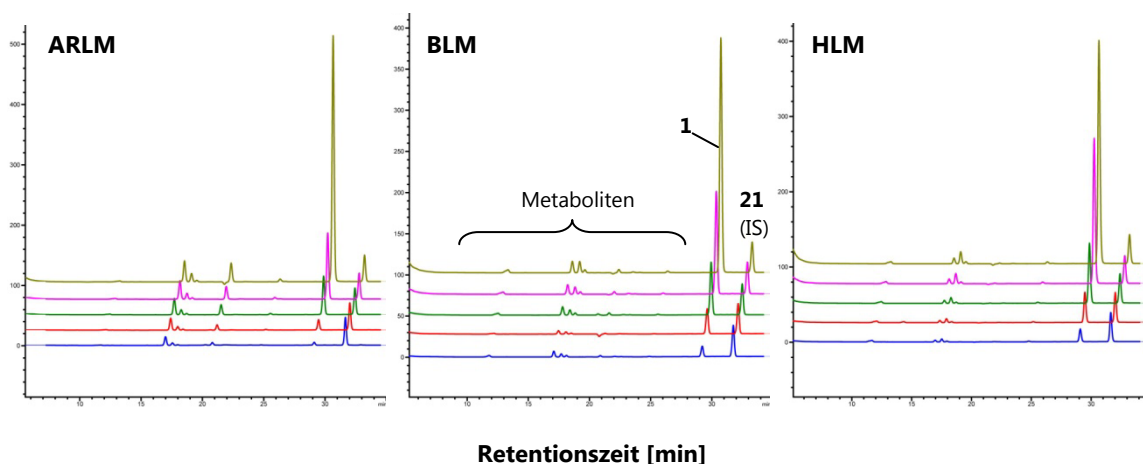
Es wurde eine konstante Stoffmengenkonzentration der CYPs von  $c = 120 \text{ nM}$  mit den Testsubstanzen in zwei Konzentrationen ( $c_{\text{Start}} = 200 \text{ }\mu\text{M}$  und  $500 \text{ }\mu\text{M}$ ) für  $t = 20$  und  $60 \text{ min}$  inkubiert. Die Untersuchung zweier Konzentrationen diene zur Klärung der Frage, ob die veranschlagte CYP-Konzentration von  $120 \text{ nM}$  sinnvoll und für die Bestimmung der Kinetik geeignet ist. Ferner sollte durch Untersuchung zweier Inkubationszeitpunkte ( $20$  und  $60 \text{ min}$ ) grob abgeschätzt werden, ob sich die Bildung der Metaboliten in einem linearen Bereich befindet oder ob nach  $20 \text{ min}$  bereits ein Plateau erreicht wird. Dies zu entscheiden, kann durch Verfolgung von nur zwei – schließt man den Ursprung ein, drei – Zeitpunkten nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden. Jedoch kann zumindest die Inaktivierung der Enzyme bzw. das Erreichen eines Plateaus nach  $20 \text{ min}$  anhand der gewonnenen Daten ausgeschlossen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen und Aktivitäten humaner CYPs in HLM liefern die gewonnenen Daten ein rein qualitatives Ergebnis. Die Bestimmung enzymkinetischer Parameter und die Anwendung des RAF-Konzepts (s. nächste Kapitel) sollen hingegen quantitative Daten liefern.

#### 5.4.1.6 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter des Phase-I-Metabolismus der fünf untersuchten Phenylpropene wurden Lebermikrosomen bzw. Supersomes<sup>TM</sup> mit **1–5** (je  $1 \%$  MeCN) im Konzentrationsbereich zwischen  $50\text{--}800 \text{ }\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von  $20 \text{ Minuten}$  inkubiert. Abbildung 31 zeigt beispielhaft drei Sets von UV-Chromatogrammen der Inkubationen von ARLM, BLM und HLM mit **1** in verschiedenen Startkonzentrationen. Aus den erhaltenen UV-Chromatogrammen wurden die Konzentrationen der identifizierten Metaboliten berechnet. Die ermittelten Metabolitenkonzentrationen nach  $20 \text{ min}$  zweier unabhängiger Messreihen (Lebermikrosomen) wurden in Enzymaktivitäten (Bildungsraten) umgerechnet, die Mittelwerte gebildet, und die erhaltenen Werte mit der Spannweite als  $y$ -Fehler gegen die Startkonzentration ( $c_{\text{Start}}$ ) des Substrates aufgetragen. In Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen wurden die Werte mit  $c_{\text{Start}} = 50, 100, 800 \text{ }\mu\text{M}$  jeweils einfach bestimmt, mit  $c_{\text{Start}} = 200$  und  $500 \text{ }\mu\text{M}$  doppelt bestimmt.

Nun wurden die Hill-Gleichung (1) und die Michaelis-Menten-Gleichung ( $n_H = 1$  konstant) durch nichtlineare Regression an die Messdaten angepasst. Ferner wurden Eadie-Hofstee-

Plots (Auftragung  $v$  gegen  $v/[S]$ ) erstellt um atypische Kinetiken zu identifizieren. Die genaue Vorgehensweise und weitere Begriffsdefinitionen sind in Kapitel 7.5.6 ausführlich beschrieben. Folgende Parameter wurden abgeleitet:  $v_{\max}$  (**app**) bzw.  $k_{\text{cat}}$  als die maximale (apparente) Reaktionsgeschwindigkeit bei Lebermikrosomen bzw. Supersomes<sup>TM</sup> sowie  $K_M$  als die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Aus den Quotienten  $v_{\max}(\text{app})/K_M$  bzw.  $k_{\text{cat}}/K_M$  wurde die (apparente) katalytische Effizienz  $E_{\text{cat}}$  (**app**) bzw.  $E_{\text{cat}}$  für Lebermikrosomen, respektive Supersomes<sup>TM</sup> bestimmt.



**Abbildung 31.** Ausgewählte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation von Methyleugenol (**1**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM, links); Rinderlebermikrosomen (Mitte) und humanen Lebermikrosomen (rechts) nach jeweils 20 min Inkubationszeit. Die Startkonzentrationen von **1** betragen von unten nach oben aufsteigend: 50  $\mu\text{M}$  (blau); 100  $\mu\text{M}$  (rot); 200  $\mu\text{M}$  (grün); 400  $\mu\text{M}$  (magenta) und 800  $\mu\text{M}$  (oliv) bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ref}} = 340 \text{ nm}$ ). IS: Interner Standard (**21**).

Hiernach wurde anhand verschiedener Kriterien (s. Kap. 7.5.6) entschieden, welches der Modelle die kinetische Situation am sinnvollsten beschreibt. Diese Methode hat sich bei der Bestimmung von enzymkinetischen Parametern bewährt (Pianalto *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2008; Soars *et al.*, 2003).

Die Kinetik der Metabolitenbildung in lebermikrosomalen Inkubationen ließ sich in den meisten Fällen sehr gut mit dem Michaelis-Menten-Modell beschreiben. Bei manchen Reaktionen mit Lebermikrosomen und vergleichsweise häufig bei Reaktionen mit Supersomes<sup>TM</sup> wurden teils ausgeprägte allosterische Effekte (oder andere atypische Reaktionskinetiken) beobachtet, die sich besser mit dem Hill-Modell beschreiben ließen oder eine biphasische Reaktionskinetik implizieren. Eine biochemische Interpretation des Hill-Koeffizienten  $n_H$  erfolgt in dieser Arbeit nicht. Er wird vielmehr als ein nicht näher spezifizierter apparenter Korrekturfaktor, als als quantitatives Maß für (funktionelle) Kooperativität



---

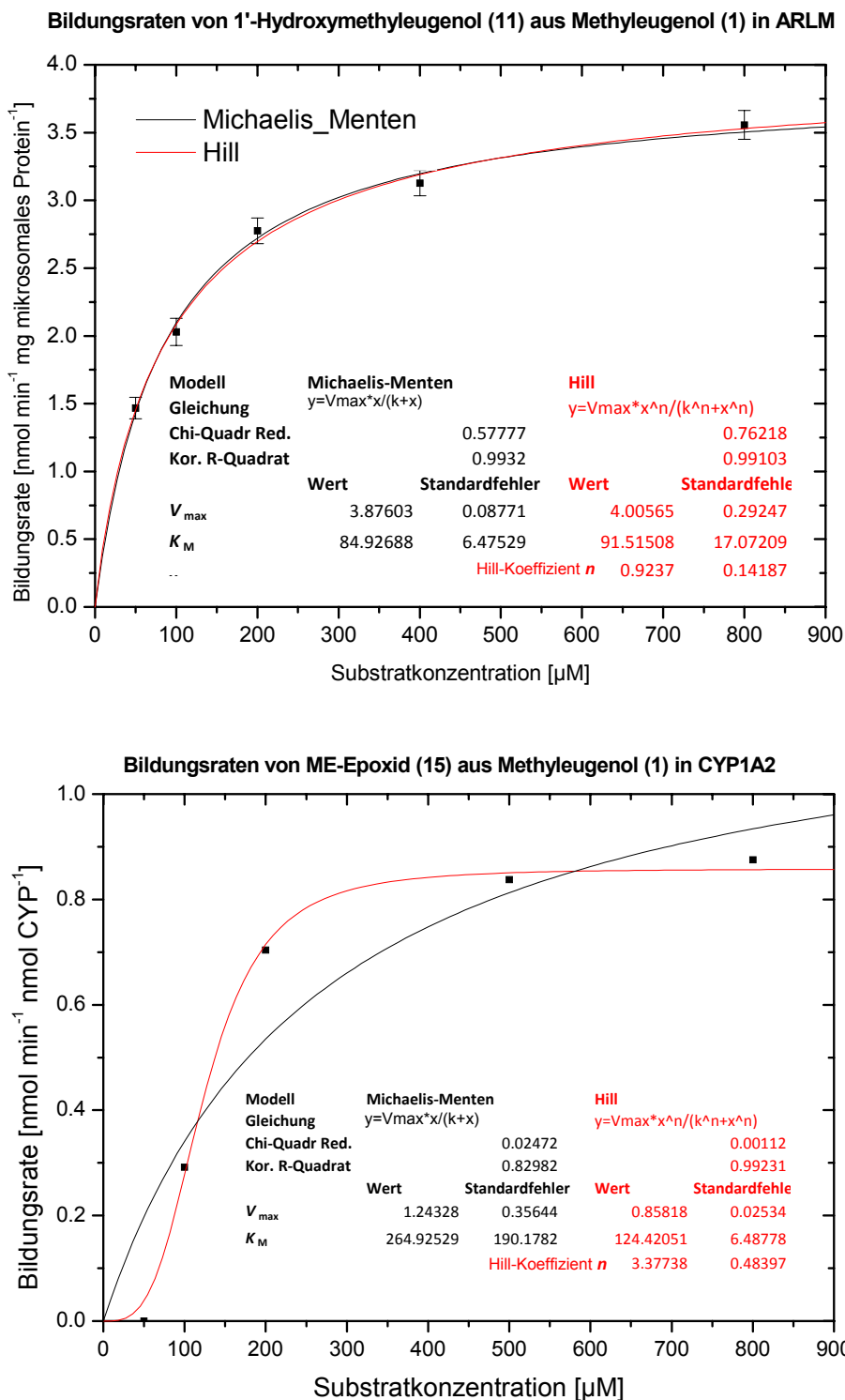
aufgefasst, da in dieser Arbeit die „wirklichkeitsnahe“ Modellierung der gewonnenen Daten und somit die „präzise“ Bestimmung von  $v_{\max}(\text{app})$ ,  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  entscheidender ist als die Interpretation der molekularen enzymkatalytischen Mechanismen.

Die Abbildungen 32 und 33 sollen anhand einiger Beispiele die Unterschiede der Modelle (Michaelis-Menten, Hill sowie Eadie-Hofstee) sowie den Einfluss der Entscheidungskriterien auf die Modellauswahl veranschaulichen. Abbildung 32 (oben) zeigt die Datenpunkte der Bildung von **11** aus **1** in ARLM. Die Anpassung von Hill- und Michaelis-Menten-Gleichung weisen in diesem Fall eine hohe Kongruenz und ähnliche Werte für  $v_{\max}$  und  $K_M$  auf. Da die Hill-Gleichung hier in keinem der Entscheidungskriterien bessere Ergebnisse liefert, wurde folglich das Michaelis-Menten-Modell bevorzugt.

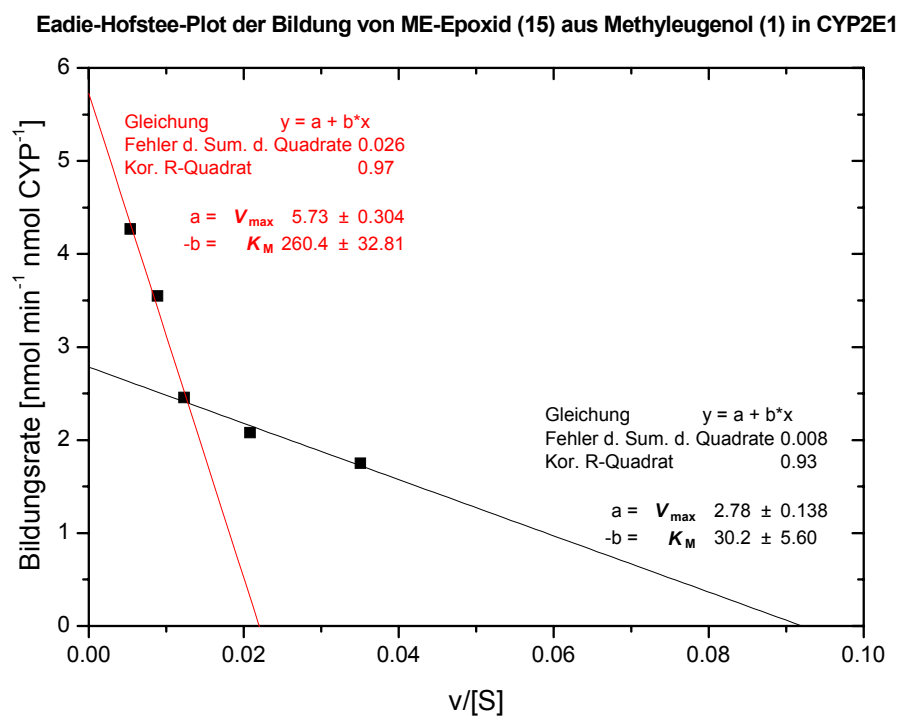
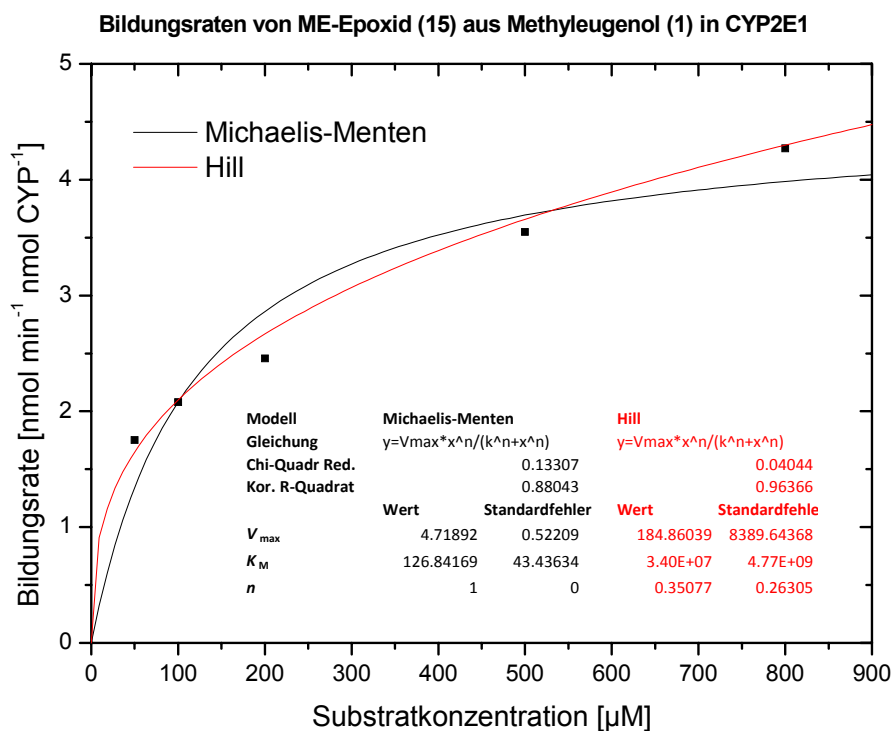
Abbildung 32 (unten) zeigt ein Beispiel für positive (funktionelle) Kooperativität bei der Bildung von Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) aus **1** in CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup>. Ohne explizit auf die Einzelheiten der Entscheidungskriterien einzugehen, ist graphisch direkt ersichtlich, dass in diesem Falle die Hill-Regression den „tatsächlichen“, bzw. den apparenten Reaktionsmechanismus besser wiedergibt.

Abbildung 33 zeigt die Bildungsraten von **15** aus **1** in CYP2E1, welches als Beispiel für die optisch nicht direkt erkennbare negative Kooperativität ist. Der Hill-Fit liefert einen Hill-Koeffizienten von  $n_H = 0,35$ , was direkt auf negative Kooperation schließen lässt. In diesem Fall überwiegen bei keinem Modell die positiven Entscheidungskriterien. Die extrem hohen Werte der Parameter  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  sowie deren Fehler im Hill-Fit ggü. den „normal“ erscheinenden Werten beim MM-Plot, würden hier nun stärker gewichtet, als die übrigen Kriterien.

Negative Kooperativität kann, muss aber nicht, ein Indiz für eine biphasische Reaktionskinetik sein (Hutzler und Tracy, 2001; Yee *et al.*, 1980). Daher wurde im Eadie-Hofstee-Plot (Abbildung 33 unten) überprüft, ob eine biphasische Reaktionskinetik vorliegt. Bei dieser Reaktion ist dies tatsächlich der Fall, und wurde für CYP2E1 in der Literatur für andere Reaktionen bereits beschrieben (Li *et al.*, 2011b). Es wird ein hochaffiner/langsamer (*high affinity, low capacity*) und eine niedrigaffiner/schneller (*low affinity, high capacity*) Bereich identifiziert.



**Abbildung 32.** Hill- bzw.- Michaelis-Menten-Plots der Reaktionen von Lebermikrosomen bzw. Supersomes™ mit Methyleugenol (1). **Oben:** Bildung von 1'-Hydroxymethyleugenol (11) in ARLM als Beispiel einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik; **Unten:** Bildung von Methyleugenol-2',3'-epoxid (15) in CYP1A2-Supersomes™ als Beispiel für positive Kooperativität.



**Abbildung 33.** Bildung von Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) in CYP2E1-Supersomes™. **Oben:** Hill- und Michaelis-Menten-Plot als Beispiel für negative Kooperativität; **Unten:** Eadie-Hofstee-Plot der gleichen Daten zur Illustrierung des biphasischen Charakters der Bildungskinetik.

---

### Darstellung der Ergebnisse zur Enzymkinetik

Um die Übersichtlichkeit bei der Darstellung der enzymkinetischen Daten zu gewährleisten, wurden in deren Tabellen (abgebildet an entsprechender Stelle in den Kapiteln „Kinetik des Phase-I-Metabolismus von...“) jeweils nur die Wertepaare des „besseren“ Regressionsmodells (Michaelis-Menten oder Hill) ohne statistische Parameter angegeben. Konnte eine biphasische Reaktionskinetik nachgewiesen werden, wurde in den Tabellen jeweils das Wertepaar des höheraffinen Bereichs (kleinerer  $K_M$ -Wert) angegeben.

Um ferner die Interpretation der erhaltenen enzymkinetischen Daten lebermikrosomaler Inkubationen zu vereinfachen, wurden die Werte von  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$  zusätzlich in prozentuale Werte, bezogen auf den detektierbaren Gesamtmetabolismus umgerechnet. Durch diese Transformation wird schnell und einfach ersichtlich, welche Metaboliten bei niedrigen ( $E_{\text{cat}}$  %) oder hohen Substratkonzentrationen ( $v_{\max}$  %) in welchem (prozentualen) Ausmaß gebildet werden.

Insbesondere bei Minormetaboliten kam es vor, dass nur wenige Datenpunkte für die Kurvenanpassung zur Verfügung standen, z. B. wenn ein Metabolit nur im Falle hoher Substratstartkonzentrationen detektierbar war. Enzymkinetische Daten wurden nur dann angegeben, wenn mindestens drei nicht-triviale Werte ( $v \neq 0$ ) für die Modellierungen herangezogen werden konnten. War dies nicht der Fall wurde der entsprechende Eintrag mit wd (wenige Datenpunkte) in den Tabellen gekennzeichnet.

Obwohl in mikrosomalen Präparationen alle zytosolischen Enzyme nahezu quantitativ fehlen und für viele andere mikrosomale Enzyme in den Inkubationen die Kofaktoren fehlen (da sie nicht supplementiert werden), handelt es sich bei Lebermikrosomen um komplexe Enzymmischungen und viele CYPs weisen relativ geringe Substratspezifitäten auf. Daher sind mikrosomale enzymkinetische Parameter als Summe der Beiträge der einzelnen Enzyme zu interpretieren und werden somit als **apparent** (scheinbar) bezeichnet. Streng genommen sind die enzymkinetischen Parameter der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen auch apparent, da es sich hierbei nicht um aufgereinigte Enzyme, sondern ebenfalls um Mikrosomen aus Insektenzellen handelt. In den jeweiligen Markerreaktionen (vgl. nächstes Kapitel) zur Bestimmung der Aktivität des jeweils rekombinant exprimierten CYPs wurde in keinem Fall eine basale Aktivität der Kontroll-Insektenzellenmikrosomen (also ohne CYP-Expression) detektiert (Herstellerangaben). In zahlreichen Kontrollexperimenten konnte ferner gezeigt werden, dass die basalen Insektenenzyme keinen messbaren Beitrag zum Metabolismus vieler Fremdstoffe liefern (z. B. Wang *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2005; Sonntag

und Parker, 2002). Deshalb werden die gemessenen enzymkinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup> in dieser Arbeit als nicht apparent angesehen.

Die enzymkinetischen Parameter wurden für alle Metaboliten, also auch für Sekundärmetaboliten bestimmt. Das betrifft die Bildung von Diolen aus Epoxiden sowie die Bildung von Carbonylverbindungen aus Seitenkettenalkoholen. Da der Bildung dieser Metaboliten also jeweils eine vorgelagerte Reaktionen zugrunde liegt, was in der mathematischen Beschreibung der benutzten Modelle nicht berücksichtigt wird, müssen die erhaltenen Werte mit Vorsicht betrachtet werden und sind gewissermaßen „doppelt apparent“: Einmal in Bezug auf die beteiligten Enzyme in Lebermikrosomen und andererseits deshalb, weil es sich um Sekundärreaktionen handelt und somit die Konzentrationen der metabolischen Vorstufen über den betrachteten Zeitraum variieren (i. d. R. steigen) und somit keine Startkonzentrationen bestimmbar sind. Während die Bestimmung der Bildungsraten der Diole aus teilweise nicht detektierbaren Epoxiden gut funktionierte, da die Hydrolyse bei den meisten untersuchten Substraten sehr schnell ablief, ließ sich die Bildung der Oxo-Verbindungen aus den korrespondierenden Alkoholen meist nicht mit einer Michaelis-Menten-Kinetik beschreiben.

Im elektronischen Anhang zu dieser Arbeit (Seite 12–161) sind alle einzelnen Fits unter Angabe der Regressionsparameter nach Michaelis-Menten und Hill sowie die Auftragungen nach Eadie-Hofstee abgebildet.

#### 5.4.1.7 Beitrag der Cytochrom P450-Enzyme zum Metabolismus in humanen Lebermikrosomen: Das RAF-Konzept

Die Fähigkeit eines humanen CYPs einen Metaboliten zu bilden und die kinetischen Parameter, die quantitativ beschreiben, wie diese Reaktion katalysiert wird, sagen noch nichts über die Beteiligung bzw. den Beitrag dieser Reaktion im humanen mikrosomalen Metabolismus aus. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass die CYPs alle in der gleichen Stoffmengenkonzentration untersucht wurden. Da in der menschlichen Leber und folglich auch in humanen Lebermikrosomen (HLM) die CYPs in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Aktivitäten vorliegen, wurde Mitte der 1990er Jahre das RAF-Konzept (*relative activity factors approach*) entwickelt, welches versucht, diese Unterschiede zu berücksichtigen (Crespi und Penen, 1997). Die Aktivität eines einzelnen CYPs wird in einem für das betreffende CYP charakteristischen Assay, sowohl für Supersomes<sup>TM</sup>, als auch für HLM bestimmt. Der RAF des betreffenden CYPs ist dann definiert als:

$$\text{RAF}(\text{CYP}_i) = \frac{v_{\max}(\text{HLM})}{k_{\text{cat}}(\text{CYP}_i)} \quad (4)$$

Dabei ist  $v_{\max}$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in HLM bezogen auf die Menge des mikrosomalen Proteins [ $\text{pmol Produkt min}^{-1} \text{mg mikrosomales Protein}^{-1}$ ] und  $k_{\text{cat}}$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Supersomes<sup>TM</sup> bezogen auf die Stoffmenge des betreffenden CYPs [ $\text{pmol Produkt min}^{-1} \text{pmol CYP}^{-1}$ ]. Dadurch erhält man RAF in der Einheit [ $\text{pmol CYP/mg mikrosomales Protein}$ ], man hat also berechnet, in welcher Stoffmenge das betreffende CYP bezogen auf den Proteingehalt in HLM vorliegt<sup>1</sup>. Tabelle 16 zeigt die anhand der Herstellerangaben berechneten RAFs.

CYP2E1 wurde dabei in verschiedenen Assays gemessen und die Werte sind somit eigentlich nicht miteinander vergleichbar. Amato *et al.* (1998) führten beide Assays vergleichend in Affenlebermikrosomen durch. Legt man deren Daten zugrunde, erhält man eine rund 6-fach höhere Chlorzoxazon-6-Hydroxylase-Aktivität im Vergleich zur *p*-Nitrophenol-Hydroxylase-Aktivität in den gleichen Mikrosomen derselben Charge. Der in Tabelle 16 berechnete RAF wurde um diesen Faktor korrigiert.

**Tabelle 16.** Aktivitäten (Herstellerangaben der verwendeten Chargen) der humanen Lebermikrosomen (HLM) und Supersomes<sup>TM</sup> in spezifischen Assays sowie die daraus abgeleiteten relativen Aktivitätsfaktoren (RAF).

CYP	Assay	Aktivität		RAF
		HLM [pmol/min/mg Protein]	Supersomes <sup>TM</sup> [pmol/min/pmol CYP]	(=Aktivität HLM/CYP) [pmol CYP/mg Protein]
1A2	Phenacetin-O-Deethylase	650	25	26,0
2A6	Cumarin-7-Hydroxylase	1000	9,2	109
2C19	(S)-Mephenytoin-4'-Hydroxylase	87	5,4	16,1
2D6 <sup>1</sup>	(+/-)-Bufuralol-1'-Hydroxylase <sup>a</sup>	75	47	1,60
2E1	Chlorzoxazon-6-Hydroxylase	3600	n. a.	(450) korr.:
2E1	<i>p</i> -Nitrophenol-Hydroxylase	n. a.	8	74,9
3A4	Testosteron-6 $\beta$ -Hydrolase	5300	370	14,3

<sup>a</sup> „the amount of activity inhibited by 1  $\mu\text{M}$  quinidine“

n. a.: nicht angegeben

<sup>1</sup> In der Literatur wird die Aktivität der rekombinant hergestellten Enzyme (z. B. Supersomes<sup>TM</sup>) häufig auf den mikrosomalen Proteingehalt dieser bezogen und mit diesem Wert der RAF berechnet. Auf den ersten Blick mag diese Methode elegant erscheinen, da RAF dann dimensionslos ist. Jedoch ist – nach Meinung des Autors – der Proteingehalt der Insektenzellmikrosomen von Supersomes<sup>TM</sup> für deren CYP-Gehalt und -Aktivität irrelevant, da eine Korrelation des Proteingehalts der Supersomes<sup>TM</sup> mit deren CYP-Gehalt unwahrscheinlich ist. Ferner erhielte man in der Folge die „contribution“ in HLM in der Einheit [ $\text{pmol Produkt/min/pmol CYP}$ ], müsste also den individuellen CYP-Gehalt in HLM kennen oder bestimmen. Diese Informationen werden vom Hersteller jedoch i. d. R. nicht bzw. nur für CYP3A4 angegeben.

Da die in der Literatur im RAF-Konzept benutzten Bezeichnungen uneinheitlich verwendet werden bzw. auch eine gewisse Konfusion bei der Verwendung der Begriffe vorherrscht, werden die in dieser Arbeit getroffenen Definitionen nachfolgend ausführlich beschrieben.

Hat man die Rate  $v$  für die Bildung eines Metaboliten  $M_i$  durch ein  $CYP_i$  in Supersomes<sup>TM</sup> bei gegebener Substratkonzentration (oder dessen maximale Bildungsgeschwindigkeit  $k_{cat}$ ), bestimmt (gemessen), ergibt die Multiplikation mit dem entsprechenden RAF dieses CYPs die berechnete Reaktionsgeschwindigkeit dieses CYPs in HLM<sup>1</sup> in der Einheit [pmol Produkt min<sup>-1</sup> mg mikrosomales Protein<sup>-1</sup>]. Dieser Wert wird als  $v_{HLM, \text{berechnet}}(CYP_i)(M_i)$  definiert:

$$v_{HLM, \text{berechnet}}(CYP_i)(M_i) = \text{RAF}(CYP_i) \cdot v(M_i)(CYP_i) \quad (5)$$

Die Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten eines Metaboliten  $M_i$  aller  $n$  untersuchter CYPs ( $CYP_i$ ) sollte somit – unter der Voraussetzung, man hat die entscheidenden CYPs, die an dieser Reaktion beteiligt sind, im experimentellen Setup erfasst – eine Vorhersage über die Gesamtgeschwindigkeit der betreffenden Reaktion in HLM liefern können. Die Summe über alle CYPs wird als  $v_{HLM, \text{berechnet}}(M_i)$  bezeichnet:

$$v_{HLM, \text{berechnet}}(M_i) = \sum_{CYP_i}^n \text{RAF}(CYP_i) \cdot v(M_i)(CYP_i) \quad (6)$$

Die Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten aller  $m$  Metaboliten  $M_i$  eines CYPs ( $CYP_i$ ) wird als  $v_{HLM, \text{berechnet}}(CYP_i)$  definiert:

$$v_{HLM, \text{berechnet}}(CYP_i) = \sum_{M_i}^m \text{RAF}(CYP_i) \cdot v(M_i)(CYP_i) \quad (7)$$

Die Summe der Reaktionsgeschwindigkeiten aller  $n$  untersuchter CYPs ( $CYP_i$ ) und aller  $m$  detektierten (bzw. identifizierten) Metaboliten  $M_i$  wird definiert als  $v_{HLM, \text{berechnet}}$  und sollte eine Vorhersage über die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit in HLM liefern können:

$$v_{HLM, \text{berechnet}} = \sum_{M_i}^m \sum_{CYP_i}^n \text{RAF}(CYP_i) \cdot v(M_i)(CYP_i) \quad (8)$$

Die apparente Bildungsgeschwindigkeit eines Metaboliten in HLM ist experimentell einfach zugänglich. Durch Vergleich dieser mit den berechneten Werten aus Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen nach Gleichung 6 und 8 kann somit die Vorhersagegenauigkeit des RAF-Konzepts überprüft werden und abgeleitet werden, ob evtl. andere, nicht untersuchte (CYP)-Enzyme einen wesentlich Beitrag zum mikrosomalen Metabolismus leisten.

<sup>1</sup> In der Literatur wird dieser Wert häufig als „contribution“ bezeichnet.

Die Prädiktionskraft dieses Ansatzes ist von mehreren Faktoren abhängig. Der Spezifität der jeweiligen Aktivitäts-Assays für die untersuchten CYPs kommt dabei die größte Bedeutung zu. Alle in Tabelle 16 aufgeführten Markerreaktionen sind von der FDA für die entsprechenden CYPs empfohlene Assays (Yuan *et al.*, 2002). Ist ein Assays, mit dessen Aktivität der RAF eines CYP berechnet wurde, dennoch unspezifisch, bedeutet dies, dass die Marker-Reaktion auch durch andere Enzyme katalysiert wird. Somit wäre der tatsächliche RAF des CYP potentiell kleiner (d. h. der berechnete RAF zu groß) und der berechnete Beitrag dieses CYP (oder die Summe der Beiträge mehrerer untersuchter CYPs) zu einer beliebigen anderen Reaktion kann zu hoch ausfallen. Wird andererseits eine untersuchte Reaktion in HLM vor allem durch andere als die untersuchten CYPs, deren  $k_{cat}(\text{CYP}_i)$  oder  $v(\text{CYP}_i)$  bestimmt wurden, katalysiert, so wird die berechnete Gesamtbildungsrate zu gering sein.

Neben der Selektivität der Markerreaktionen hängt die Aussagekraft dieser Berechnungen im Wesentlichen von zwei weiteren Faktoren ab: Die Bildungsrate der Metaboliten müssen sowohl für die bekannte Markerreaktion, als auch für die Reaktionen der zu untersuchenden Substanz linear zur Enzymkonzentration sein (*initial rate conditions*). Das konnte aus ökonomischen Gründen bei den für diese Arbeit unternommenen Messungen nicht explizit gezeigt werden. Zum Anderen ist der berechnete RAF unabhängig vom zu untersuchenden Substrat. Daher müssen Redoxpartner, Reduktionsäquivalente und allosterische Effektoren (z. B. Cytochrom  $b_5$ ), die einen substratspezifischen Einfluss auf die Umsatzrate haben können, in genügenden aber geeigneten Konzentrationen bzw. Aktivitäten vorliegen (Crespi und Miller, 1999; Yamazaki *et al.*, 1996). Zudem können die prozentualen und absoluten Beiträge eines CYPs nur innerhalb der Gruppe von Enzymen, die auch gemessen wurden, als zuverlässig betrachtet werden. Daher ist in diesem Zusammenhang die berechnete, prozentuale Beteiligung eines CYPs an der Gesamtbildungsrate eines einzelnen Metaboliten in HLM<sup>1</sup>:

$$\text{Beteiligung}(\text{CYP}_i)(M_i)_{\text{HLM}} = \frac{v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)}{v_{\text{HLM, berechnet}}(M_i)} \cdot 100 = \frac{\text{RAF}(\text{CYP}_i) \cdot v(M_i)(\text{CYP}_i)}{\sum_{\text{CYP}_i}^n \text{RAF}(\text{CYP}_i) \cdot v(M_i)(\text{CYP}_i)} \cdot 100 \quad (9)$$

bzw. die berechnete, prozentuale Beteiligung eines CYPs an der Gesamtbildungsrate aller Metaboliten in HLM:

$$\text{Beteiligung}(\text{CYP}_i)_{\text{HLM}} = \frac{v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)}{v_{\text{HLM, berechnet}}} \cdot 100 = \frac{\sum_{M_i}^m \text{RAF}(\text{CYP}_i) \cdot v(M_i)(\text{CYP}_i)}{\sum_{M_i}^m \sum_{\text{CYP}_i}^n \text{RAF}(\text{CYP}_i) \cdot v(M_i)(\text{CYP}_i)} \cdot 100 \quad (10)$$

interessanter. Die Ergebnisse zu sind an entsprechender Stelle in den Kapiteln „Kinetik des Phase-I-Metabolismus von...“ abgebildet.

<sup>1</sup> in der Literatur wird dieser Wert auch als „Clearance %“ bezeichnet

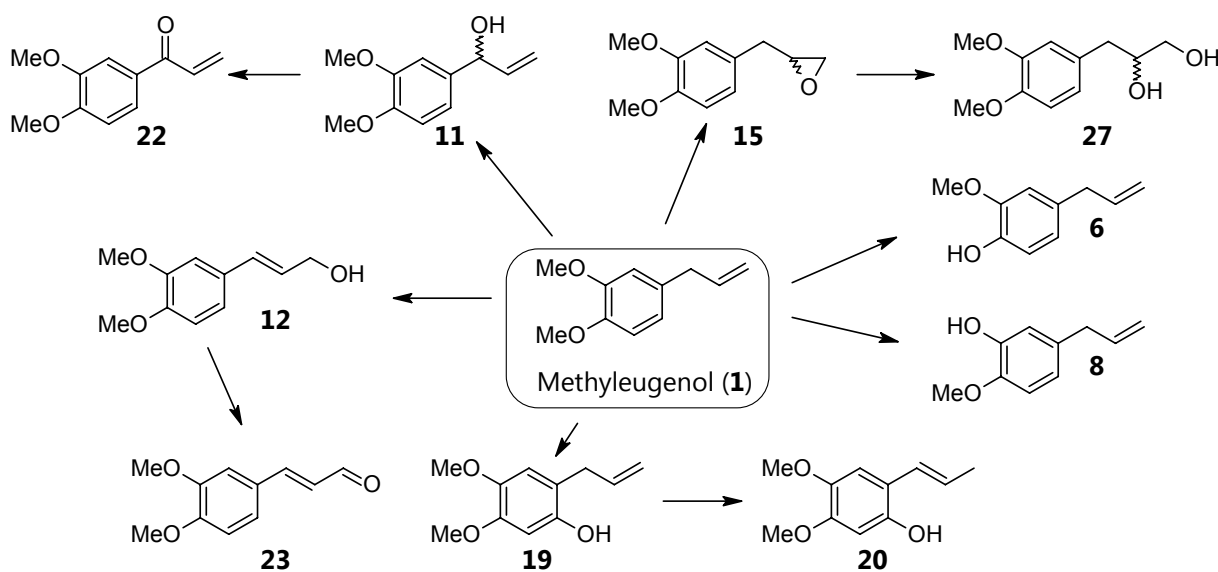


## 5.4.2 Metabolismus von Methyleugenol (1)

Teile der in diesem Unterkapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34).

### 5.4.2.1 Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von Methyleugenol (1)

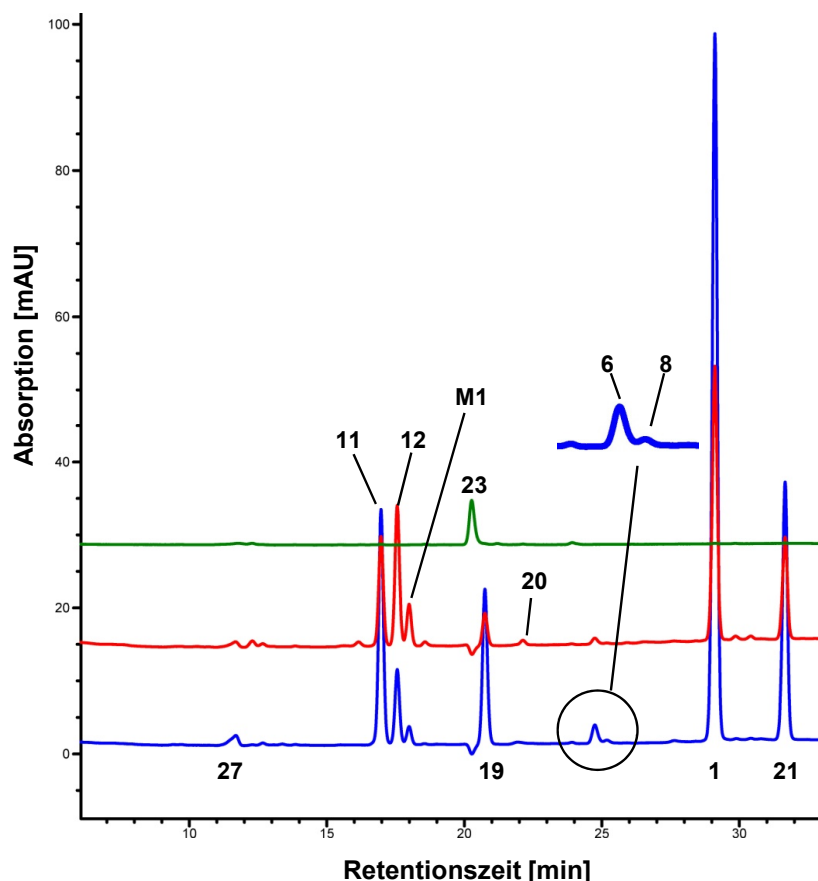
Zur Identifizierung von Phase-I-Metaboliten von Methyleugenol (1) wurden Rattenlebermikrosomen von Aroclor 1254-vorbehandelten Tieren (ARLM) in präparativem Maßstab mit 1 zusammen mit einem NADPH-generierenden System über Nacht inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde gemäß Kapitel 7.2.3 aufgearbeitet und nach präparativer Trennung an der HPLC (Kap. 7.5.2) von ausgewählten Fraktionen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gemessen. Bereits in früheren Arbeiten konnten so die Hauptmetaboliten von 1 identifiziert werden (Cartus, 2009). Durch Optimierung der präparativen Abläufe und Verwendung kleiner NMR-Probenröhrchen ( $d = 3,0 \text{ mm}$ ) konnten sogar in geringem Umfang gebildete Minormetaboliten identifiziert werden (Cartus *et al.*, 2012). In Abbildung 34 sind die identifizierten Metaboliten von 1 und die entsprechenden Reaktionswege wiedergegeben.



**Abbildung 34.** Identifizierte Metaboliten und Reaktionswege der Inkubationen verschiedener Lebermikrosomen mit Methyleugenol (1).

Für alle Metaboliten von Methyleugenol konnten synthetische Referenzverbindungen hergestellt werden. Die Synthesevorschriften und Charakterisierungen der Metaboliten sind in Kapitel 7.6 (Seite 272 ff.) aufgeführt. Alle NMR- und UV/Vis-Spektren sowie alle Chromatogramme sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

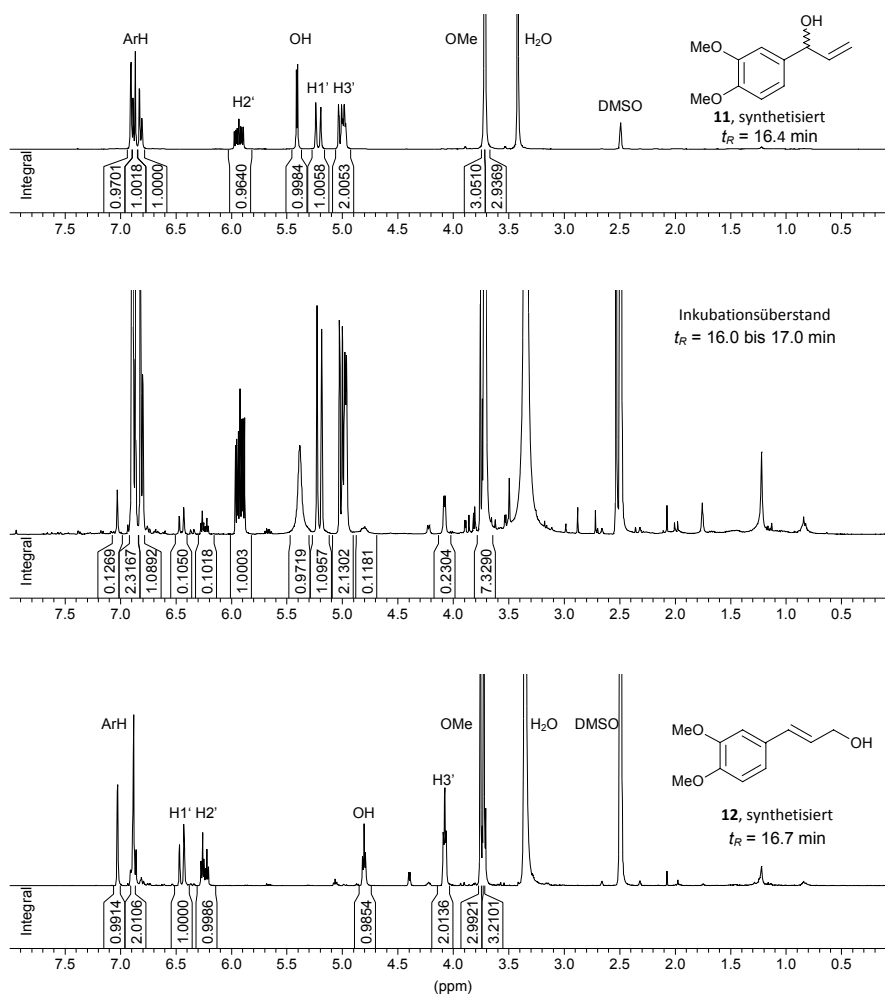
Abbildung 35 zeigt beispielhaft HPLC-UV-Chromatogramme des Überstandes der Inkubation von ARLM mit **1** bei verschiedenen Wellenlängen. Im Folgenden wird auf die Identifizierung der Metaboliten von **1** näher eingegangen.



**Abbildung 35.** HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten des Inkubationsüberstandes der Reaktion von Aroclor 1254-vorbehandelten Rattenlebermikrosomen (ARLM) mit Methyl-eugenol (**1**, Startkonzentration 400  $\mu\text{M}$ ; Inkubationsdauer 20 min), gemessen bei den Wellenlängen  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (blau); 261 nm (rot); 340 nm (grün). Referenzwellenlängen:  $\lambda_{\text{ref}} = 360, 360$  und 450 nm. Konzentration des internen Standards (**21**): 67  $\mu\text{M}$ . Die Substanznummern sind in Abbildung 34 und in der dieser Arbeit vorangestellten Substanzübersicht erläutert.

### 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) und 3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**)

Die Seitenkettenalkohole **11** und **12** waren in allen Inkubationen von Lebermikrosomen mit **1** die beiden Hauptmetaboliten von **1**. Deren Identitäten konnten bereits früher (Cartus, 2009) aus aufgearbeiteten Inkubationsüberständen NMR-spektroskopisch bewiesen werden. Abbildung 36 zeigt die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Reinverbindungen **11** und **12** sowie des relevanten HPLC-chromatographisch isolierten Peaks des Inkubationsüberstandes im Vergleich. Die Identitäten der Metaboliten **11** und **12** wurde weiterhin durch Vergleich der physiko-chemischen Eigenschaften mit den synthetisch hergestellten Referenzsubstanzen bestätigt. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 17 wiedergegeben.



**Abbildung 36.** <sup>1</sup>H-NMR Spektren von synthetisiertem **11** (oben) und **12** (unten) sowie das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 16$ –17 min aus der Inkubation von ARLM mit **1** (Mitte). Aus: Cartus, 2009 und Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

**Tabelle 17.** Physiko-chemische Eigenschaften von **11** und **12**.

	<b>1'-Hydroxymethyleugenol (11)</b>	<b>3'-Hydroxymethylisoeugenol (12)</b>
$t_R$ [min]	16,4–17,1	16,7–17,5
$m/z^*$ , LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS	217,3; 233,2; <b>177,2*</b> ; 146,1; 162,0;	217,3; 233,2; <b>177,2*</b> ; 146,1; 162,1;
	121,1; 117,1	121,3; 117,0
$\lambda_{max}$ [nm]	233, 278	214, 263, 298 (sh)
$\lambda_{min}$ [nm]	218, 255	241, 298 (sh)

\*die **fett** gedruckten Massen beziehen sich auf das Mutterion. In normaler Schrift sind die bei der Fragmentierung des Mutterions entstandenen Tochterionen in absteigender Signalintensität angegeben.

Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, eluierte **11** (bei den gegebenen chromatographischen Bedingungen) durchschnittlich 0,5 Minuten früher als **12**. Die massenspektrometrische Untersuchung ergab für beide Verbindungen das größte Massensignal bei einem *Masse-zu-*

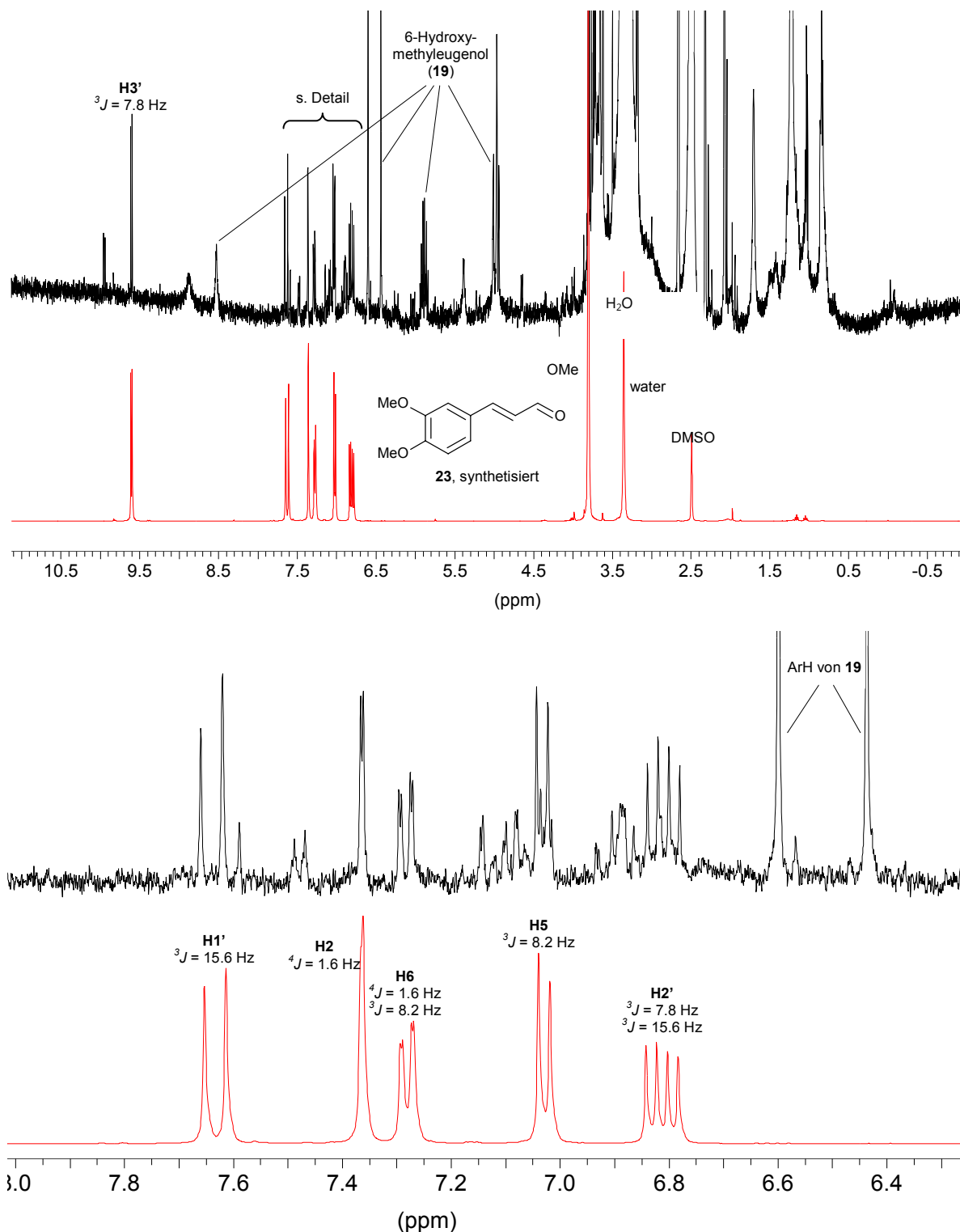
Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) von 177,2, wobei es sich hierbei um das  $[M+H-H_2O]^+$ -Signal handelt. Ferner erzeugten beide Verbindungen je ein Signal bei  $m/z = 217,3$  und  $233,2$ , welche höchstwahrscheinlich die Natrium-  $[M+Na]^+$ , bzw. Kalium-Addukte  $[M+K]^+$  repräsentiert. Das eigentlich zu erwartende Signal  $[M+H]^+$  bei  $m/z = 195,2$  wurde bei beiden Verbindungen, wahrscheinlich wegen der instabilen  $R-OH_2^+$ -Bindung, nicht beobachtet.

Weiterhin erkennt man eine Eigenschaft, die allen propenylischen und allylischen Phenylpropanoiden (PP) gemein ist; die unterschiedlichen Absorptionsmaxima. Während alle allylischen (sowie PP mit gesättigter Seitenkette) Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\max} \approx 225-235$  und  $277-290$  nm besitzen, absorbieren propenylische PP bei  $\lambda_{\max} \approx 255-265$  am intensivsten. Da sich die lokalen Absorptionsmaxima und -minima in beiden Fällen in etwa überschneiden, kann eine spezifische Unterscheidung zwischen Allyl- bzw. gesättigter Seitenkette und Propenylseitenkette oft schon allein anhand der UV-Chromatogramme bei den beiden Leitwellenlängen  $\lambda = 280$  (Allyl, gesättigt) und  $\lambda = 261$  nm (Propenyl) erfolgen.

1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) besitzt in Position 1' ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und ist somit chiral. Das synthetisch hergestellte **11** lag racemisch vor. Zur Konfiguration des mikrosomal gebildeten **11** wurden keine Untersuchungen angestellt, es ist aber durchaus möglich, dass von verschiedenen Enzymen jeweils eines der beiden möglichen Enantiomere bevorzugt gebildet wird. Auch 3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**) kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen. Die Doppelbindung der Seitenkette kann *cis* (*Z*)- oder *trans* (*E*)-konfiguriert sein. Die chemischen Verschiebungen sowie die vicinalen Kopplungskonstanten der an der Doppelbindung beteiligten Protonen in Position 1' und 2' (je  $^3J_{H_2',H1'} = 16,0$  Hz) bestätigt die *trans*-Konfiguration sowohl des synthetisch hergestellten, als auch des mikrosomal gebildeten **12**. Auch wenn **12** synthetisch durch säurekatalysierte Isomerisierung von **11** erhalten werden konnte, wurde **12** mikrosomal direkt aus **1** gebildet und war kein Isomerisierungsprodukt von **11**. Dies konnte durch Inkubation von synthetischem **11** mit ARLM gezeigt werden (Cartus *et al.*, 2012).

### 1'-Oxomethyleugenol (**22**) und 3'-Oxomethylisoeugenol (**23**)

Keton **22** und Aldehyd **23** sind die Oxidationsprodukte der Alkohole **11** und **12**. Während Aldehyd **23** in fast allen mikrosomalen Inkubationen mit **1** detektierbar war und teilweise in beträchtlichen Konzentrationen detektiert wurde, lag die Konzentration von **22** in allen Inkubationen stets unterhalb der Bestimmungsgrenze und war nur in wenigen Inkubationen nachweisbar. In Abbildung 37 sind die  $^1H$ -NMR-Spektren von synthetisiertem **23** sowie des relevanten HPLC-chromatographisch isolierten Peaks des Inkubationsüberstandes gezeigt.



**Abbildung 37.** Oben:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ( $\delta = -1,0$ – $11,0$  ppm) von synthetisiertem  $(E)$ -3'-Oxomethylisoeugenol (**23**, rot) und des isolierten Peaks (präparative HPLC) im Retentionsbereich von  $t_R \approx 19$ – $20$  min aus der Inkubation von ARLM mit Methyleugenol (**1**, schwarz). Unten: Vergrößerter Ausschnitt im Bereich von  $\delta = 6,3$ – $8,0$  ppm der gleichen Spektren. Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

Die mikrosomal gebildete Menge von **22** war nicht ausreichend, um dessen Identität <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch nachzuweisen. Wahrscheinlich wurden die Signale von **22** von denen im gleichen Retentionsbereich eluierenden Verbindungen **19**, **20** und **23** überdeckt. Allerdings konnte die Identität von 1'-Oxomethyleugenol (**22**) neben **23** LC-MS/MS-spektrometrisch nachgewiesen werden. Die physiko-chemischen Eigenschaften der Metaboliten **22** und **23** sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

**Tabelle 18.** Physiko-chemische Eigenschaften von 1'-Oxomethyleugenol (**22**) und (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**).

	<b>1'-Oxomethyleugenol (22)</b>	<b>(E)-3'-Oxomethylisoeugenol (23)</b>
<i>t<sub>R</sub></i> [min]	19,7–20,3	20,3–21,0
<i>m/z</i> <sup>*</sup> , LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS	<b>193,2</b> ; 55,0; 162,0; 137,1; 165,0; 151,0; 175,0	<b>193,2</b> ; 161,0; 175,0; 137,1; 55,2
<i>λ<sub>max</sub></i> [nm]	230, 290, 325	237, 247, 305 (sh), 339
<i>λ<sub>min</sub></i> [nm]	260; 300 (sh)	232, 268, 312 (sh)

\*die **fett** gedruckten Massen beziehen sich auf das Mutterion. In normaler Schrift sind die bei der Fragmentierung des Mutterions entstandenen Tochterionen in absteigender Signalintensität angegeben.

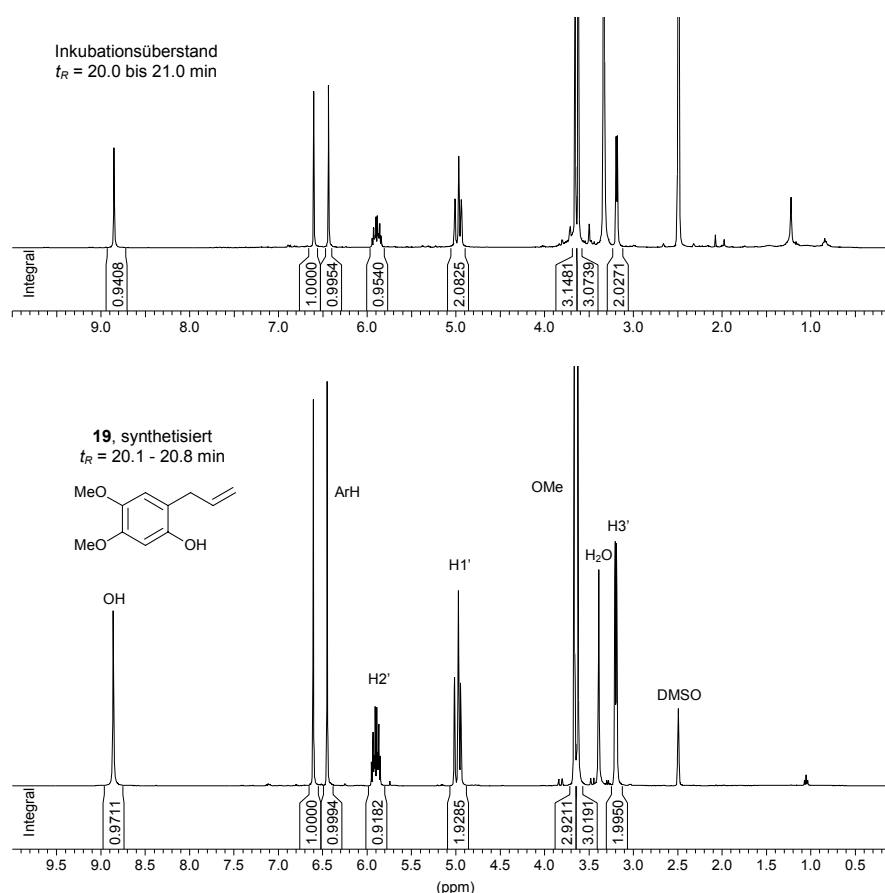
## 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) und 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**)

Neben der Hydroxylierung der Seitenkette wurde ebenfalls die Hydroxylierung des aromatischen Ringes in Position 6 beobachtet. 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) war einer der Hauptmetaboliten bei der Inkubation von ARLM mit Methyleugenol (**1**). Abbildung 38 (Seite 111) zeigt den Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von synthetisiertem **19** und dem mikrosomal gebildeten Metaboliten. Neben **19** konnte in einigen mikrosomalen Inkubationen ebenfalls das Isomerisierungsprodukt (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) detektiert werden. Dieser Metabolit wurde ebenfalls nicht in ausreichender Menge gebildet, um einen NMR-spektroskopischen Identitätsbeweis zu erbringen. Jedoch stimmen die weiteren physiko-chemischen Eigenschaften (Tabelle 19) von synthetischem **20** mit denen des Metaboliten, welcher in Inkubationen detektiert wurde, überein.

**Tabelle 19.** Physiko-chemische Eigenschaften von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) und (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**).

	<b>6-Hydroxymethyleugenol (19)</b>	<b>(E)-6-Hydroxymethylisoeugenol (20)</b>
<i>t<sub>R</sub></i> [min]	20,1–20,8	21,5–22,3
<i>m/z</i> <sup>*</sup> , LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS	<b>195,3</b> ; 154,0; 180,1; 139,2; 163,3	<b>195,3</b> ; 167,1; 163,0; 180,0; 135,1; 154,0
<i>λ<sub>max</sub></i> [nm]	230, 290	215, 257, 315
<i>λ<sub>min</sub></i> [nm]	255	237, 280

\*die **fett** gedruckten Massen beziehen sich auf das Mutterion. In normaler Schrift sind die bei der Fragmentierung des Mutterions entstandenen Tochterionen in absteigender Signalintensität angegeben.

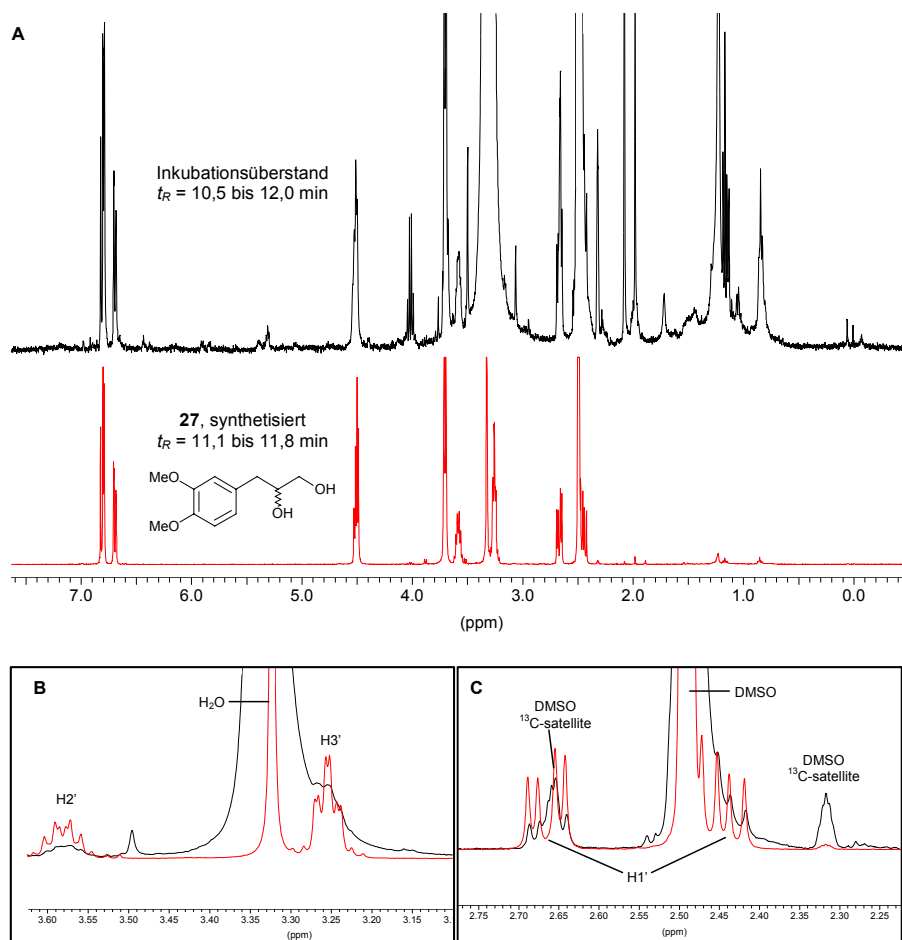


**Abbildung 38.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von synthetisiertem 6-Hydroxymethyleugenol (**19**, unten) und des isolierten Peaks (präparative HPLC) im Retentionsbereich von  $t_R \approx 20$ – $21$  min aus der Inkubation von ARLM mit **1** (oben). Aus: Cartus, 2009; Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

### Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) und 2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol (**27**)

Ein weiterer Metabolit, der in jeder mikrosomalen Inkubation detektierbar war, konnte als (*RS*)-2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol (**27**) identifiziert werden. Die Überlagerung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des synthetisierten und des mikrosomal gebildeten Diols **27** ist in Abbildung 39 abgebildet. Wegen der geringen Menge des mikrosomal gebildeten Diols **27** sind die Bereiche der Protonen H1', H2' und H3' vergrößert dargestellt. Das Signal von H3' wird überlagert vom Wassersignal; die geteilten Signale der beiden H1'-Protonen werden überlagert vom  $^1\text{H}$ -, bzw.  $^{13}\text{C}$ -Satelliten-Signal von DMSO.

Die metabolische Vorstufe von **27** stellt höchstwahrscheinlich Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) dar. Dieses konnte lediglich in lebermikrosomalen Inkubationen mit RLM und nur in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze detektiert werden. In verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup> war **15** jedoch auch in quantifizierbaren, teils sogar beträchtlichen Konzentrationen als Hauptmetabolit nachweisbar.

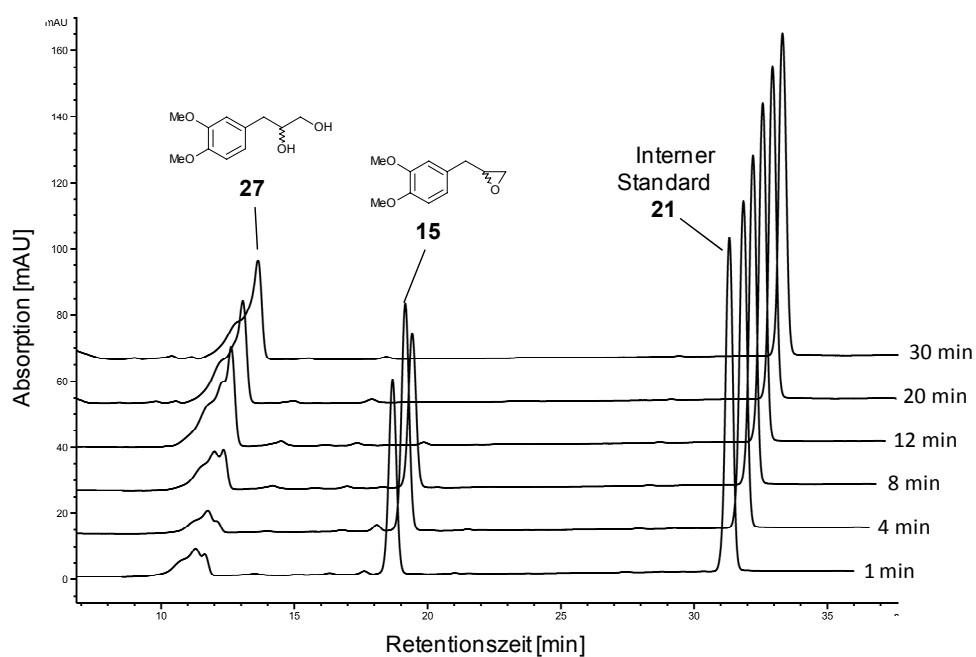


**Abbildung 39.** **A:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von synthetisiertem 2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol (**27**, rot) und des isolierten Peaks (präparative HPLC) im Retentionsbereich von  $t_R \approx 10,5\text{--}12$  min aus der Inkubation von ARLM mit **1** (schwarz). **B, C:** Ausschnittvergrößerungen der Überlagerung der Spektren aus **A** um die Bereiche der chemischen Verschiebung der Seitenkettenprotonen  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_3'$  und  $\text{H}_1'$  zu verdeutlichen. Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21–34.

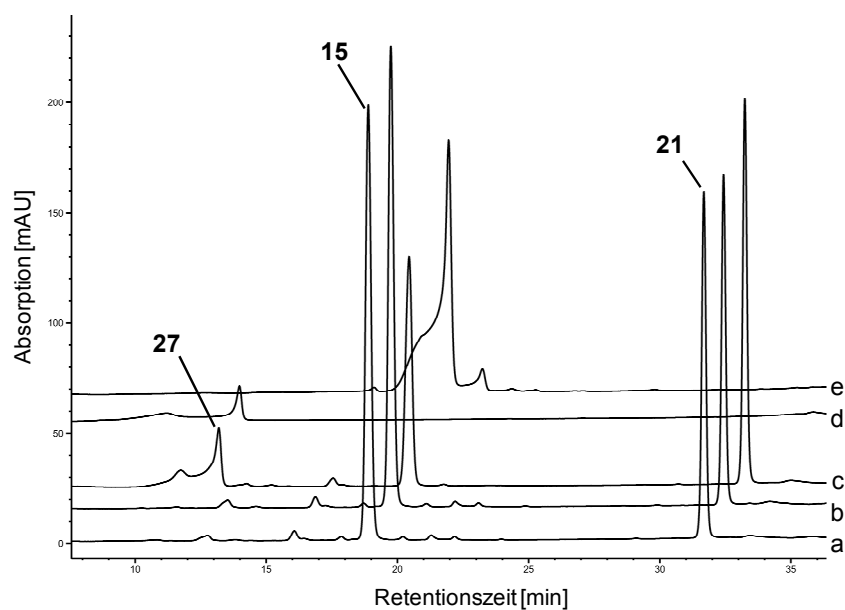
Wahrscheinlich wurde in Lebermikrosomen gebildetes **15** rasch durch die vorhandene mikrosomale Epoxidhydrolase abgefangen, langsam hydrolysiert und als Diol **27** freigegeben. Supersomes<sup>TM</sup> weisen hingegen eine geringe Epoxidhydrolaseaktivität auf, wodurch hier gebildetes **15** über längere Inkubationszeiträume detektierbar blieb.

Synthetisiertes **15** erwies sich als vergleichsweise hydrolysestabil: in wässriger gepufferter Lösung (gleiche Bedingungen wie bei mikrosomalen Inkubationen) konnte über mindestens drei Stunden keine quantifizierbare Hydrolyse detektiert werden. Bei Inkubationen von synthetischem **15** mit ARLM ohne Zugabe von Kofaktoren (außer Wasser), war **15** bereits nach zwölf Minuten nicht mehr nachweisbar und nach 20 Minuten komplett zu **27** hydrolysiert (Abbildung 40). Dass die Reaktion aus Abbildung 40 also von aktivem Enzym abhängig sein musste, zeigten die durchgeführten Kontrollreaktionen mit hitzeinaktivierten Mikrosomen in Abbildung 41.





**Abbildung 40.** Inkubation von synthetisiertem Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**;  $c_{\text{Start}} = 1,0 \text{ mM}$ ) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) zwischen 1 und 30 Minuten. Detektionswellenlänge  $\lambda = 280$ ;  $\lambda_{\text{ref}} = 360 \text{ nm}$ . Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.



**Abbildung 41.** Kontrollreaktionen zur Untersuchung der Stabilität von Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**;  $c = 500 \text{ }\mu\text{M}$ ): **a**) ohne Mikrosomen (30 min); **b**) mit hitzeinaktivierten Mikrosomen (30 min); **c**) mit ARLM ( $t = 5 \text{ min}$ ;  $c_{\text{Protein}} = 2 \text{ mg/ml}$ ); **d**) synthetisiertes 2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol (**27**,  $c = 100 \text{ }\mu\text{M}$ ); **e**) synthetisiertes Epoxid **15** ( $c = 1,0 \text{ mM}$ ). Detektionswellenlängen  $\lambda = 280$ ;  $\lambda_{\text{ref}} = 360 \text{ nm}$ . Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Epoxid **15** und Diol **27** sind in nachfolgender Tabelle 20 zusammengefasst.

**Tabelle 20.** Physiko-chemische Eigenschaften von Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) und 2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol (**27**).

	ME-Epoxid ( <b>15</b> )	ME-Diol ( <b>27</b> )
$t_R$ [min]	18,4–19,2 min	10,9–11,7 min
$m/z^*$ , LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS	<b>195,3</b> ; 151,0; 177,1; 165,0	<b>213,3</b> ; 150,9; 194,9; 177,3; 164,9
$\lambda_{max}$ [nm]	230, 278	230, 280
$\lambda_{min}$ [nm]	216, 250	216, 252

\*die **fett** gedruckten Massen beziehen sich auf das Mutterion. In normaler Schrift sind die bei der Fragmentierung des Mutterions entstandenen Tochterionen in absteigender Signalintensität angegeben.

### Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**)

Neben den bisher besprochenen Metaboliten, bei denen ein oder mehrere Sauerstoffatome in das Substratmolekül **1** eingefügt wurden, konnten in mikrosomalen Inkubationen auch die O-demethylierten Verbindungen **6** und **8** nachgewiesen werden. Beide Verbindungen wurden in allen mikrosomalen Inkubationen detektiert, wobei **6** stets in höheren Konzentrationen vorlag, als **8**. Das Verhältnis von **6** und **8** war in allen LM relativ konstant und betrug durchschnittlich 7,5:1. In den untersuchten Supersomes<sup>TM</sup> konnte **6** immer; **8** lediglich bei Inkubationen mit CYP2C19 nachgewiesen werden. In Tabelle 21 sind die physiko-chemischen Eigenschaften von **6** und **8** wiedergegeben. Die UV-Spektren und erzeugten Massensignale der beiden Phenole sind nahezu identisch. Eine Unterscheidung kann anhand der HPLC-Retentionszeiten ( $\Delta t_R = 0,5$  min) und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch erfolgen, da sich die Signale der H1'-, OH-, H2- und H5-Protonen unterscheiden (s. Abbildung 26, S. 84 und Kap. 7.6.4, S. 276).

**Tabelle 21.** Physiko-chemische Eigenschaften von Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**).

	Eugenol ( <b>6</b> )	Chavibetol ( <b>8</b> )
$t_R$ [min]	24,2–24,8 min	24,7–25,3 min
$m/z^*$ , LC-ESI <sup>+</sup> -MS/MS	<b>163,2</b> ; 147,8	<b>163,2</b> ; 147,8
$\lambda_{max}$ [nm]	228, 280	228, 280
$\lambda_{min}$ [nm]	222, 254	218, 252

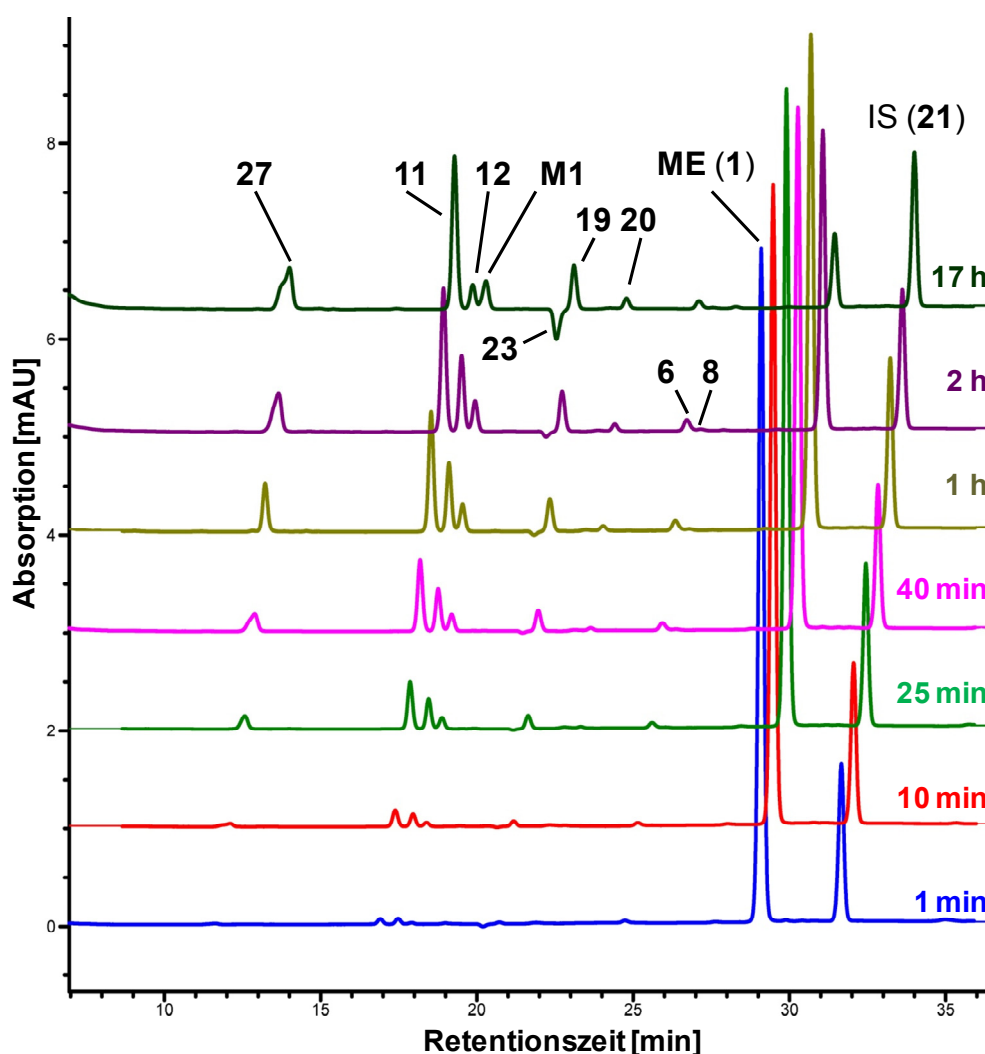
\*die **fett** gedruckten Massen beziehen sich auf das Mutterion. In normaler Schrift sind die bei der Fragmentierung des Mutterions entstandenen Tochterionen in absteigender Signalintensität angegeben.

### Unbekannter Metabolit **M1**

Die Verbindung **M1** bei  $t_R = 18,2$  min erzeugte ein zu **12** fast identisches UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{max} = 213, 259$  nm und einer geschulterten Bande bei 290 nm, was auf eine Verbindung mit propenylischer Seitenkette hindeutet. Die Identität des Metaboliten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abschließend geklärt werden. Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Eine <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Charakterisierung war ebenfalls erfolglos. Die Verbindung wurde in keiner Inkubation mit Methylisoeugenol (**2**) detektiert.

### 5.4.2.2 Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol (**1**) in Lebermikrosomen

Zur Messung von Zeitverläufen wurden Lebermikrosomen mit Methyleugenol (**1**) in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zusammen mit einem NADPH-generierenden System über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert (vgl. Kapitel 7.2.2). Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben aus der Inkubationslösung entnommen, aufgearbeitet und an der HPLC vermessen. Aus den erhaltenen HPLC-Chromatogrammen wurden durch Integration der von identifizierten Metaboliten erzeugten Peaks die Konzentrationen der Verbindungen berechnet. Negativkontrollen ohne den Zusatz von NADPH sowie Inkubationen mit hitzeinaktivierten Mikrosomen lieferten keine detektierbaren Metaboliten.

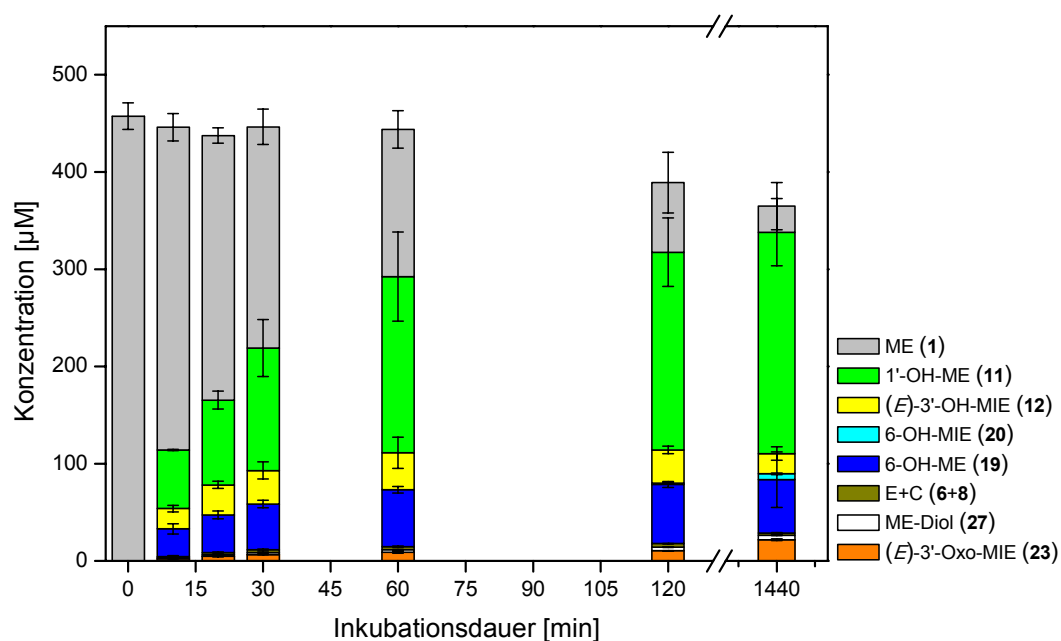


**Abbildung 42.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten zum Zeitverlauf der Inkubation von Methyleugenol (**1**) mit Rinderlebermikrosomen (BLM). Startkonzentration von **1**: 500  $\mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h; Messwellenlänge  $\lambda = 280$  nm;  $c(\mathbf{21}) = 67$   $\mu\text{M}$ . (Die Auswertung dieser Chromatogramme ist in Abbildung 47, Seite 122 gezeigt).

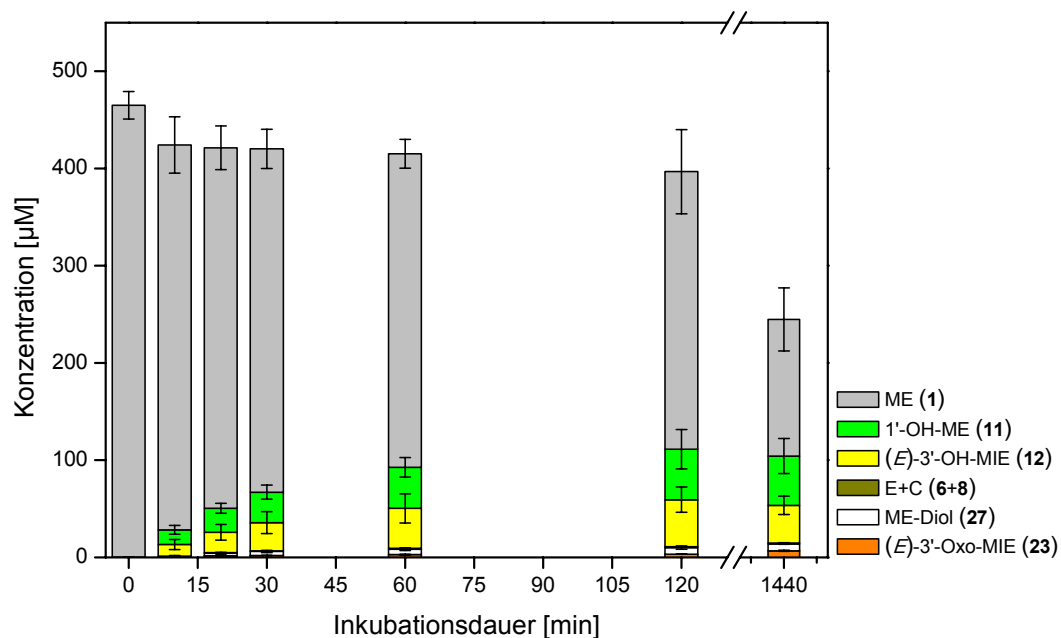
In Abbildung 42 (Seite 115) ist beispielhaft ein Set von Chromatogrammen zum Zeitverlauf der Inkubation von Rinderlebermikrosomen (BLM) mit **1** gezeigt.

In den folgenden Abbildungen (43–46) werden die Zeitverläufe der Inkubationen verschiedener Lebermikrosomen mit **1** in Form gestaffelter Säulendiagramme gezeigt. Damit die Zeitabhängigkeit der Metabolitenbildung unverfälscht wiedergegeben werden kann, ist die Abszisse als echte (unterbrochene) Zeitachse formatiert. Manche Minor-metaboliten wurden in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen. Deshalb sind die zu den Diagrammen gehörenden Daten als Tabelle im Anhang nochmals wiedergegeben. Die Form der gestaffelten Säulen birgt wesentliche Vorteile ggü. der Angabe der Werte als Tabelle (direkte intuitive Erfassbarkeit des Konzentrationsverlaufes der Substanzen über die Zeit) bzw. Linien-Punkt-Diagramm (bessere Übersichtlichkeit, da sich die Konzentrationen und Fehlerbalken von Metaboliten in ähnlichen Konzentrationsbereichen nicht überdecken). Zudem sind jeweils die Summen aller quantifizierten Verbindungen (Metaboliten + Substrat), also die Gesamtwiederfindung, sowie die Summen der Metaboliten (die Summen aller farbigen Säulen) direkt ablesbar und müssen nicht separat angegeben oder berechnet werden. Einzig die Fehler (z. B. Standardabweichung oder Spannweite) letztgenannter Größen sind somit nicht abgebildet. Die wesentlichen Erkenntnisse zum Zeitverlauf sind nachfolgend zusammengefasst.

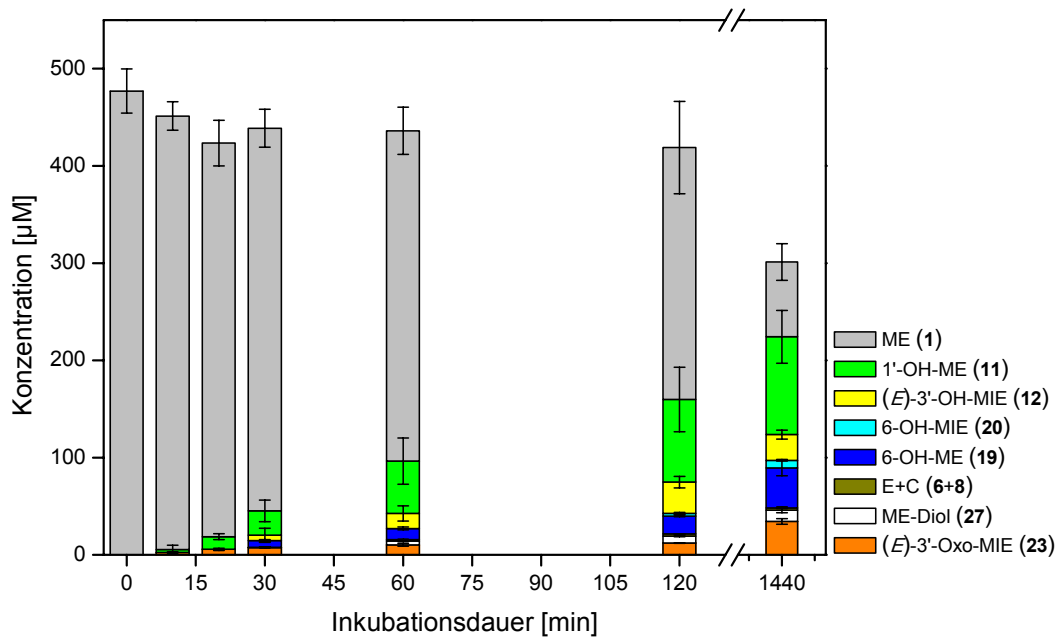
Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen (**ARLM**; Abbildung 43) setzten **1** erwartungsgemäß, wegen ihres hohen CYP-Gehaltes, am schnellsten, mit den höchsten Metabolitenausbeuten und dem breitesten Metabolitenspektrum um. Bereits nach zehnmütiger Inkubation lagen über 25 % der ursprünglichen Konzentration von **1** metabolisiert vor. Nach einer Stunde Inkubation wurden noch 30 % nicht-metabolisiertes **1** detektiert, während rund 58 % des ursprünglich eingesetzten **1** metabolisiert vorlagen. Hauptmetabolit war über den gesamten betrachteten Zeitraum 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**). Die Menge **11** betrug nach einer Stunde 36 %, und erhöhte sich über den weiteren Inkubationsverlauf noch. Die weiteren Hauptmetaboliten stellten 6-Hydroxymethyleugenol (**19**; 11,7 % nach 1 h) und 3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**; 7,6 % nach 1 h) dar. Als Minormetaboliten wurden die O-demethylierten Verbindungen Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**) mit zusammen 0,7 % nach einer Stunde; Methyleugenol-Diol (**27**) mit 0,5 % sowie (E)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) mit 1,8 % nach einer Stunde Inkubationszeit detektiert. Die Konzentration von **23** erhöhte sich im weiteren Verlauf der Inkubation zu Lasten der Konzentration seiner Vorläuferverbindung **12** auf rund 4,4 % nach 24 Stunden, während **12** noch mit 4,2 % detektiert wurde.



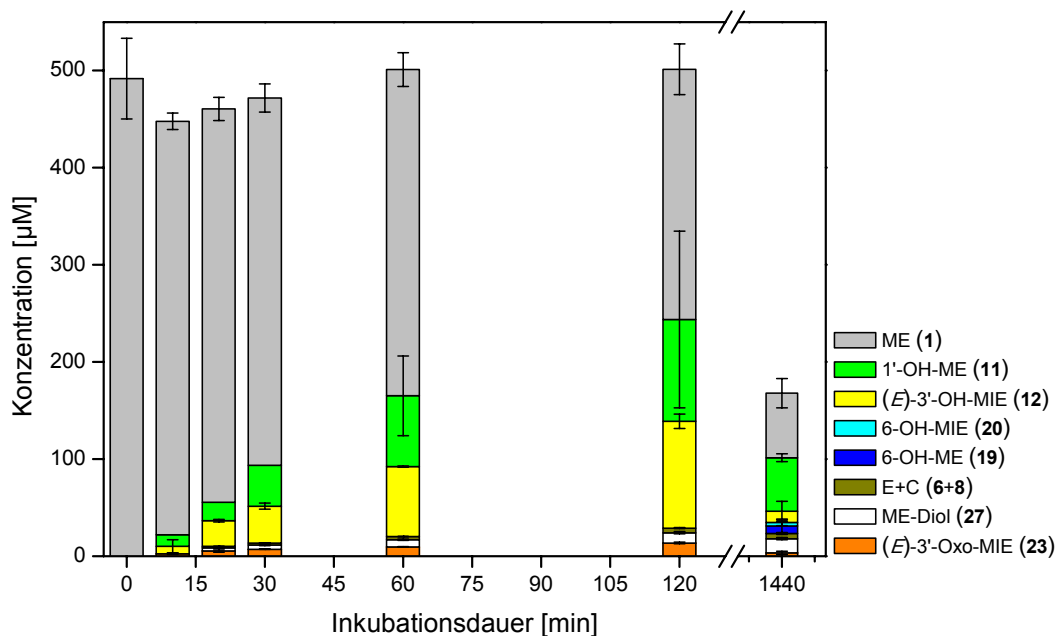
**Abbildung 43.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von Methyleugenol (**1**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (**ARLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Inkubationen mit ARLM verschiedener Tiere.



**Abbildung 44.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von Methyleugenol (**1**) mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (**RLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.



**Abbildung 45.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von Methyleugenol (**1**) mit Rinderlebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit BLM des gleichen Tieres.



**Abbildung 46.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von Methyleugenol (**1**) mit humanen Lebermikrosomen (**HLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit der gleichen Charge gepoolter HLM von 150 männlichen und weiblichen Spendern.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung aller Metaboliten war zu Beginn (0–10 Minuten) sehr schnell, blieb dann zwischen 10–30 Minuten ungefähr linear und erreichte nach einer Stunde Inkubationsdauer ein Plateau, wonach sich die Konzentrationen nur noch wenig veränderten. Eine Ausnahme stellte die Bildung von 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) dar. Dieser Metabolit, welcher ein enzymatisches Isomerisierungsprodukt von **19** darstellt, wurde erst im späteren Inkubationsverlauf erstmals detektiert. Seine Konzentration betrug 0,3 % nach zwei Stunden und steigerte sich nach 24 Stunden auf 1,2 %. Die Gesamtwiederfindung (Metaboliten + Methyleugenol) war im Vergleich zu den Inkubationen von RLM, BLM oder HLM mit **1** über den gesamten betrachteten Inkubationsbereich relativ hoch und sank von initial 92 % auf 73 % nach 24 Stunden ab.

Nicht-induzierte Rattenlebermikrosomen (**RLM**, Abbildung 44) setzten **1** ähnlich schnell, aber in deutlich geringerem Umfang als ARLM um und wiesen ein kleineres Metabolitenspektrum auf. Auch hier wurde nach etwa einer Stunde ein Plateau der Metabolitenbildung erreicht, wonach sich die Konzentrationen und Verhältnisse der Metaboliten untereinander nicht mehr wesentlich veränderten. Nach einer Stunde Inkubationsdauer war mit einer Gesamtwiederfindung von 84 % noch 65 % nicht umgesetztes Methyleugenol detektierbar. Die Hauptmetaboliten stellten die beiden Alkohole **11** und **12** mit rund 8,4 % bzw. 8,3 % dar. Als Minormetaboliten wurden Diol **27** (1,1 %), Aldehyd **23** (0,6 %) sowie die Phenole **6** und **8** mit zusammen 0,2 % bestimmt. Die am Aromaten hydroxylierten Verbindungen **19** und **20** waren bei diesen Inkubationen nicht nachweisbar. Die Bildungsgeschwindigkeit aller Metaboliten war über die ersten 30–60 Minuten nahezu konstant. Während nach 24 Stunden die Konzentration aller Metaboliten fast unverändert im Vergleich zum Zeitpunkt nach zwei Stunden war, sank in diesen Zeitraum die Wiederfindung auf rund 50 % ab.

Rinderlebermikrosomen (**BLM**, Abbildung 45) wiesen das gleiche Metabolitenspektrum wie ARLM auf. Alle dort nachgewiesenen Metaboliten wurden auch von BLM gebildet, wobei auch hier **20** erst nach zwei Stunden quantifizierbar war. Die Konzentrationsverhältnisse der gebildeten Metaboliten waren ebenfalls vergleichbar mit den Verhältnissen bei ARLM. Die Bildungsgeschwindigkeiten waren in BLM jedoch geringer und bis mindestens zwei Stunden nach Inkubationsbeginn linear. Hauptmetabolit nach einer Stunde war auch hier **11** mit 10,8 %. Die weiteren Metaboliten wurden in folgenden Konzentrationen detektiert: 3,1 % **12**; 2,6 % **23**; 2,3 % **19**; 0,8 % **27** und zusammen 0,3 % **6** und **8**. Die Konzentration von **20** stieg von 0,54 % nach zwei Stunden auf 1,6 % nach 24 h. Auch in BLM sank nach 24 h, ähnlich wie bei RLM, die Gesamtwiederfindung im Vergleich zu den früheren Inkubationszeitpunkten stark ab, wobei die Summe der detektierten Metaboliten im gleichen Zeitraum weiter anwuchs.

Die Metabolitenverteilung in Inkubationen **humaner Lebermikrosomen** (HLM, Abbildung 46) mit **1** war qualitativ vergleichbar mit RLM. So wurden in beiden Fällen jeweils die Alkohole **11** und **12** in ungefähr gleichen Konzentrationen zueinander gebildet, aber verglichen mit RLM und BLM in insgesamt höherer Ausbeute von jeweils 14,6 % für **11** bzw. **12** nach einer Stunde Inkubation. Die Konzentration nicht-metabolisierten Substrates betrug zu diesem Zeitpunkt rund 67 %. Minormetaboliten wurden gebildet in Konzentrationen von 2,0 % für Aldehyd **23**, 1,4 % für Diol **27** und 0,7 % für die Summe der Phenole **6** und **8**. Somit lag die Gesamtwiederfindung nach einer Stunde beim Maximalwert von 100 %. Die Phenole **19** und **20** waren erstmals nach 3 h (**19**) bzw. 21 h (**20**) quantifizierbar (Werte nicht abgebildet; siehe Tabelle zu Abbildung 46 im Anhang). Die Bildungsrate aller Metaboliten war über die erste Inkubationsstunde hinweg nahezu konstant. Die Metabolitenkonzentrationen nahmen bis zwei Stunden nach Inkubationsbeginn noch weiter zu und brachen nach 24 h deutlich ein. Während sich die Konzentration von **11** nach 24 h nicht wesentlich verringerte, waren nur noch 2,3 % **12** detektierbar, ohne dass es gleichzeitig zu einem Anstieg des Sekundärmetaboliten von **12**, Aldehyd **23**, kam. Die Gesamtwiederfindung betrug nach 24 h noch rund 45 %.

Die vergleichsweise hohe Konzentration von 5 % DMSO als Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler wurde bei den frühen Untersuchungen der Zeitverläufe gewählt um sicherzustellen, dass sowohl das Substrat als auch alle gebildeten Metaboliten in Lösung gehalten werden konnten und somit detektierbar blieben. Es ist bekannt, dass alle üblichen Lösungsvermittler (Methanol, Ethanol, DMSO und Acetonitril) je nach Konzentration (0,1–5 %) verschiedene CYPs verschieden stark inhibieren können. Beim Studium der Literatur (Supersomes<sup>TM</sup>: Busby *et al.*, 1999 und humane Hepatozyten: Easterbrook *et al.*, 2001b) fällt auf, dass kein Lösungsvermittler ideal ist. DMSO inhibierte in allen Konzentrationen z. B. CYP2C19 und CYP2D6 stärker als MeCN. Demgegenüber inhibierte MeCN CYP1A1 und CYP2B6 in allen Konzentrationen stärker. Bei den hier gezeigten, frühen Untersuchungen zum Metabolismus von **1**, stand, im Gegensatz zu den Messungen der Kinetik, eine eher qualitative Fragestellung im Vordergrund. Deshalb wurde die Möglichkeit einer CYP-Inhibition ggü. dem potentiellen Verlust nicht länger löslicher und somit nicht detektierbarer Metaboliten abgewogen und in Kauf genommen. Ebenfalls wurde bei den hier gezeigten Inkubationen ein Proteingehalt von 2 mg/ml gewählt, um eine höhere Metabolitenausbeute zu generieren. Als Kompromiss wurde schließlich für die weiteren Untersuchungen 1 % MeCN als Lösungsvermittler gewählt und eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Alle weiteren Inkubationen, d. h. Messungen zur Kinetik und alle Messungen von Asaronen und CYPs wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.



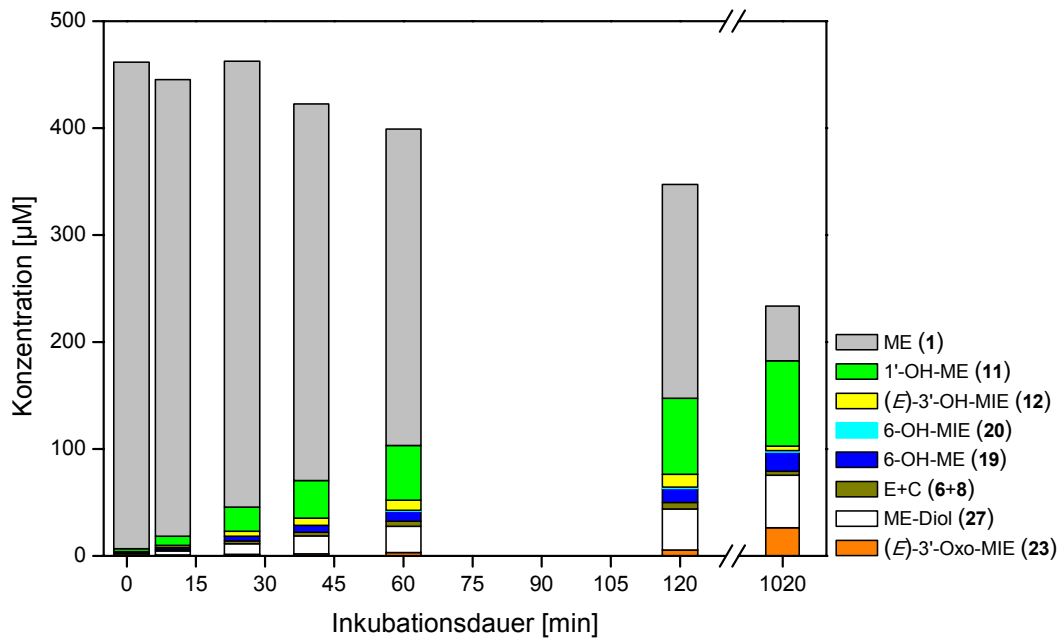
---

Kontrollexperimente mit 1 % MeCN und 1 mg/ml mikrosomalem Protein (statt 5 % DMSO und 2 mg/ml Protein) zeigten keine qualitativen, aber quantitative Unterschiede. In Abbildung 47 ist der Zeitverlauf der detektierbaren Metaboliten von BLM unter diesen Inkubationsbedingungen dargestellt.

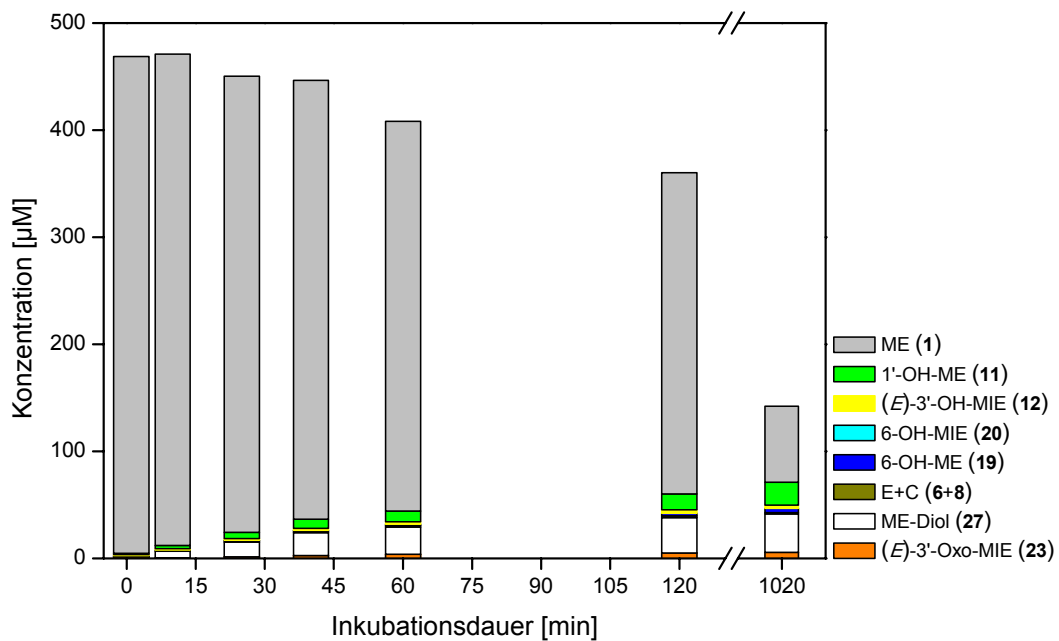
Im direkten Vergleich zu der Inkubation mit DMSO (Abbildung 45) fällt zunächst auf, dass sich die erwartete geringere Umsatzrate (wegen des geringeren Proteingehaltes) mit dem Umsatzgewinn (geringere CYP-Inhibition durch 1 % MeCN) in etwa die Waage halten. Die Linearität der Metabolitengenerierung blieb hier mindestens über die ersten 60 Minuten erhalten und auch nach zwei Stunden war noch kein Erlöschen der Enzymgesamtkativitäten zu verzeichnen. Ebenso wurden die gleichen Metaboliten wie mit DMSO als Lösungsvermittler detektiert.

Quantitative Unterschiede beschränkten sich auf die vermehrte Bildung des Diols **27** unter den veränderten Inkubationsbedingungen. Diese vermehrte Bildung von **27** bei 1 % MeCN statt 5 % DMSO wurde in allen Lebermikrosomen, inklusive HLM, beobachtet. Wie in den folgenden Kapiteln noch ausführlich gezeigt wird, sind an der Bildung von **27** (bzw. **15**) in HLM hauptsächlich CYP2E1 und 1A2 beteiligt. Easterbrook *et al.* (2001b) zeigten, dass die Aktivität von CYP2E1 (gemessen als Chloroxazon-6-Hydroxylase-Aktivität) in humanen Hepatozyten bei Verwendung von 1 % MeCN im Vergleich zur Kontrolle (0,1 % MeCN) > 97 % war, während bereits bei 2 % DMSO die CYP2E1-Aktivität auf 10 % der Kontrolle abnahm. Somit scheint es wahrscheinlich, dass bei der verwendeten DMSO-Konzentration von 5 % eine nicht unbedeutende Inhibierung von CYP2E1 im Vergleich zu der Inkubation mit 1 % MeCN als Lösungsvermittler bzw. Vehikel stattfand. Diese Vermutung wird auch durch den Befund untermauert, dass in RLM unter Anwendung der veränderten Inkubationsbedingungen nun auch die Bildung des Epoxids **15** (vgl. Kap. 5.4.2.4) nachweisbar war.

Abschließend ist in Abbildung 48 der Zeitverlauf der Inkubation von Schweinelebermikrosomen (SLM) mit Methyleugenol (**1**) gezeigt. Hier fällt auf, dass der Gesamtumsatz auch nach 24 Stunden relativ gering war. Außer **20** wurden sämtliche Metaboliten, die bei ARLM nachgewiesen werden konnten, auch von SLM gebildet. Hauptmetabolit war Diol **27** (5,1 % nach 1 h), gefolgt von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**, 2,0 % nach 1 h). Die Konzentrationen der restlichen Metaboliten waren gering.



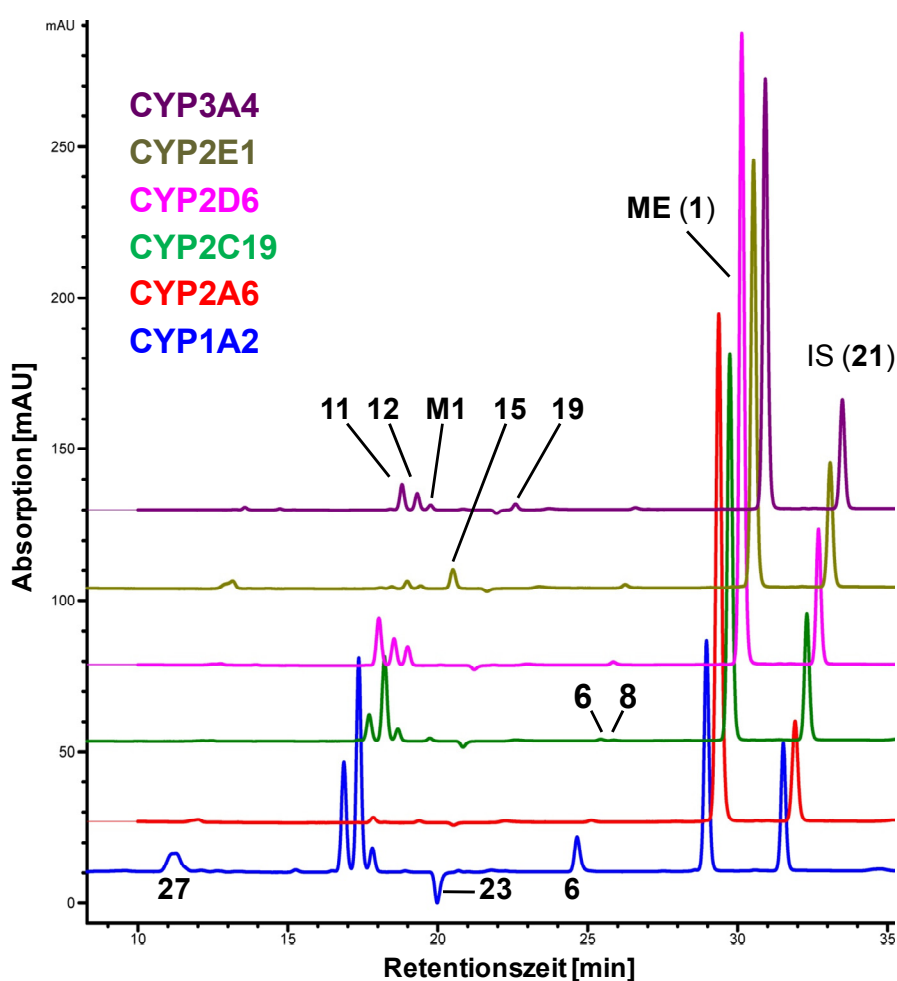
**Abbildung 47.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung der Inkubation von Methyleugenol (**1**) mit Rinderlebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h (Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 42, Seite 115, gezeigt).



**Abbildung 48.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung der Inkubation von Methyleugenol (**1**) mit Schweinelebermikrosomen (**SLM**). Startkonzentration von **1**: 500 µM, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h.

### 5.4.2.3 Metabolismus von Methyleugenol (**1**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

Um herauszufinden, welche CYPs prinzipiell in der Lage sind, Methyleugenol (**1**) zu metabolisieren, wurden CYP1A2-, 2A6-, 2C19-, 2D6-, 2E1- und CYP3A4-Supersomes™ (BD, Heidelberg), untersucht. Dazu wurden die CYPs in einer konstanten Stoffmengenkonzentration von 120 nM mit **1** in zwei Konzentrationen (200  $\mu$ M und 500  $\mu$ M) für 20 und 60 min inkubiert. Beispielhaft sind in Abbildung 49 die Chromatogramme jeweils einer Inkubation der verschiedenen Supersomes™ mit **1** (500  $\mu$ M, 1 h) dargestellt.

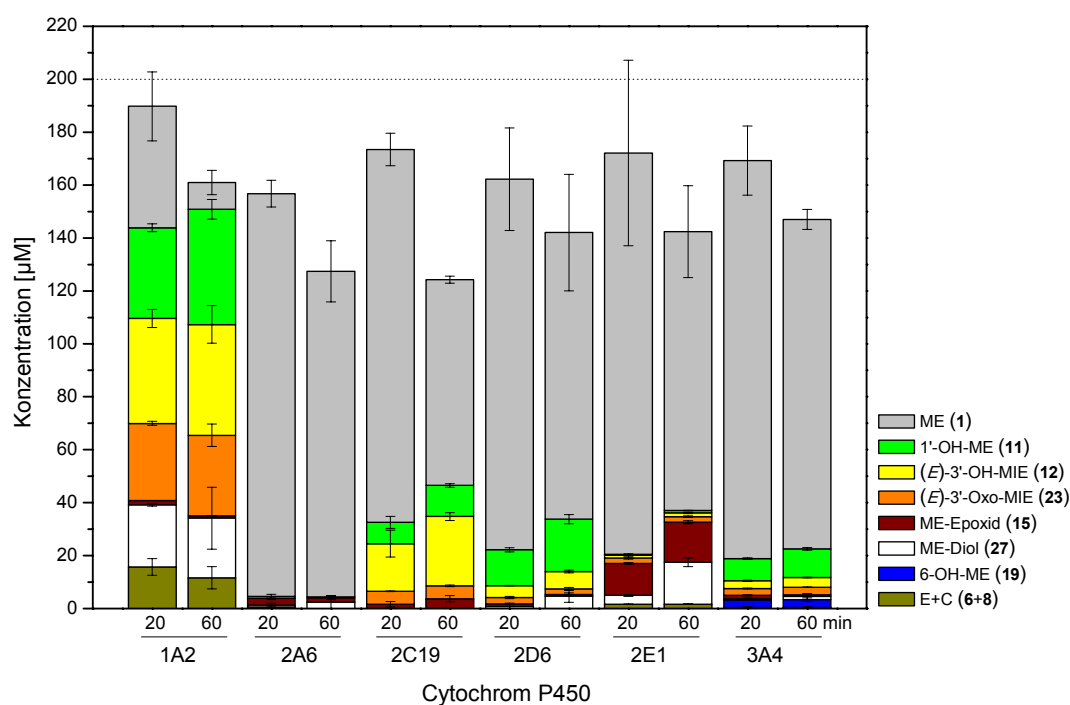


**Abbildung 49.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation verschiedener Supersomes™ (120 nM) mit Methyleugenol (**1**, 500  $\mu$ M; 1 % MeCN) nach 60 min bei  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm). Konzentration des internen Standard (**21**): 67  $\mu$ M.

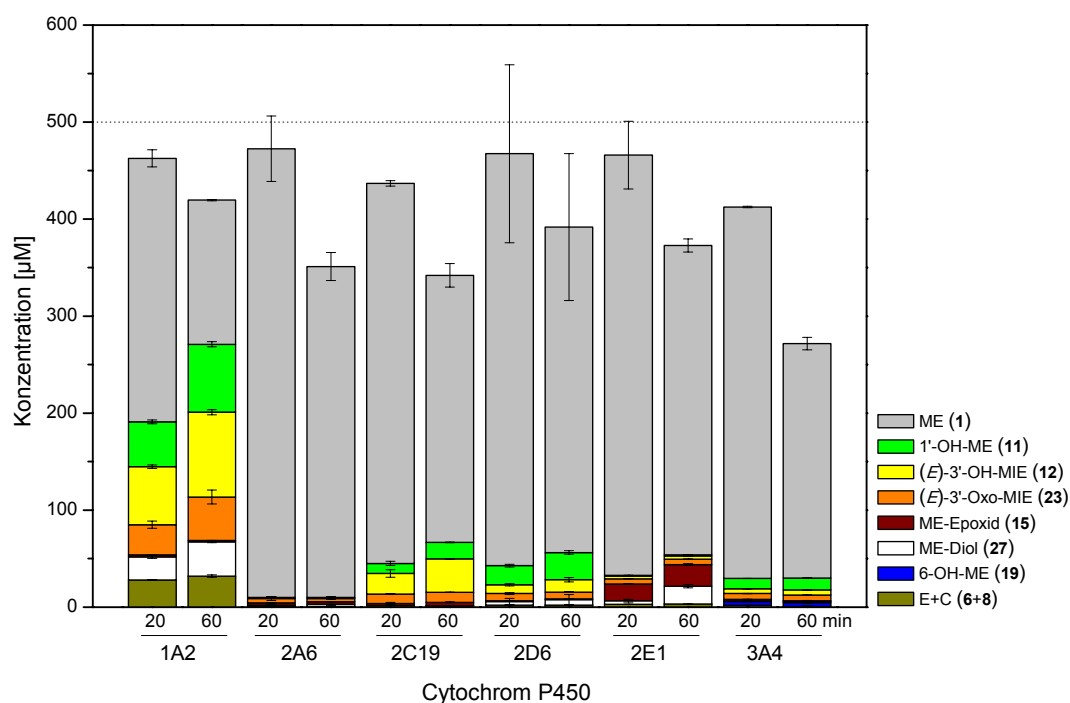
Die aus diesen Chromatogrammen (und weiteren) abgeleiteten Konzentrationen sind in Abbildung 50 (200  $\mu$ M) und Abbildung 51 (500  $\mu$ M) auf Seite 125 zusammengefasst dargestellt. CYP1A2-exprimierenden Supersomes™ waren die die mit großem Abstand aktivsten Enzyme bzw. Enzymgemische in Bezug auf die Umsetzung von **1**, während CYP2A6-Super-

some<sup>TM</sup> unter den gegebenen Bedingungen am wenigsten aktiv waren. Die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Konzentrationen waren sowohl qualitativ, als auch in Hinblick auf die absolut gebildete Metabolitenmenge für alle untersuchten CYPs relativ gering. Die im Folgenden angeführten Metabolitenkonzentrationen beziehen sich, wenn nicht anderslautend erwähnt, auf die 200 µM Inkubationen mit **1** nach 60 Minuten Inkubationsdauer (Abbildung 50).

Im Falle von CYP1A2 wurden nach einer Stunde Inkubationsdauer ( $c_{\text{start}}(\mathbf{1}) = 200 \mu\text{M}$ ) nur noch 5 % des eingesetzten Substrates und 80 % der Startkonzentration metabolisiert detektiert. Dabei wurden alle Metaboliten, die in lebermikrosomalen Inkubationen nachgewiesen wurden, auch von CYP1A2 gebildet: 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**, 22 %) und (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**, 21 %) wurden zu fast gleichen Teilen gebildet, (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**, 15 %), Diol **27** (11 %) und Eugenol (**6**, 5,8 %) wurden in geringeren, aber im Vergleich zu den anderen untersuchten CYPs, immer noch hohen Konzentrationen gebildet. Ferner war im Gegensatz zu den lebermikrosomalen Inkubationen auch Epoxid **15** (0,44 %), die vermutliche Vorstufe von **27**, quantifizierbar. Nur knapp oberhalb der Quantifizierungsgrenze war die Bildung von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) in CYP1A2 nachweisbar. CYP2A6 metabolisierte **1** in äußerst geringem Umfang. Lediglich **23** (0,18 %), **27** (1,2 %) und **15** (0,84 %) konnten in quantifizierbaren Konzentrationen nachgewiesen werden. CYP2C19 bildete vornehmlich die Alkohole **12** (13 %) und **11** (5,9 %) sowie in geringerem Maße Aldehyd **23** (2,5 %). ME-Epoxid (**15**; 1,9 %) wurde ebenfalls detektiert, während das korrespondierende Diol **27** zwar nachweisbar war, dessen Konzentration aber unterhalb des LOQ lag. CYP2C19 war das einzige untersuchte CYP bei dem neben **6** auch detektierbare Mengen Chavibetol (**8**) gebildet wurden, wobei auch dessen Konzentration unterhalb des LOQ lag. CYP2D6 bildete den Alkohol **11** als Hauptmetaboliten (10 %). Alkohol **12** (3,3 %), Epoxid **15** (0,31 %) und Diol **27** (2,4 %) waren ebenfalls nachweisbar. Die erstgenannten Metaboliten waren bereits nach 20 min Inkubationsdauer nachweisbar, während Diol **27** erst nach einer Stunde detektierbar war. Hauptreaktionsweg von CYP2E1 war offensichtlich der Epoxid-Diol-Weg. Nach 20 min konnten 6 % des Epoxids **15**, nach 60 min sogar 7,6 % detektiert werden. Die Konzentration des Diols stieg von 1,7 % nach 20 min auf 7,9 % nach 60 min an. Die Alkohole **11** und **12**, Eugenol und Aldehyd **6** konnten in Konzentrationen um 1 % detektiert werden. Das einzige CYP neben CYP1A2, welches die Ringhydroxylierung von **1** zu **19** katalysierte, war CYP3A4. Hier wurde **19** in einer Konzentration von 1,5 % nach einer Stunde detektiert. Hauptmetabolit war **11** mit 5,4 %. Alkohol **12** und der korrespondierende Aldehyd **23** wurden in Konzentrationen von 1,9 bzw. 1,4 % gefunden, während **6**, **15** als auch **27** in Konzentrationen < 1 % nachweisbar waren.



**Abbildung 50.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit Methyleugenol (**1**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **200 µM 1** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.



**Abbildung 51.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit Methyleugenol (**1**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **500 µM 1** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.

---

#### 5.4.2.4 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol (**1**) in Lebermikrosomen

Für die Bestimmung enzymkinetischer Parameter ist es entscheidend, einen konstanten Inkubationszeitpunkt und eine Proteinkonzentration zu wählen, bei der die Bildungsraten aller Metaboliten linear sind. Im Zusammenhang mit der hier verwendeten Messmethode, welche die Quantifizierung der Metaboliten per HPLC-UV vorsieht, muss dies also ein Kompromiss zwischen möglichst kurzer Inkubationszeit aber gleichzeitig hinreichend langer Inkubationsdauer sein, damit genügend hohe Metabolitenkonzentrationen erzielt werden, welche noch zuverlässig quantifiziert werden können.

Die Zeitverläufe der Inkubationen von Lebermikrosomen mit Methyleugenol (**1**) bestätigten, dass die Bildung der Metaboliten nach 20 min linear ist. Diese Untersuchungen wurden bei vergleichsweise hohen Substratkonzentrationen (500  $\mu$ M) durchgeführt. Für die Untersuchung der Kinetik von **1** und aller weiteren Substanzen wurde die Proteinkonzentration zur Sicherstellung der Linearität auch bei geringeren Substratkonzentrationen, von 2 mg/ml auf 1 mg/ml verringert und 1 % MeCN statt 5 % DMSO als Lösungsvermittler verwendet. Die genauen Vorgehensweisen zur experimentellen Bestimmung und mathematischen Auswertung der enzymkinetischen Parameter wurden in Kap. 5.4.1.6 sowie 7.5.7 ausführlich beschrieben.

In Tabelle 22 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von Methyleugenol (**1**) mit Lebermikrosomen dargestellt. Wegen der großen Datenmenge und der damit verbundenen Unübersichtlichkeit wurde auf die Angabe sämtlicher statistischen Daten des verwendeten Modellierungsmodells (Michaelis-Menten, Hill oder Eadie-Hofstee); und ggf. den Wert des Hill-Koeffizienten  $n_H$  verzichtet. Alle angepassten Kurven, aus denen die verschiedenen Wertepaare erhalten wurden, sind unter Angabe der statistischen Parameter im elektronischen Anhang dieser Arbeit zu finden.

Betrachtet man zunächst die apparenten enzymkinetischen Parameter zum Gesamtmetabolismus, findet man, bezogen auf  $E_{cat}(app)$  folgendes Ranking:

$$ARLM > RLM > BLM > HLM > SLM.$$

Der bereits bei den Untersuchungen zum Zeitverlauf beobachtete induktive *shift* zwischen RLM und ARLM zu Gunsten der Bildung von **11** und **19** und zu Lasten von **12** wird durch kinetische Daten untermauert. So beträgt das  $E_{cat}$ -Verhältnis von **11:12** in RLM 0,83 und ist bei ARLM mit 16,7 rund zwanzigmal höher. Auch kehren sich die  $K_M$ -Werte beinahe um.

Während RLM mit  $K_M = 96,7$  (**12**) und 206 (**11**) eine deutlich höhere Affinität zum 3'-Alkohol aufweist, sind die  $K_M$ -Werte bei ARLM fast identisch, jedoch invertiert mit  $K_M = 84,9$  (**11**) und 198 (**12**). Die zweithöchste katalytische Effizienz in ARLM wurde für die Bildung von **19** bestimmt (6,54), welche eine hohe maximale Reaktionsgeschwindigkeit, aber einen relativ hohen  $K_M$ -Wert aufweist.

**Tabelle 22.** Bildungskinetische Parameter für die quantifizierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von Methyl Eugenol (**1**) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	1'-OH-ME (11)	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	ME-Epoxid (15)	ME-Diol (27)	E, C (6, 8)	6-OH-ME (19)	Summe Metaboliten
ARLM	$v_{\max}$ (app)	3,88	0,54	6E+13	nq	0,54	1,16	3,37	8,90
	$K_M$ (app)	84,9	198	8E+16		261	1172	515	180
	$E_{\text{cat}}$ (app)	45,6	2,73	0,74		2,07	0,99	6,54	49,6
RLM	$v_{\max}$ (app)	1,72	1,00	0,39	neg	1,75	0,22	0,21	5,23
	$K_M$ (app)	206	96,7	652		122	308	768	172
	$E_{\text{cat}}$ (app)	8,36	10,4	0,60		14,3	0,71	0,27	30,4
BLM	$v_{\max}$ (app)	1,64	0,66	0,67	nq	0,85	0,33	0,31	4,08
	$K_M$ (app)	140	490	1836		135	505	180	208
	$E_{\text{cat}}$ (app)	11,7	1,35	0,36		6,28	0,65	1,70	19,7
SLM	$v_{\max}$ (app)	0,63	0,27	0,19	nq	1,75	1E+13	0,05	3,69
	$K_M$ (app)	245	512	265		255	8E+16	187	395
	$E_{\text{cat}}$ (app)	2,57	0,53	0,70		6,86	0,16	0,26	9,34
HLM	$v_{\max}$ (app)	1,00	0,77	4,14	nq	0,60	0,31	3E+13	2,91
	$K_M$ (app)	285	400	10750		41,7	207	3E+17	231
	$E_{\text{cat}}$ (app)	3,50	1,92	0,39		14,4	1,49	0,10	12,6

Inkubationsbedingungen: Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **1**: 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

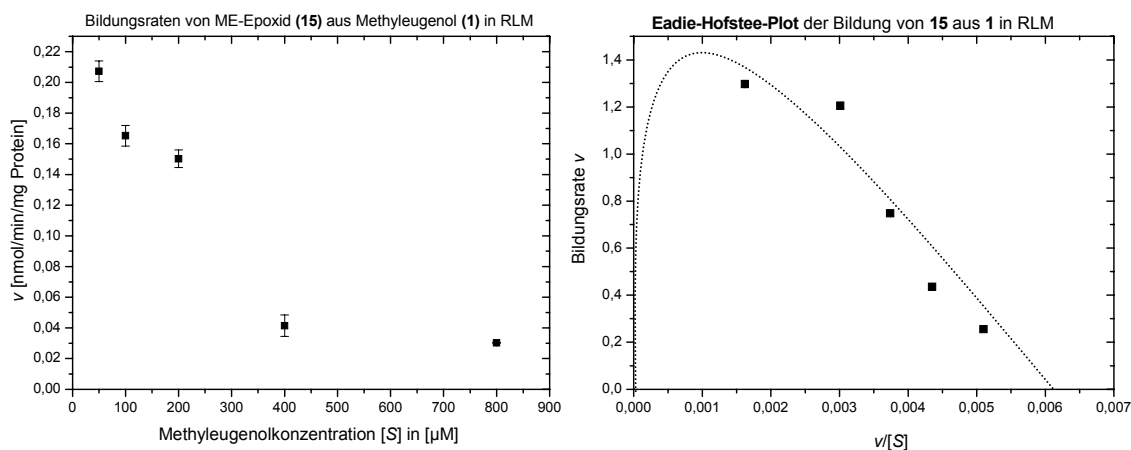
$v_{\max}$  (app): maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

nq: nicht quantifizierbar

neg = negative Steigung der  $v/[S]$  Datenpunkte

RLM waren die einzigen untersuchten Lebermikrosomen, bei denen die Bildung des Epoxids **15** quantifizierbar war. Aufgrund der negativen Steigung der erhaltenen Werte im  $v/[S]$ -Diagramm (Abbildung 52, links) konnten jedoch keine enzymkinetischen Parameter abgeleitet werden. Anhand des Eadie-Hofstee-Plots (Abbildung 52, rechts) kann  $v_{\max}$  auf 1,3–2,0  $\text{nmol } \mathbf{15} \text{ min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$  geschätzt werden, was ungefähr mit der von **27** (1,75) korreliert. Die negative Steigung impliziert einen kleinen  $K_M$ -Wert, also eine hohe Affinität für die Katalysereaktion, was wiederum bedeutet, dass bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen diese Reaktion an Bedeutung gewinnt. Die kinetischen Daten für die Bildung von Diol **27** bestätigten diese Annahme. Somit konkurrieren zwei potentiell detoxifizierende Metabolismuswege (**12**, **15/27**) mit der Bildung des proximalen Kanzerogens **11**. Alle weiteren beobachteten Reaktionen spielen aus kinetischer Sicht eine deutlich untergeordnete Rolle, zumindest in *in vivo*-relevanten Konzentrationen.



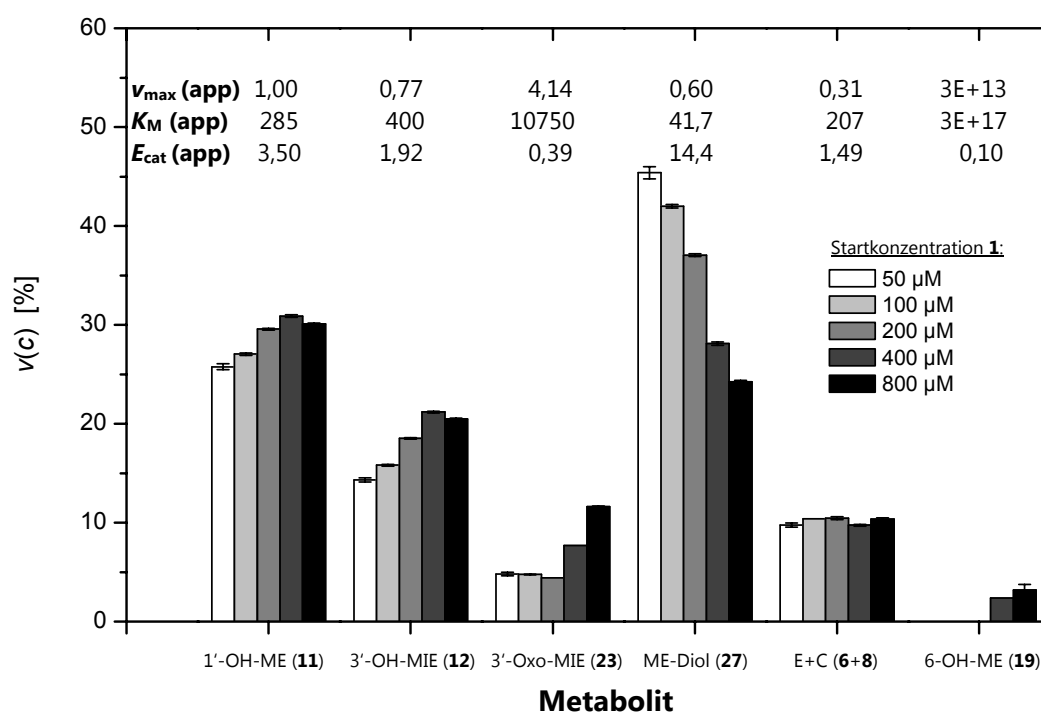
**Abbildung 52.** Bildungenraten für die Reaktion von **1** zu **15** in RLM in linearer Auftragung (links) und Eadie-Hofstee-Plot (rechts). Die gepunktete Linie im Eadie-Hofstee-Plot zeigt den typischen Verlauf einer Substrat- bzw. Produkt-Inhibition. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.

BLM zeigten ein ähnliches Bild wie ARLM, wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten generell geringer waren. Ausgeprägter als bei ARLM war bei BLM lediglich die Bildung von **27**, was sich in einer größeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und einem kleineren  $K_M$ -Wert zeigt. SLM wiesen im Vergleich zu den anderen LM die geringste katalytische Effizienz bei der Bildung von **12** (0,53) auf, was rund 5 % der Effizienz von RLM entspricht. Die größte  $E_{\text{cat}}$  bei SLM wurde für die Bildung von Diol **27** (6,9) bestimmt. BLM und SLM katalysierten die Bildung von **19** mit geringer maximaler Geschwindigkeit, aber vergleichsweise hoher Affinität ( $K_M = 180$  bzw. 187), so dass es sich bei diesem Reaktionsweg um eine wichtige Reaktion bei geringen Substratkonzentrationen handeln könnte. HLM wiesen die höchste  $E_{\text{cat}}$  (14,4) für die Bildung von Diol **27** auf, wobei insbesondere der sehr niedrige  $K_M$  von 41,7 dafür spricht, dass diesem Weg eine bedeutende Rolle für die Detoxifizierung bei niedrigen Konzentrationen von **1** zukommt. Die  $E_{\text{cat}}$  für die Bildung des proximalen Kanzerogens **11** aus **1**, war zwar rund viermal geringer als die des Diols, jedoch wurde **11** am zweiteffizientesten und mit der höchsten maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (1,00) gebildet. **12** wies eine ähnlich hohe  $v_{\text{max}}$ , jedoch auch einen höheren  $K_M$ -Wert (400) auf, was eine verminderte Bedeutung dieser Reaktion bei kleinen Konzentrationen impliziert. Die anschließende Oxidation von **12** zu **23** erfolgte durch humane mikrosomale Enzyme zwar sehr schnell ( $v_{\text{max}} = 4,14$ ), jedoch mit geringer Affinität ( $K_M = 11 \text{ mM}$ ), wobei hier die vorgelagerte Reaktion von **1** zu **12** im mathematischen Modell zur Beschreibung der Kinetik nicht berücksichtigt wurde und somit die resultierende katalytische Effizienz der Nettoreaktion **12**  $\rightarrow$  **23** wahrscheinlich effizienter abläuft, als es die erhaltenen apparenten Daten wiedergeben. Ebenfalls relativ potent wurde die Bildung der O-demethylierten Produkte **6** und **8** katalysiert, wobei die absolute Gesamtausbeute dieser Metaboliten klein war. Insgesamt scheinen alle potentiell detoxifi-



zierenden Reaktionswege bei geringen Substratkonzentrationen an Bedeutung zu gewinnen, ohne jedoch die Bildung des proximalen Kanzerogens zu nivellieren.

$K_M$  als Maß für die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. in der Interpretation als Maß der Affinität des Enzyms zur jeweiligen Produktbildung und  $E_{cat}$  als Maß für den Beitrag einer Reaktion bei sehr kleinen Substratkonzentrationen sind intuitiv und u. U. in Hinblick auf den Gesamtmetabolismus schlecht zu erfassen. Abbildung 53 soll diesen Zusammenhang am Beispiel der für HLM erhaltenen Daten verdeutlichen. Es wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Metaboliten bei der jeweiligen Substratkonzentration  $v(c)$  aus den Einzelmessungen berechnet und daraus die prozentuale Beteiligung der einzelnen Reaktionen an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit von **1** berechnet.



**Abbildung 53.** Abhängigkeit der Metabolitenbildungsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration: Prozentualer Beitrag der gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten bei gegebener Substratstartkonzentration  $v(c)$  der einzelnen Metaboliten an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit ( $\Sigma v(\text{alle identifizierten Metaboliten})/v(\text{Metabolit } i)$ ) der Reaktionen von HLM mit Methyl-eugenol (**1**). Oben: kinetische Parameter  $v_{max}$ ,  $K_M$  und  $E_{cat}$ . Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{max}$  (app): max. apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{cat}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{max}$  (app)/ $K_M$  (app); [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

Anhand dieser Abbildung wird ersichtlich, dass die relative Reaktionsgeschwindigkeit von Diol **27** mit steigender Substratkonzentration abnimmt. Dies korreliert mit dem geringen  $K_M$ -Wert (also der hohen Affinität zu dieser Reaktion) aber auch geringeren  $v_{max}$  im Vergleich zu den anderen Metaboliten. Die Bildungsgeschwindigkeiten der Seitenkettenalkohole **11** und

**12** sowie von Aldehyd **23** und Phenol **19** steigen hingegen tendenziell mit der Substratkonzentration, während die Bildungsgeschwindigkeit der O-demethylierten Verbindungen **6+8** keine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit aufweist.

Die in Tabelle 22 für HLM gezeigten Daten sind „echte“ Messwerte. Eine alternative Vorgehensweise, den Einfluss der Substratkonzentration auf die Metabolitenverteilung zu untersuchen, ist die bereits in Kap. 5.4.1.6 angesprochene Berechnung der prozentualen Werte von  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$  am Gesamtmetabolismus. Die so transformierten Werte sind nachfolgend in Tabelle 23 für Lebermikrosomen gezeigt. „ $v_{\max} \%$ “ und „ $E_{\text{cat}} \%$ “ bezeichnen dabei die prozentuale Beteiligung von  $v_{\max}$  bzw.  $E_{\text{cat}}$  der Einzelreaktion an der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit bzw. -clearance, also  $\Sigma v_{\max}(\text{alle Metaboliten})/v_{\max}(\text{Metabolit } i)$  bzw.  $\Sigma E_{\text{cat}}(\text{alle Metaboliten})/E_{\text{cat}}(\text{Metabolit } i)$ .

**Tabelle 23.** Prozentuale bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von Methyleugenol (**1**) mit Lebermikrosomen.

LM	Parameter	1'-OH-ME (11)	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	ME-Epoxid (15)	ME-Diol (27)	E, C (6, 8)	6-OH-ME (19)
ARLM	$v_{\max}(\text{app})$	41	6	nb	nq	6	12	35
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	78	5	1		4	2	11
RLM	$v_{\max}(\text{app})$	32	19	7	neg	33	4	4
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	24	30	2		41	2	1
BLM	$v_{\max}(\text{app})$	37	15	15	nq	19	7	7
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	53	6	2		29	3	8
SLM	$v_{\max}(\text{app})$	22	9	6	nq	61	nb	2
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	23	5	6		62	1	2
HLM	$v_{\max}(\text{app})$	37	29	nb	nq	22	12	nb
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	16	9	2		66	7	0

$v_{\max}(\text{app})$ : prozentuale maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit

$E_{\text{cat}}(\text{app})$ : prozentuale „apparente katalytische Effizienz“

nq: nicht quantifizierbar

neg = negative Steigung der  $v/[S]$  Datenpunkte

nb: Wert wurde bei der Berechnung (wegen nicht-realer Enzymsättigung) nicht berücksichtigt

Summen  $\neq$  100 % sind rundungsbedingt.

Die berechneten prozentualen Werte bestätigen in guter Übereinstimmung die Trends für die Konzentrationsabhängigkeit der Metabolitenbildung, die anhand der Messungen am Beispiel von HLM (Abbildung 53) erhalten wurden. So liegen beispielsweise die Werte für die Bildung des Diols **27** in HLM zwischen  $E_{\text{cat}} \% = 66$  und  $v_{\max} \% = 22$ , was bedeutet dass im Falle sehr hoher Methyleugenolkonzentrationen (minimal) 22 %, im Falle sehr geringer Konzentrationen (maximal) 66 % **1** zu Diol **27** umgesetzt werden. Die gemessenen prozentualen Werte im Konzentrationsbereich von 50–800  $\mu\text{M}$  **1** lagen zwischen 25 % ( $c_{\text{Start}} = 0,8 \text{ mM}$ ) bis 45 %

( $C_{\text{start}} = 50 \mu\text{M}$ ). Ferner belegen die Daten die geringe Abhängigkeit der Bildung der Metaboliten **6+8** von der Substratkonzentration sowie eine zu vernachlässigende Bildung von **19** und **23** bei kleinen Substratkonzentrationen. Im Falle der Bildung von **23** ist jedoch wie bereits erwähnt die vorgelagerte Reaktion von **1** zu **12** nicht im Modell abgebildet und die Beteiligung anderer Enzyme, z. B. Alkoholdehydrogenasen *in vivo* zu beachten. Somit ist anzunehmen, dass bei (geringen) humanrelevanten Konzentrationen von **1** die Bildung des Diols **27** zwar dominiert, aber immer noch mindestens 16 % der Konzentration (oder Dosis) zum proximalen Kanzerogen **11** metabolisiert wird. Oder anders ausgedrückt; es gibt keinen kinetischen Anhaltspunkt dafür, dass in HLM für  $[S] \rightarrow 0$  kein **11** gebildet wird.

#### 5.4.2.5 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol (**1**) in Cytochrom P450-Enzymen und deren Beteiligung in HLM

In Tabelle 24 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von Methyleugenol (**1**) mit Supersomes<sup>TM</sup> dargestellt. Dort wurde ebenfalls auf die Angabe sämtlicher statistischen Daten verzichtet. Alle angepassten Kurven sind im elektronischen Anhang dieser Arbeit zu finden. Diese enzymkinetischen Daten der einzelnen CYPs sind die originalen, „unverfälschten“ Werte. Auch bei den kinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen wäre eine Veranschaulichung mit prozentualen Werten von  $v_{\text{max}}$  und  $E_{\text{cat}}$ , wie es im Falle der lebermikrosomalen Daten getan wurde, nach Multiplikation mit den entsprechenden RAFs möglich, um einen Eindruck über deren konzentrationsabhängige Beteiligung an der Bildung der Metaboliten von **1** zu erhalten. Allerdings ist die Menge der Datenpunkte, im Gegensatz zu den lebermikrosomalen Inkubationen, im Falle der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen häufig geringer, so dass die Güte der resultierenden Fits i. A. schlechter ist. Dadurch müssten Werte/Wertepaare häufiger, nach mehr oder weniger subjektiven Kriterien, aus der Berechnung ausgeschlossen werden, was wahrscheinlich zu einer Verfälschung, zumindest aber zu einer Verzerrung der Daten führen würde. Da dennoch der Einfluss von  $K_M$  auf die Konzentrationsabhängigkeit der Metabolitenbildung in HLM besser veranschaulicht werden soll, als es anhand der absoluten kinetischen Parameter möglich ist, wurden die Daten zur besseren Visualisierung folgendermaßen transformiert: Aus den Aktivitäten der einzelnen CYPs bei den verschiedenen Substratkonzentrationen wurden für jeden Metaboliten die  $v_{\text{CYP}_i(\text{HLM})_{\text{berechnet}}}$ -Werte berechnet, indem diese mit den jeweiligen RAF-Werten multipliziert wurden. Diese Werte wurden als gestaffelte Säule, aufgeschlüsselt nach Metaboliten und beteiligten CYPs aufgetragen (vgl. Kapitel 5.4.1.7). Zum direkten Vergleich wurden die in HLM bestimmten Aktivitäten, aufgeschlüsselt nach den gebildeten

Metaboliten daneben abgebildet. Zusätzlich wurde die berechnete relative Beteiligung der untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus in Abhängigkeit der Substratkonzentration dargestellt (Summe aller Metaboliten). In Abbildung 54 sind die so transformierten Daten dargestellt.

**Tabelle 24.** Bildungskinetische Parameter für die quantifizierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von Methyleugenol (**1**) mit verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup>.

CYP	Parameter	1'-OH-ME (11)	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	ME-Epoxid (15)	ME-Diol (27)	E, C (6, 8)	6-OH-ME (19)	Summe Metaboliten
CYP1A2	$k_{cat}$	18,9	26,6	39,4	0,86	9,46	11,2	0,70	88,9
	$K_M$	112	143	679	124	105	168	197	143
	$E_{cat}$	169	185	58,1	6,90	89,9	66,6	3,55	623
CYP2A6	$k_{cat}$	nd	nd	nd	0,83	nd	nd	nd	s. <b>15</b>
	$K_M$				0,49				
	$E_{cat}$				1697				
CYP2C19	$k_{cat}$	7,20	13,5	50,6	1E+14	nd	1E+15	nd	1E+15
	$K_M$	400	364	1117	8E+16		6E+17		3E+16
	$E_{cat}$	18,0	37,1	45,2	1,35		2,02		46,1
CYP2D6	$k_{cat}$	8,73	10,1	2E+05	3,17	nd	5E+14	nd	62,5
	$K_M$	121	903	2E+05	2350		2E+17		1134
	$E_{cat}$	72,3	11,1	864	1,35		2,18		55,1
CYP2E1	$k_{cat}$	0,16	2E+15	6716	2,78	1,02	4E+13	nd	8E+14
	$K_M$	112	9E+17	5844	30	37,3	3E+16		4E+16
	$E_{cat}$	1,41	2,35	1149	92,1	27,3	1,62		18,3
CYP3A4	$k_{cat}$	4,09	2E+15	2E+04	0,83	1,21	1E+04	3E+14	1E+15
	$K_M$	85,7	3E+17	6E+03	132	436	6E+04	7E+16	4E+16
	$E_{cat}$	47,7	5,96	2793	6,32	2,78	206	4,69	35,8

Inkubationsbedingungen: CYP-Konzentration jeweils 120 nM; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **1**: 50, 100, 200, 500, 800  $\mu$ M in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

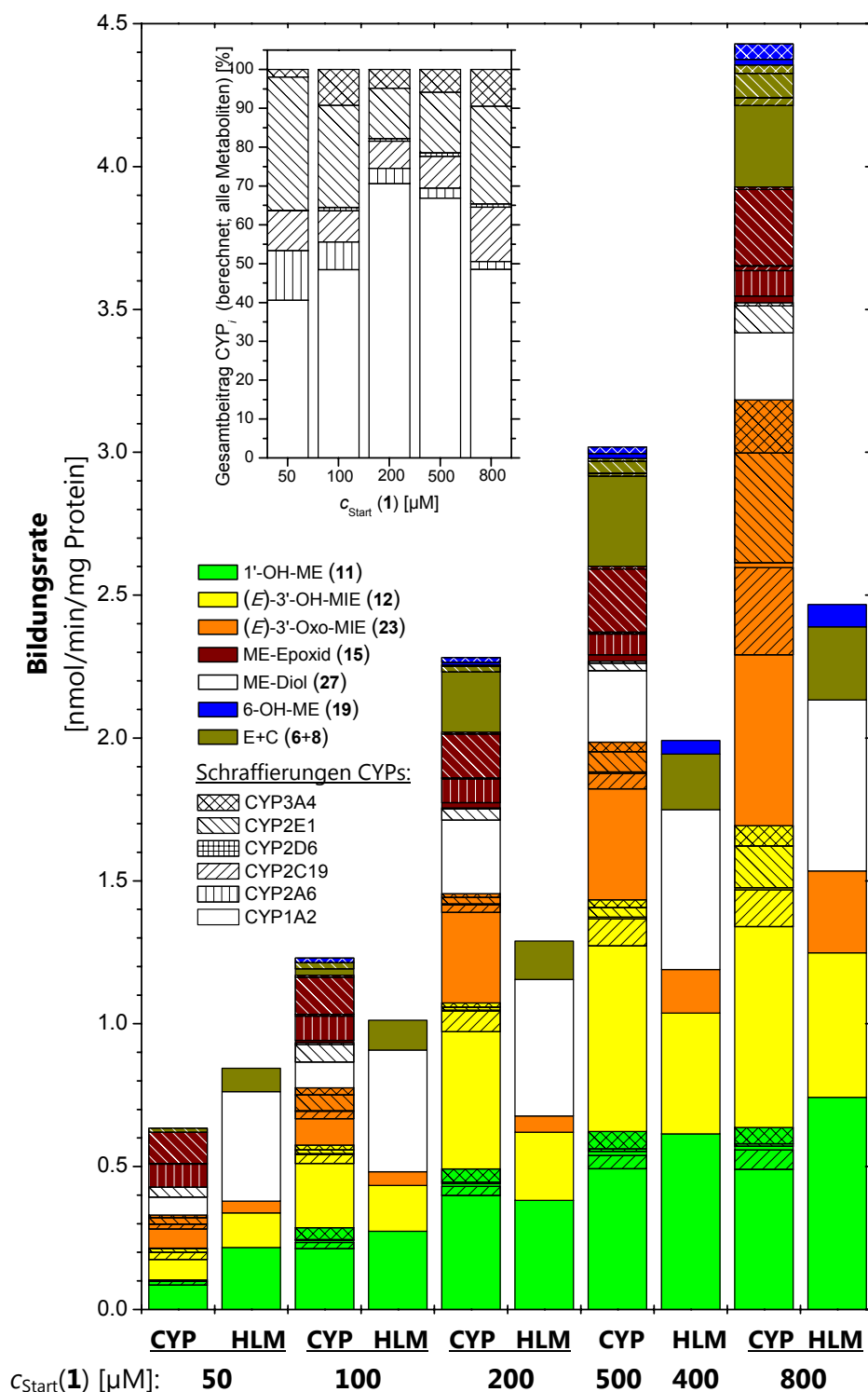
$K_M$ : (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu$ M]

$k_{cat}$ : Wechselzahl; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{nmol Cytochrom P450})^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]

$E_{cat}$ : „katalytische Effizienz“ =  $k_{cat}/K_M$ ; [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];

nd: Metabolit nicht detektierbar

Als erstes Ergebnis dieser Darstellung (Abbildung 54) erkennt man, dass die berechneten Werte aus den CYP-Inkubationen ab einer Substratkonzentration von 100  $\mu$ M in der Summe überprädiktiv sind. Dies beruht hauptsächlich auf den übermäßig vorhergesagten Bildungsraten von **12** und **23**. Der Grund für die Überprädiktivität der Bildungsraten von **12** und **23** könnte auf eine etwaige Weitermetabolisierung durch weitere Enzyme in HLM zu nicht mehr detektierbaren, stark hydrophilen Metaboliten, zurückzuführen sein, die bei den Mikrosomen aus Insektenzellen nicht vorhanden sind. Geringer hervorgesagt wird die Bildung von Diol **27**. Epoxid **15** war in HLM nicht quantifizierbar, was für eine schnelle Hydrolyse des gebildeten Epoxids spricht. Die vorhergesagte Summe von Diol **27** + Epoxid **15** stimmt hingegen in sehr guter Näherung mit der realen Situation in HLM überein. Eine hervorragende Prädiktivität besitzt das Modell weiterhin in Bezug auf die Bildung des proximalen Kanzerogens **11** sowie der phenolischen Metaboliten **6**, **8** und **19**.

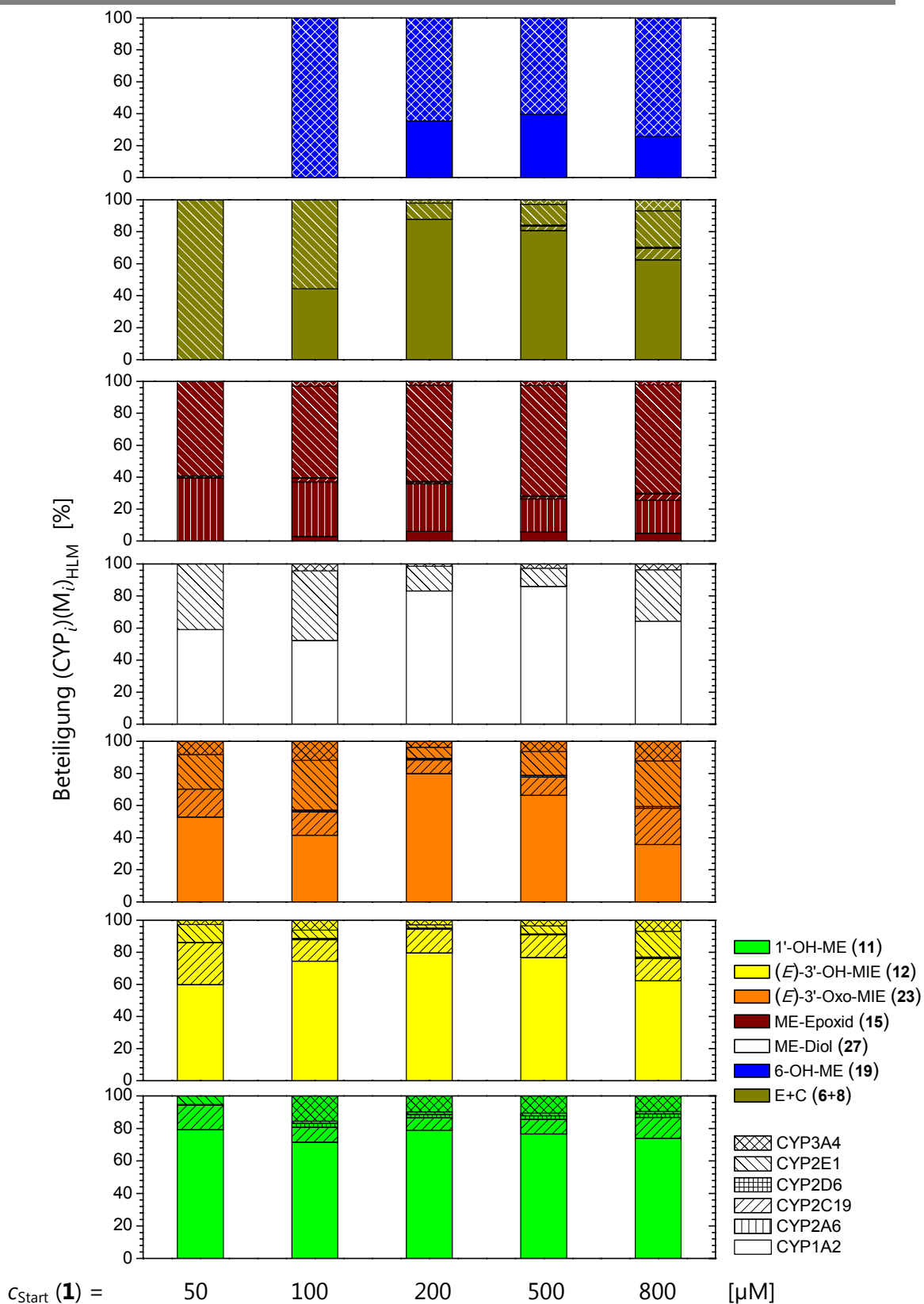


**Abbildung 54.** Vergleich der gemessenen (HLM) und der aus kinetischen Daten der Supersomes™-Inkubationen berechneten Bildungsrate ( $\text{CYP}; v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)$ ) der Metaboliten von Methyleugenol (**1**) in humanen Lebermikrosomen. Insert oben links: Berechnete prozentuale Beteiligung aller untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von **1** (Beteiligung  $(\text{CYP}_i)_{\text{HLM}}$ ). Die Berechnungen erfolgten nach denen in Kap. 5.4.1.7 aufgeführten Methoden. Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweite bzw. Standardabweichung) entfernt.

Als weiteres Ergebnis kann aus den Daten in Abbildung 54 geschlossen werden, dass mit den untersuchten sechs humanen CYPs wahrscheinlich die wichtigsten Phase-I-Enzyme der mikrosomalen Reaktion von **1** abgedeckt wurden und andere CYPs in HLM für die Umsetzung von **1** vermutlich eine untergeordnete Rolle spielen.

In Insert von Abbildung 54 ist die prozentuale Beteiligung der untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von **1** gezeigt. Dabei erkennt man, dass in den untersuchten Konzentrationsbereichen CYP1A2 die stärkste Beteiligung am Metabolismus von **1** zukommt, während CYP2D6 sowie CYP2A6 wenig beitragen.

Neben der quantitativen Vorhersage der Bildungsgeschwindigkeiten einzelner Metaboliten erkennt man ferner die berechneten quantitativen Beiträge der einzelnen CYPs. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Beteiligung der verschiedenen CYPs deutlicher darzustellen, wurden diese in relative, prozentuale Werte umgerechnet. Die erhaltenen Werte sind nach Metaboliten separiert in Abbildung 55 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Beteiligung der verschiedenen CYPs an der Bildung von **11**, sieht man, dass, auch wenn der Beitrag von CYP1A2 am Gesamtmetabolismus (s. Insert in Abbildung 54) zwischen 200 und 50  $\mu\text{M}$  deutlich abnimmt, in HLM CYP1A2 über den gesamten Konzentrationsbereich an dieser Reaktion mit beinahe konstanten 80 % beteiligt ist. Den Rest stellen hauptsächlich CYP2C19 und CYP3A4, wobei auch hier kein Trend für eine Konzentrationsabhängigkeit ausgemacht werden kann. Der etwas niedrigere  $K_M$ -Wert von CYP3A4 für die Reaktion von **1** zu **11** lässt aber eine geringfügig höhere Beteiligung dieses Enzyms bei sehr kleinen Substratkonzentrationen vermuten. Auch für die Bildung von **12** und **23** ist CYP1A2 das wichtigste Enzym in HLM, allerdings scheint die Beteiligung von CYP2C19 und CYP2E1 bei den kleinen und großen Konzentrationen an Bedeutung zu gewinnen. Für die Epoxidierung in HLM zeichnen CYP2E1 und CYP2A6 verantwortlich, wobei der Anteil von CYP2E1 bei höheren Konzentrationen steigt. Einhergehend mit dem sehr geringen  $K_M$ -Wert für die Epoxidierung von **1** durch CYP2A6 ( $K_M = 0,49 \mu\text{M}$ ) gewinnt dieses Enzym bei abnehmenden Substratkonzentration zunehmend an Bedeutung für diese Reaktion. Bei höheren Konzentrationen tragen auch CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 bis zu maximal 12 % zur Epoxidierung bei. Vernachlässigt man die Beteiligung von EHs bei der Umwandlung von Epoxid **15** zu Diol **27** in HLM, so wird Diol **27** hauptsächlich von CYP1A2 und CYP2E1 gebildet, wobei auch hier die Beteiligung von CYP2C19 bei kleinen und hohen Konzentrationen zunimmt. Somit sind CYP2E1 gefolgt von CYP1A2 und CYP2A6 wahrscheinlich hauptsächlich verantwortlich für die netto-Bildung von Diol **27**. Die O-Demethylierung von **1** zu **6** und **8** wird in HLM wahrscheinlich zum Großteil von CYP1A2 und CYP2C19 katalysiert, die Ringhydroxylierung durch CYP3A4 und CYP1A2.



**Abbildung 55.** Berechnete, prozentuale Beteiligung humaner CYPs an der Bildung der Metaboliten von Methyleugenol (**1**) in HLM (berechnet nach Gleichung 9, Kap. 5.4.1.7). Zur besseren Übersicht wurden alle Spannweiten entfernt.

---

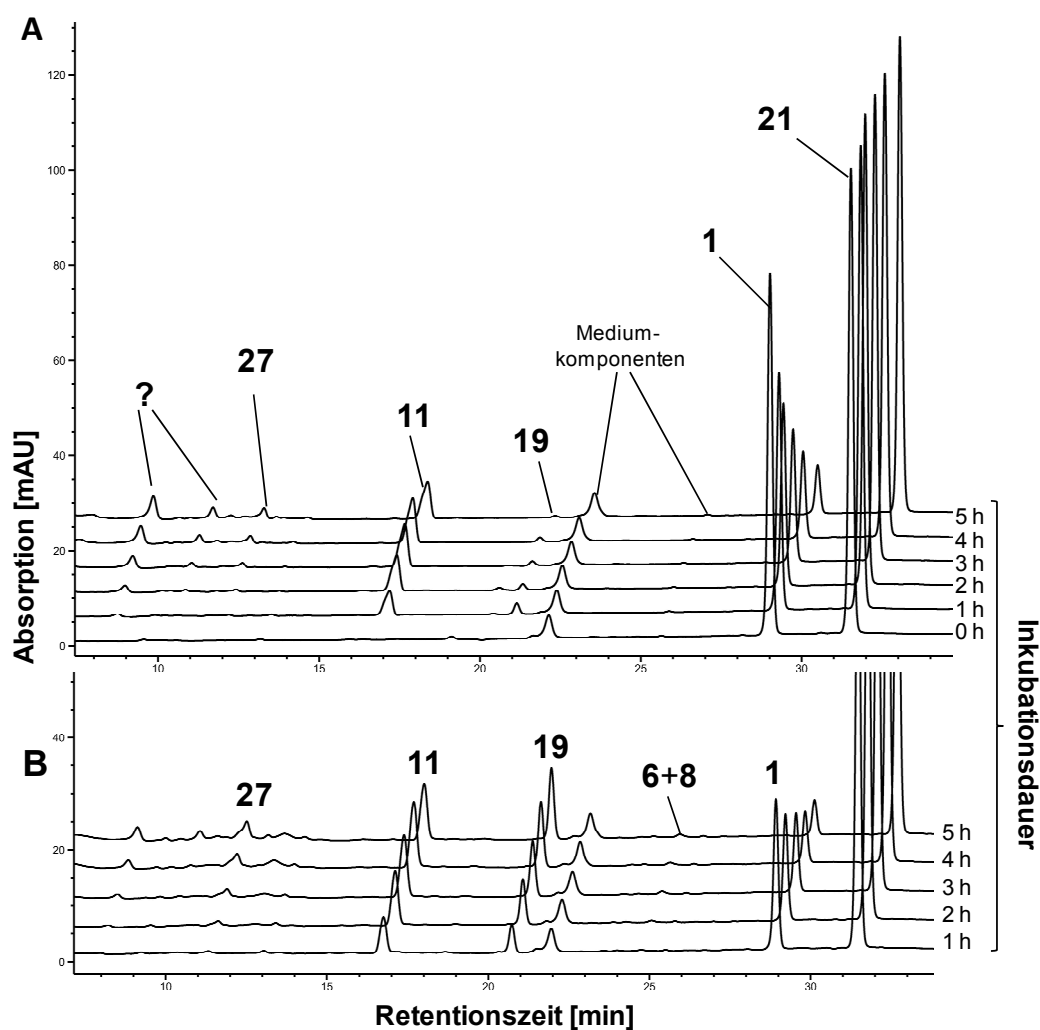
#### 5.4.2.6 Phase-II-Metabolismus von Methyleugenol in primären Rattenhepatozyten

Um herauszufinden, ob die Phase-I-Metaboliten von Methyleugenol (**1**), welche in Inkubationen mit Lebermikrosomen oder Supersomes<sup>TM</sup> detektiert wurden, auch in einer Kombination von Phase-I und -II gebildet bzw. nachweisbar sind, wurden mit Aroclor 1254-vorinkubierte primäre Rattenhepatozyten (ApRH) mit **1** in einer nicht-zytotoxischen Konzentration inkubiert. Primäre Rattenhepatozyten haben den Vorteil, dass sie einfach zu gewinnen sind und einen relativ gutes Abbild des Metabolismus im Vergleich zur *in vivo*-Situation aufweisen.

Die Zytotoxizität von **1** folgt keinem sigmoidalen Verlauf, wie er häufig bei zytotoxischen Stoffen beobachtet wird. Vielmehr wird ein Plateau mittlerer Zytotoxizität erreicht, nach deren Erreichen die Zytotoxizität auch durch Erhöhung der ME-Konzentrationen nicht weiter steigt. Im Resazurinreduktionstest konnte in früheren Arbeiten ein EC<sub>50</sub>-Wert von 306 µM (Weishaupt, 2010) und im LDH-*leakage assay* ein EC<sub>50</sub>-Wert von > 2 mM (Cartus *et al.*, 2012) bzw. > 1 mM (Burkey *et al.*, 2000) bestimmt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden ApRH mit **1** in einer Konzentration von 250 µM (Endkonzentration 0,1 % DMSO) über fünf Stunden inkubiert und jede Stunde Proben des Überstandes entnommen. Da die Inkubation unbehandelter pRH keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, wurden die Zellen für 48 h mit 25 µM Aroclor 1254 (Endkonzentration 0,1 % DMSO) vorinkubiert. Die Proben eines jeden Zeitpunktes wurden geteilt und ein Teil jeweils direkt analysiert. Der andere Teil wurde mit β-Glucuronidase (dieses Enzym weißt ebenfalls eine (Aryl)sulfatase-Aktivität auf), für mehrere Stunden nachinkubiert. Dies hat den Zweck, bereits gebildete Phase-II-Metaboliten, d. h. Glucuronide/Sulfate zu dekonjugieren um sie als Phase-I-Metaboliten detektierbar zu machen. Möglicherweise entstandene Glucuronide/Sulfate sind zu hydrophil, um sie mit der verwendeten RP-HPLC-Methode zu detektieren. Aus der Differenz der Konzentrationen zwischen Phase-I-Metaboliten mit und ohne Nachbehandlung kann auf das Ausmaß der Konjugation als Glucuronid bzw. Sulfat geschlossen werden.

In Abbildung 56 sind beispielhafte Chromatogramme dieser Versuche gezeigt. Die aus diesen Versuchen bestimmten Metabolitenkonzentrationen sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Hauptmetabolit bei der Untersuchung des Metabolismus von Methyleugenol (**1**) in ApRH war wie in mikrosomalen Inkubationen mit ARLM auch 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**). Nach einer Stunde Inkubation wurden 14,2 % der eingesetzten Startkonzentration von **1** als **11** detektiert. Davon lagen 23,8 % konjugiert, der Rest ungebunden vor.





**Abbildung 56.** HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation von Aroclor 1254-vorbehandelter primärer Rattenhepatozyten mit Methyleugenol (**1**, 250  $\mu$ M) bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{ref} = 360$  nm). **A:** Inkubationsüberstände nach 0–5 h; **B:** Gleiche Überstände wie in A, nach 1–5 h jedoch nachinkubiert mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase.  $c(\mathbf{21}) = 250$   $\mu$ M. Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21–34.

**Tabelle 25.** Konzentrationen von Methyleugenol (**1**;  $c_{Start} = 250$   $\mu$ M) und identifizierten Metaboliten in  $\mu$ M von Überständen der Inkubation von **1** mit Aroclor 1254-vorbehandelten primären Rattenhepatozyten (ApRH) über einen Zeitraum von 5 h mit (+) oder ohne (–) Glucuronidase/Sulfatase-Nachbehandlung. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen der pRH dreier verschiedener Tiere.<sup>1</sup> Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21–34.

Metabolit	0 h		1 h		2 h		3 h		4 h		5 h	
	Glucuronidase Nach-Inkubation											
	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Methyleugenol ( <b>1</b> )	254 $\pm$ 7.0	164 $\pm$ 8.1	106 $\pm$ 5.8	123 $\pm$ 9.8	71.2 $\pm$ 1.4	83.6 $\pm$ 13.6	54.1 $\pm$ 4.3	52.4 $\pm$ 7.9	35.1 $\pm$ 1.8	31.6 $\pm$ 2.4	24.6 $\pm$ 0.7	
1'-OH-ME ( <b>11</b> )	ND	26.9 $\pm$ 2.6	35.3 $\pm$ 3.0	44.4 $\pm$ 4.9	51.1 $\pm$ 1.6	52.4 $\pm$ 3.2	63.6 $\pm$ 4.1	52.9 $\pm$ 2.0	63.1 $\pm$ 3.6	46.5 $\pm$ 2.2	57.0 $\pm$ 3.7	
E + C ( <b>6+8</b> )	ND	ND	NQ	ND	NQ	ND	2.4 $\pm$ 0.6	ND	2.6 $\pm$ 0.6	ND	2.6 $\pm$ 1.4	
ME-Diol ( <b>27</b> )	ND	ND	NQ	NQ	NQ	2.2 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 1.1	11.5 $\pm$ 0.5	
6-OH-ME ( <b>19</b> )	ND	11.0 $\pm$ 1.4	23.8 $\pm$ 2.9	6.6 $\pm$ 0.6	34.8 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.4	43.4 $\pm$ 2.2	NQ	56.9 $\pm$ 4.1	NQ	58.0 $\pm$ 4.1	

<sup>1</sup>ND = nicht detektierbar, NQ = nicht quantifizierbar =  $c < LOQ$

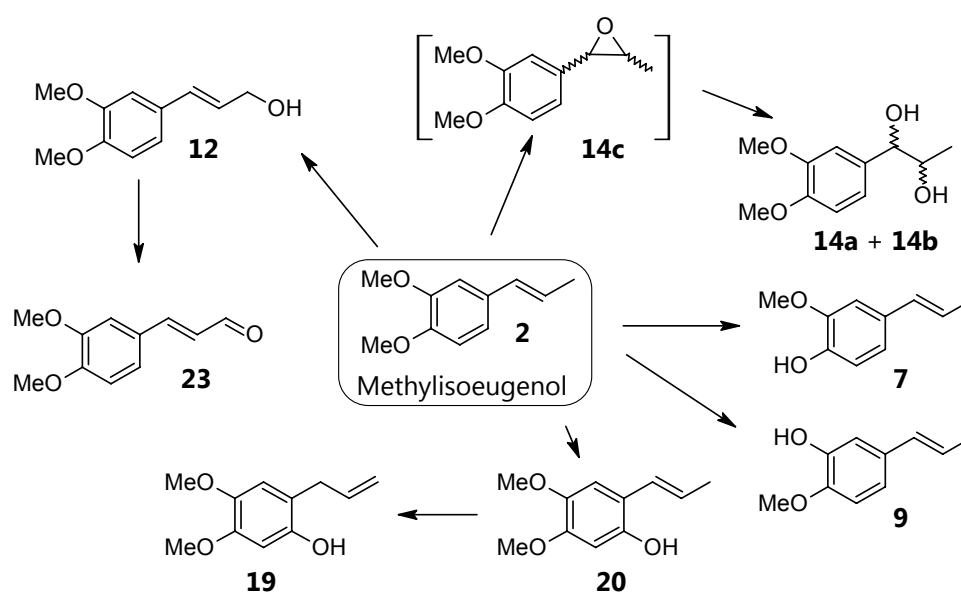
Die Konzentration von **11** stieg im weiteren Inkubationsverlauf auf maximal 25,3 % nach drei Stunden an, wobei zu diesem Zeitpunkt 17,6 % **11** konjugiert waren. Ebenfalls bereits nach einer Stunde war 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) mit 9,5 % quantifizierbar, welches zu rund 54 % konjugiert vorlag. Die Konzentration des konjugierten **19** stieg über den gesamten beobachteten Zeitraum kontinuierlich an und erreichte maximal 23,2 % nach fünf Stunden, wobei gleichzeitig die Konzentration an freiem, nicht konjugiertem **19** weiter sank und bereits nach vier Stunden kein freies **19** mehr quantifizierbar war. Als Minormetaboliten konnten zum ersten Mal nach drei Stunden die *O*-demethylierten Verbindungen Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**) sowie Diol **27** quantifiziert werden. **6** und **8** lagen zu jedem Zeitpunkt vollständig konjugiert vor und überschritten eine Konzentration 1,04 % der ME-Startkonzentration nicht. Diol **27** lag zu 56–60 % konjugiert vor, wobei dessen Anteil von 2,0 % auf 4,6 % im Zeitraum zwischen 3–5 h anstieg.

### 5.4.3 Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**)

Teile der in diesem Unterkapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Cartus *et al.*, 2011, *Drug Metab Dispos*, 39, 9, 1727-33).

#### 5.4.3.1 Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**)

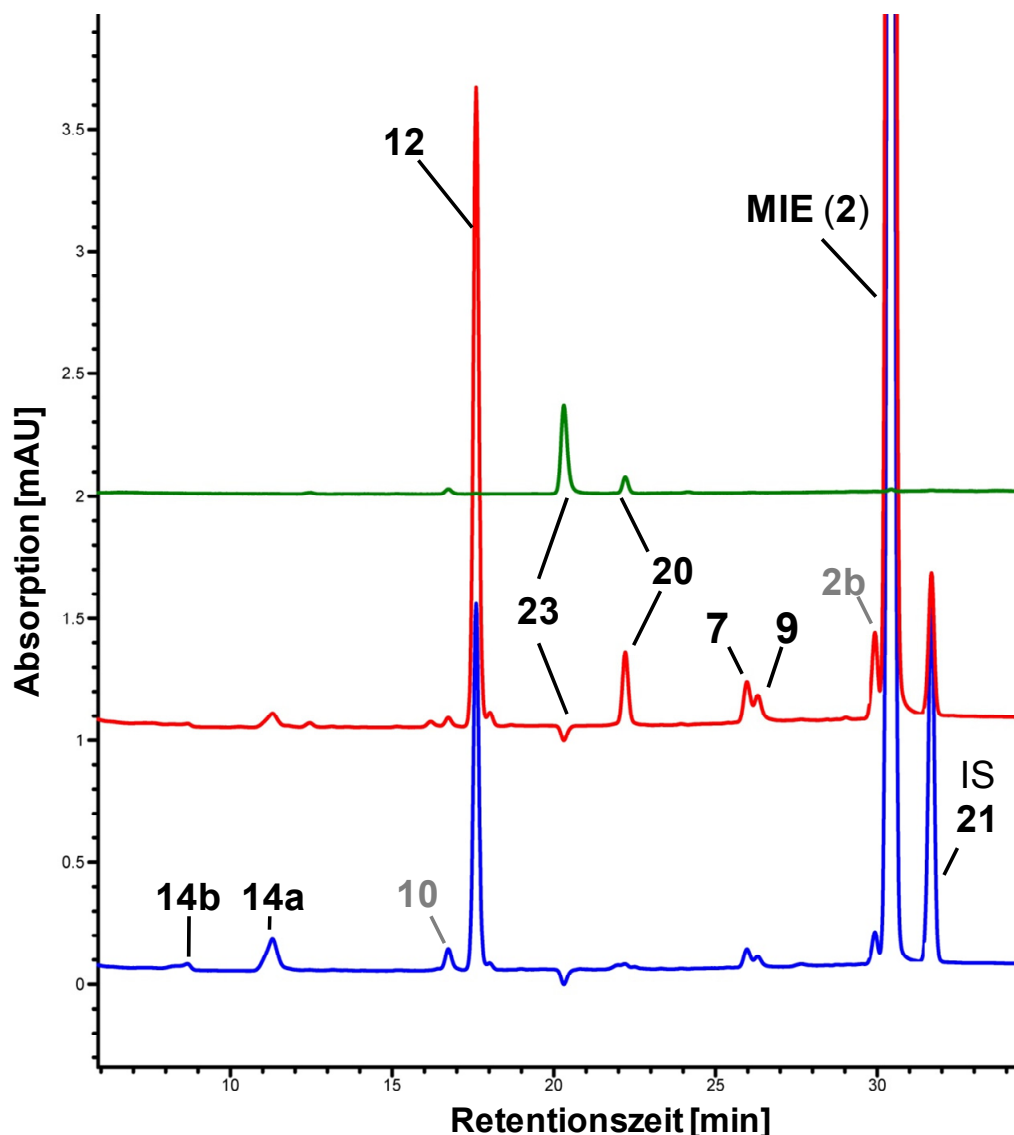
In Abbildung 57 sind die bei den Inkubationen von Lebermikrosomen oder Supersomes<sup>TM</sup> mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) gebildeten Metaboliten und deren Reaktionswege gezeigt.



**Abbildung 57.** Identifizierte Metaboliten der Inkubationen verschiedener Lebermikrosomen mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**).

Ein ausgewähltes Chromatogramm der Inkubation von Rinderlebermikrosomen (RLM) mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) ist in Abbildung 58 gezeigt. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte nicht durch eigene <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Nachweise, sondern durch Vergleich der Retentionszeiten, UV-Spektren und Massesignalen und aufgrund von Analogieschlüssen auf Basis der bei der Untersuchung des Metabolismus von Methyleugenol (**1**) gewonnenen Erkenntnisse. Daher werden die identifizierten Metaboliten relativ kurz vorgestellt.

(*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**,  $t_R = 17,7$  min) ist in allen Inkubationen der Hauptmetabolit von **2**. 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) konnte in keiner Inkubation nachgewiesen werden. Als Sekundärmetabolit von **12** konnte (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) nachgewiesen werden. Daneben stellt das in Ringposition 6 hydroxylierte (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) einen weiteren Hauptmetaboliten dar.



**Abbildung 58.** HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten des Inkubationsüberstandes der Reaktion von Rinderlebermikrosomen (BLM) mit Methylisoeugenol (**2**,  $c_{\text{Start}} = 400 \mu\text{M}$ ; Inkubationsdauer 20 min; 1 % MeCN) bei verschiedenen Messwellenlängen:  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (blau);  $261 \text{ nm}$  (rot);  $340 \text{ nm}$  (grün).  $\lambda_{\text{ref}} = 360, 360$  und  $450 \text{ nm}$ . Konzentration des internen Standards (**21**)  $67 \mu\text{M}$ . Die Substanznummern sind in Abbildung 57 und in der dieser Arbeit vorangestellten Substanzübersicht erläutert.

In Lebermikrosomen und CYPs (CYP1A2 und 3A4) wurden zwei Diastereomere des Seitenkettendiols 1',2'-Dihydrodihydroxymethylisoeugenol **14** detektiert. Hierbei handelt es sich um das *threo*-Enantiomerenpaar (1'*R*,2'*R*)- und/oder (1'*S*,2'*S*)-**14a** sowie das *erythro*-Enantiomerenpaar (1'*R*,2'*S*)- und/oder (1'*S*,2'*R*)-**14b**. Ob jeweils eines der beiden Enantiomere ausschließlich oder bevorzugt gebildet wurde, wurde nicht untersucht. In allen Quantifizierungen wird stets die Summe beider Diastereomerenpaare (also aller vier möglichen Verbindungen) angegeben. Das Verhältnis von **14b** zu **14a** war in allen Inkubationen abhängig von der Startkonzentration des Substrates **2** oder der Inkubationsdauer. Niedrige Substrat-

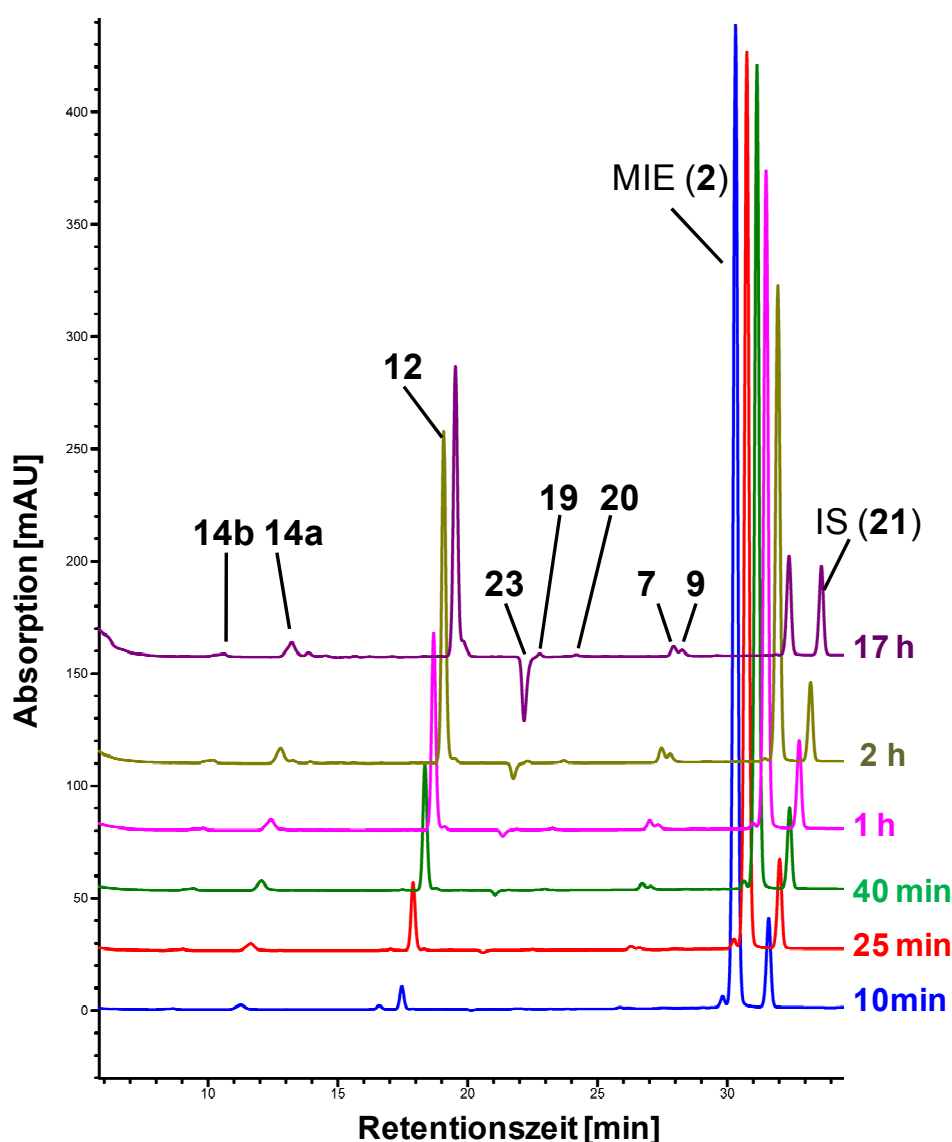
konzentrationen und kurze Inkubationszeiten resultierten in einem Verhältnis von ungefähr 1:2, während mit steigenden Substratkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten das Verhältnis auf 1:4-6 sank. Ausnahmen bildeten die Inkubationen mit RLM und CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup>. RLM bildeten generell wenig der Diole **14** und die Konzentration von **14b** (*erythro*) war in fast allen Inkubationen unterhalb der Detektionsgrenze, so dass kein Verhältnis bestimmt werden konnte. Dort wo die Konzentrationen beider Diastereomere bestimmbar waren, lag das Verhältnis, wie in den Inkubationen mit Lebermikrosomen, bei 1:4-5 (**14b:14a**). CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup> bildeten nahezu ausschließlich die *threo*-Isomere **14a** mit hohen Gehalten von bis zu 23 % der eingesetzten Startkonzentration von **2**, während die Konzentration von **14b** stets unterhalb der Quantifizierungsgrenze lag. Spektroskopische oder massenspektrometrische Hinweise auf die Bildung der Epoxide **14c** gab es weder in den lebermikrosomalen, noch in den Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen.

Als Minormetaboliten konnten die beiden *O*-demethylierten Verbindungen Isoeugenol (**7**) und Isochavibetol (**9**) nachgewiesen werden. Die Zuordnung der beiden Substanzen erfolgte durch Vergleich mit der Retentionszeit von Isoeugenol (**7**), welches als Referenzsubstanz zur Verfügung stand. Somit wurde der früher eluierende Peak bei  $t_R = 26,0$  min eindeutig als **7** identifiziert. Ohne konkreten Beweis, aber in Analogie zu den von Methyleugenol gebildeten *O*-demethylierten Metaboliten Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**) wurde der später eluierende Peak bei  $t_R = 26,4$  min folglich Isochavibetol (**9**) zugeordnet. Auch das 4-Hydroxy-Derivat **6** eluiert rund 0,4 min früher als das 3-Hydroxy-Derivat **8**. Die weiteren physiko-chemischen Eigenschaften von **7** und **9** stimmen mit denen der Referenzsubstanz überein. Da die Signale beider Verbindungen nicht vollständig basisliniengetrennt vorlagen, aber die UV-spektroskopischen Daten keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen, wurde zur Quantifizierung stets die Summe **7** + **9** bestimmt. Zusätzlich wurde durch manuelle Integration das ungefähre Verhältnis beider teilweise koeluierender Verbindungen zueinander bestimmt.

Der Peak bei  $t_R = 16,4$  min wurde von Veratrumaldehyd (**10**) verursacht, welches stets in geringen Konzentrationen (< 0,5 %) in denen in DMSO-angesetzten Stammlösungen von **2** nachzuweisen war. Eine weitere „Verunreinigung“ in **2** stellt (*Z*)-Methylisoeugenol (**2b**) bei  $t_R = 29,5$  min dar, welches anhand der <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen Signale der 3'-Methylgruppen (Spektrum DAC02) unterschieden werden kann. Die Integralverhältnisse zeigen, dass **2b** zu maximal 1,2 % in **2** enthalten war.

### 5.4.3.2 Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in Lebermikrosomen

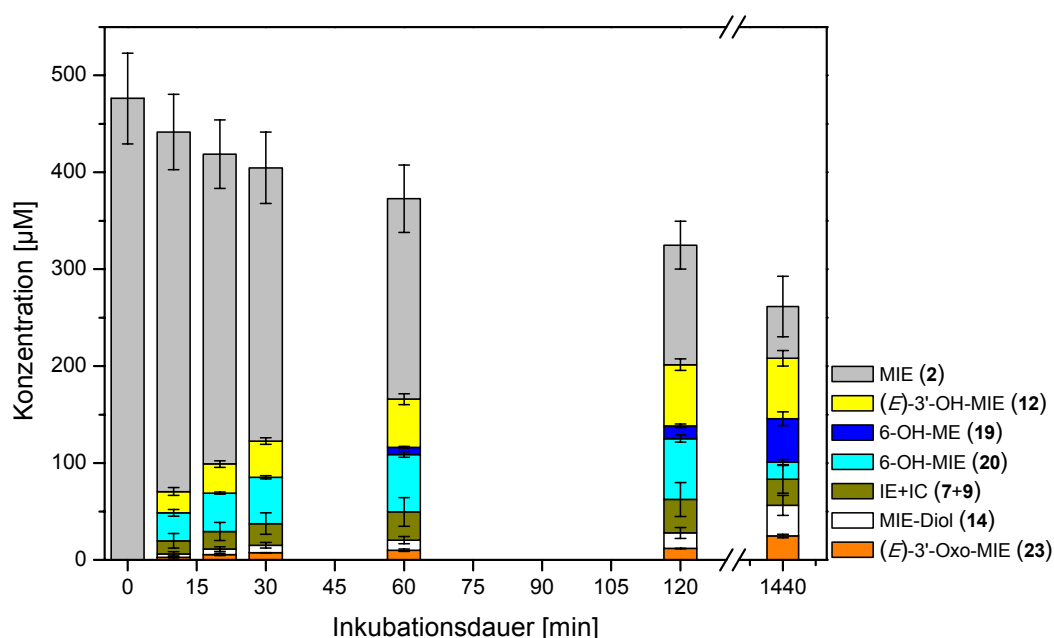
Für die Untersuchung des Zeitverlaufes des Phase-I-Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) wurden Lebermikrosomen (LM) zusammen mit einem NADPH-generierenden System über 24 h inkubiert (vgl. Kapitel 7.2.2) und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, welche nach entsprechender Aufarbeitung HPLC-chromatographisch analysiert wurden. Abbildung 59 zeigt beispielhaft ein Set von Chromatogrammen der Inkubation von Rinderlebermikrosomen (BLM) mit **2**.



**Abbildung 59.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten zum Zeitverlauf der Inkubation von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Rinderlebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **2**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h; Messwellenlänge  $\lambda = 261$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm). (Die Auswertung dieser Chromatogramme ist in Abbildung 65, Seite 148 gezeigt).

Negativkontrollen ohne den Zusatz von NADPH sowie Inkubationen mit hitzeinaktivierten Mikrosomen lieferten keine detektierbaren Metaboliten. Die folgenden Abbildungen illustrieren die dabei erhaltenen Ergebnisse der identifizierten und quantifizierbaren Metaboliten von **2**. Die prozentual angegebenen Metabolitenkonzentrationen beziehen sich im Folgenden immer auf die eingesetzte Startkonzentration von **2** (500  $\mu\text{M}$ ).

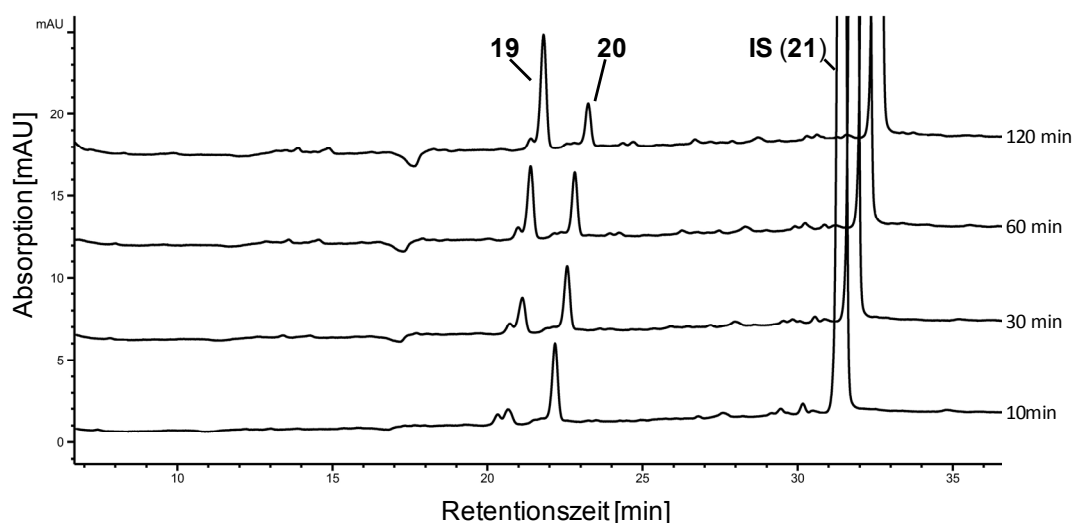
Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen (**ARLM**; Abbildung 60) setzten – wie bei Methyleugenol (**1**) – auch **2** mit dem breitesten Metabolitenspektrum um. Die Gesamtausbeute aller Metaboliten war, im Vergleich zu **1**, mit rund 40 % der Startkonzentration nach zweistündiger Inkubationszeit, etwas geringer und erhöhte sich auch nach 24 Stunden nicht bedeutend. Hauptmetabolit war 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**), dessen Konzentration im Laufe der ersten beiden Stunden auf 12,6 % anstieg.



**Abbildung 60.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (**ARLM**). Startkonzentration von **2**: 500  $\mu\text{M}$ , 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Inkubationen mit ARLM verschiedener Tiere.

Bereits nach 60 min war das hieraus gebildete Isomerisierungsprodukt 6-Hydroxymethylisoeugenol (**19**) detektierbar. Die Konzentration von **19** stieg im weiteren Inkubationsverlauf auf 9,0 % nach 24 Stunden, während gleichzeitig die Konzentration von **20** auf 3,5 % absank. ARLM und Rinderlebermikrosomen (BLM) waren die einzigen untersuchten Mikrosomenarten, die sowohl die Bildung von **20** als auch dessen Isomerisierung zu **19** katalysierten. Diese

Isomerisierung war ungewöhnlich, da bislang in der Literatur nur enzymatische Isomerisierungen in die andere Richtung, nämlich von Allyl- zu Propenylseitenkette, beschrieben wurden und für diesen Weg auch synthesechemisch nur wenige Beispiele bekannt sind. Daher wurde **20** analysenrein synthetisiert und seinerseits mit verschiedenen LM inkubiert. So konnte gezeigt werden, dass auch LM, welche **20** nicht bildeten, in der Lage waren, diese Isomerisierung zu katalysieren. Die Reaktion von **20** mit humanen Lebermikrosomen (HLM) ist in Abbildung 61 gezeigt.



**Abbildung 61.** Zeitverlauf der Isomerisierung von 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**,  $c_{\text{Start}} = 100 \mu\text{M}$ ) zu 6-Hydroxymethyleugenol (**19**), katalysiert durch humane Lebermikrosomen (HLM, Proteingehalt 1 mg/ml). Detektionswellenlänge  $\lambda = 261$ ;  $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm. Aus Cartus *et al.*, 2011, *Drug Metab Dispos*, 39, 9, 1727-33.

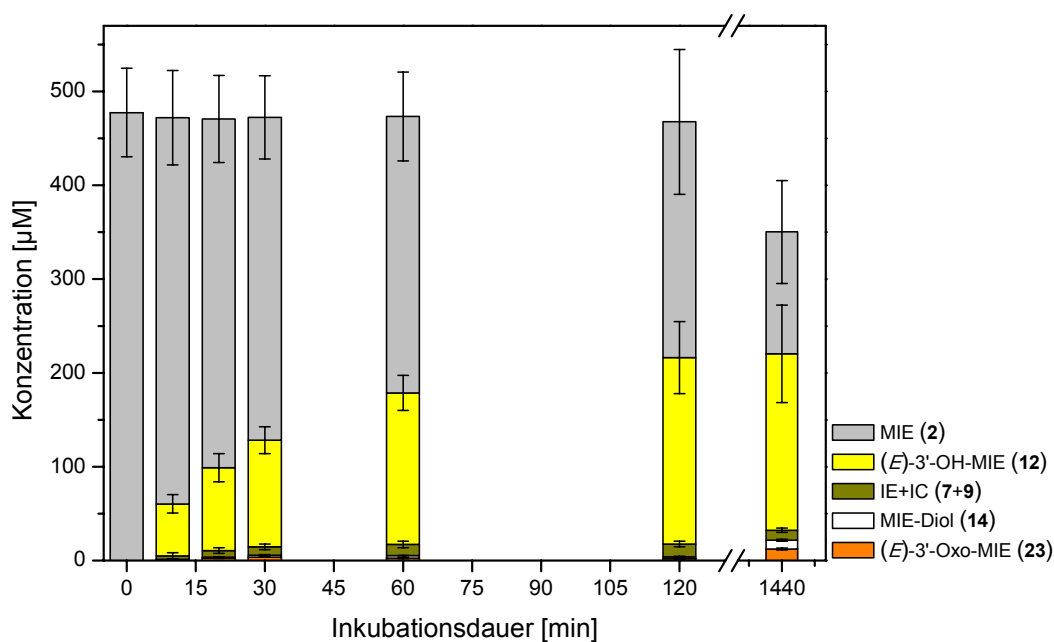
In etwas geringeren Konzentrationen als **20**, wurde der Seitenkettenalkohol (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**) in den Inkubationen mit ARLM detektiert. Dessen Konzentration stieg über den gesamten Inkubationszeitraum an und erreichte nach 24 Stunden die maximale Konzentration von 12,5 %. Bereits nach 10 min war ebenfalls das Oxidationsprodukt von **12**, 3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) detektierbar. Auch dessen Konzentration stieg im Inkubationsverlauf stetig an und erreichte nach 24 Stunden mit knapp 5 % seine maximale Konzentration. Bereits nach 10 Minuten Inkubationsdauer waren die *O*-demethylierten Verbindungen Isoeugenol (**7**) und Isochavibetol (**9**) detektierbar. Die Konzentrationen von **7** und **9** erreichten nach zwei Stunden mit 3,5 % eine maximale Konzentration, während nach 24 Stunden nur noch rund 2,9 % detektierbar waren. Zu allen Inkubationszeitpunkten war die Konzentration von **7** dabei höher als die von **9**. Im Mittel betrug das ermittelte Verhältnis von **9** zu **7** in ARLM 1:4. Eine zeitabhängige Änderung dieses Verhältnisses bestand nicht. Relativ geringe Konzentrationen wurden von den Diolen **14a** und **14b** detektiert, deren Verhältnis *ca.*



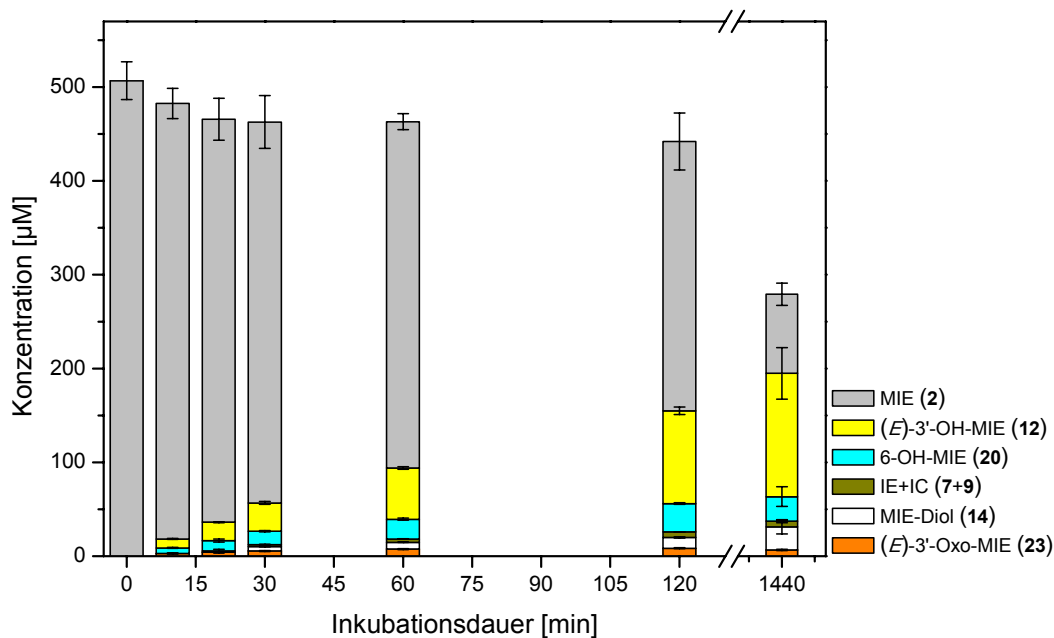
1:3 (**14b:14a**) betrug. Die Konzentrationen beider Diole stiegen kontinuierlich an und erreichten nach 24 Stunden 6,3 % der eingesetzten Startkonzentration von **2**. Die Bildung aller Metaboliten war zumindest über die ersten 30 Minuten der Inkubation nahezu linear. Zwischen zwei und 24 Stunden wurde ein Plateau erreicht, bei dem sich die Konzentration von **12** nicht wesentlich änderte, während die Summe der phenolischen Substanzen **19 + 20** sowie **7+9** etwas sanken. Im gleichen Zeitraum stiegen die Konzentrationen der Diole **14a + 14b** und des Aldehyds **23** leicht. Die Gesamtwiederfindung aller identifizierten Verbindungen (**2** + alle identifizierten Metaboliten) sank von anfänglich knapp unter 100 % zu Inkubationsstart auf minimal rund 50 % nach 24 Stunden.

Die Inkubationen von nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (**RLM**; Abbildung 62) mit **2** lieferten in der Summe eine fast gleiche Ausbeute an Metaboliten wie die Inkubationen von ARLM. Das Metabolitenprofil und die Metabolitenkonzentrationen unterschieden sich nach Inkubation mit RLM jedoch auffällig von denen mit ARLM. So wurde **12** in sehr hohen Konzentrationen detektiert. Bereits nach 10 min lag **12** zu 11 % der eingesetzten Startkonzentration vor. Im weiteren Verlauf der Inkubation wurde nach drei Stunden eine Maximalkonzentration von 41,2 % detektiert (Datenpunkt in Abbildung 62 nicht gezeigt), die nach 24 h, zugunsten der Bildung von **23** (2,5 %) auf 37,6 % absank. Daneben wurden nur geringe Mengen der Diole **14a** und **14b** ( $\Sigma c_{\max} = 1,9$  % nach 24 h im Verhältnis **14b:14a** von 1:4) und der O-demethylierten Verbindungen **7** und **9** ( $\Sigma c_{\max} = 2,1$  % nach 24 h) nachgewiesen. Das ermittelte Verhältnis von **9:7** betrug durchschnittlich 1:2, es wurde also verglichen mit ARLM ein höherer Anteil Isochavibetol (**9**) detektiert.

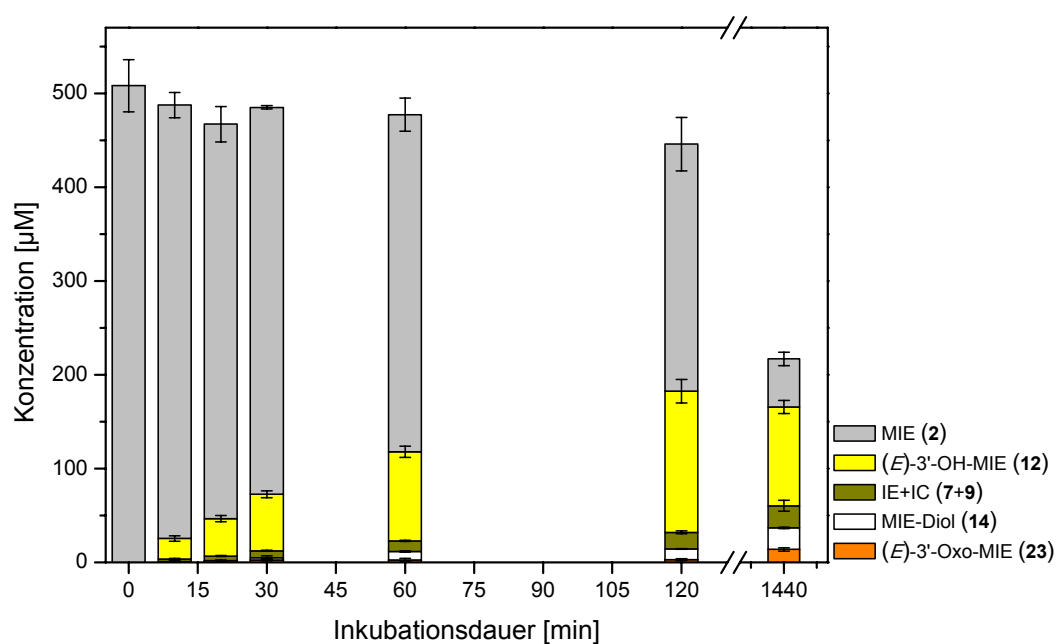
Rinderlebermikrosomen (**BLM**, Abbildung 63 und 65, Seite 146 bzw. 148) wiesen das gleiche Metabolitenspektrum auf wie ARLM, die Bildung der Metaboliten vollzog sich aber langsamer und mit etwas anderen Ausbeuten. **12** stellte über die gesamte Inkubationszeit den Hauptmetaboliten dar und wurde mit maximal 26,2 % der Startkonzentration nach 24 Stunden detektiert. Daneben wurden **20** ( $c_{\max} = 5,2$  % nach 24 h), die Diole **14a + 14b** ( $\Sigma c_{\max} = 4,9$  %), Aldehyd **23** ( $c_{\max} = 1,7$  % nach 2 h) und die demethylierten Verbindungen **7** und **9** ( $\Sigma c_{\max} = 1,2$  % nach 24 h) detektiert. Das Verhältnis der Diole betrug im Mittel 1:3,5 (**14b** zu **14a**), das Verhältnis von **9** zu **7** 1:2. Die Bildung von **19** aus **20** konnte nachgewiesen werden, die Konzentration von **19** lag aber unterhalb des LOQ. In den Inkubationen von BLM mit **2** in 1 % MeCN ( $n = 1$ , Abb. Abbildung 65) statt 5 % DMSO ( $n = 3$ , Abbildung 63) als Lösungsvermittler zeigte sich ein Unterschied, verglichen mit den gleichen Inkubationen mit Methyleugenol (**1**). Insbesondere wurde unter Verwendung von MeCN höhere Konzentrationen des Aldehyds **23** ( $c_{\max} = 18,2$  % nach 24 h) und der Diole **14** detektiert.



**Abbildung 62.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (**RLM**). Startkonzentration von **2**: 500  $\mu\text{M}$ , 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.



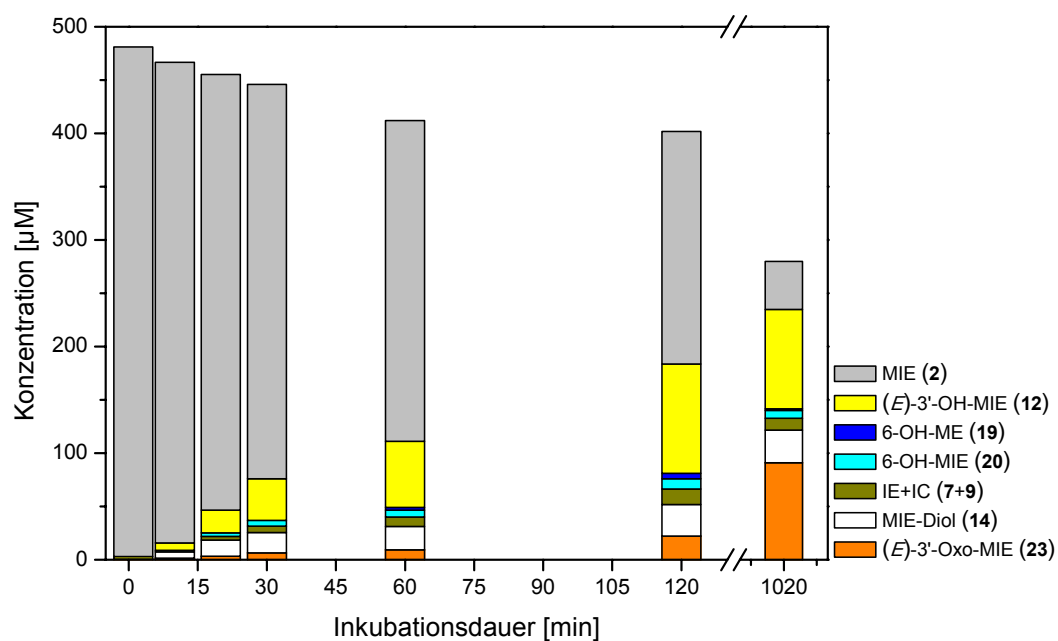
**Abbildung 63.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Rinderlebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **2**: 500  $\mu\text{M}$ , 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit BLM des gleichen Tieres.



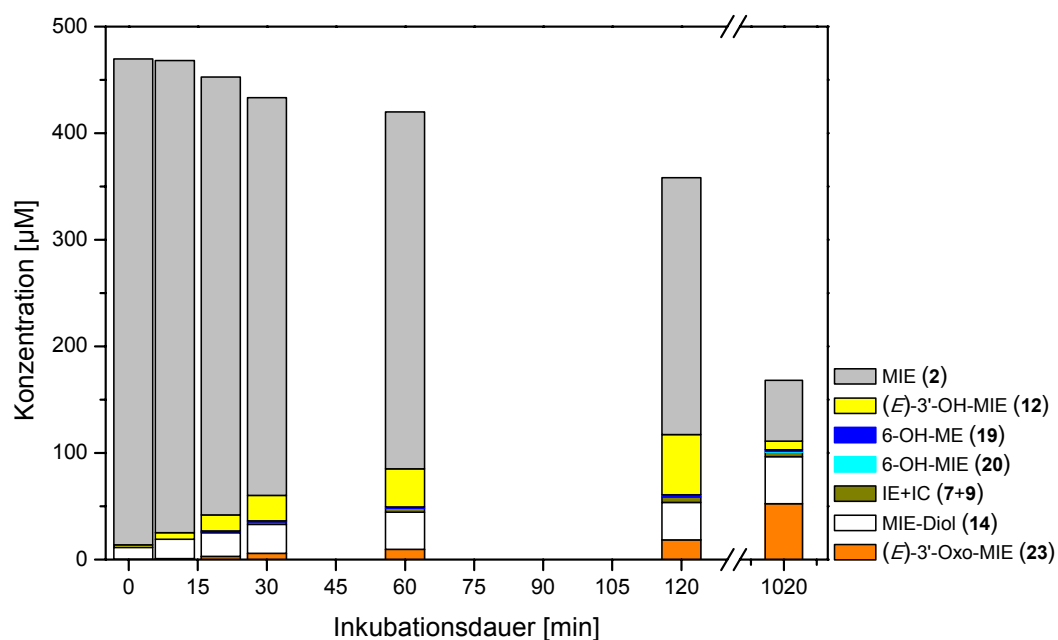
**Abbildung 64.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit humanen Lebermikrosomen (**HLM**). Startkonzentration von **2**: 500 µM, 5 % DMSO; Proteingehalt 2 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  min, 24 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit der gleichen Charge gepoolter HLM von 150 männlichen und weiblichen Spendern.

Humane Lebermikrosomen (**HLM**, Abbildung 64), verhielten sich beim Metabolismus von **2** nahezu identisch zu RLM, wobei entgegen den sonstigen Befunden RLM insgesamt etwas aktiver waren als HLM. Das Metabolitenspektrum war identisch und die detektierten Konzentrationen ähnlich: **12** wurde als Hauptmetabolit gebildet (maximal 37,8 % nach 3 h) und die Diole **14b+14a** ( $\Sigma c_{\max} = 4,6$  % nach 24 h; Verhältnis 1:3,5), Aldehyd **23** ( $c_{\max} = 0,7$  % nach 21 h) sowie die Phenole **9 + 7** ( $\Sigma c_{\max} = 5,0$  % nach 21 h; Verhältnis 1:3) in etwas geringeren Konzentrationen als bei RLM detektiert.

Die in einem Einzelexperiment untersuchten Schweinelebermikrosomen (**SLM**, Abbildung 66, Seite 148) zeigten unter den gegebenen (gleichen) Inkubationsbedingungen ähnliche Verhältnisse wie BLM (Abbildung 65, Seite 148), waren jedoch insgesamt etwas umsatzschwächer in den ersten zwei Stunden der Inkubation. Auffällig war die geringe Gesamtwiederfindung nach 17 Stunden von 33,6 % der eingesetzten Startkonzentration **2**, was sonst nur bei HLM in diesem Ausmaß beobachtet wurde.



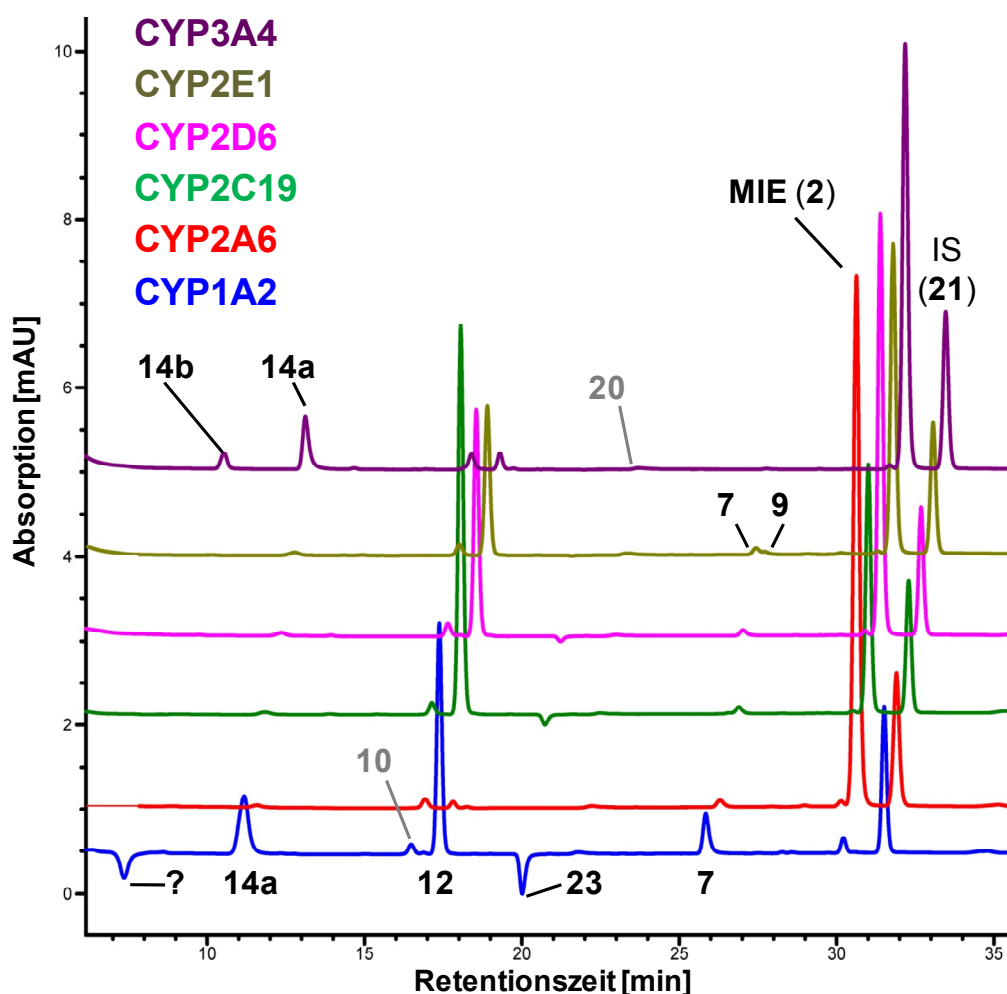
**Abbildung 65.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung der Inkubation von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Rinderelebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **2**: 500 µM, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h;  $n = 1$ .



**Abbildung 66.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung der Inkubation von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Schweinelebermikrosomen (**SLM**). Startkonzentration von **2**: 500 µM, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h;  $n = 1$ .

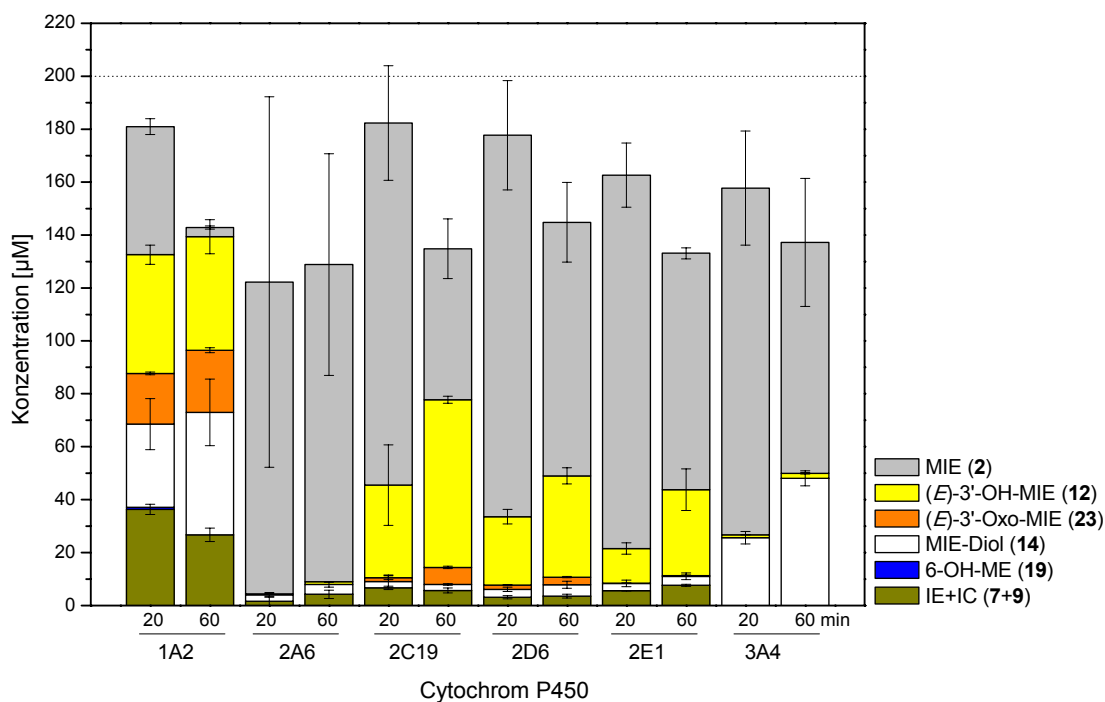
### 5.4.3.3 Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

Die untersuchten humanen CYP-Enzyme setzten (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in vergleichbarem Umfang und mit einem ähnlichen Metabolitenprofil um wie Methyleugenol (**1**). In Abbildung 67 ist beispielhaftes ein Set von Chromatogrammen der Inkubationen der sechs Supersomes™ mit **2** gezeigt. Die ermittelten Konzentrationen der Metaboliten dieser Reaktionen sind in den Abbildungen 68 und 69 gezeigt.

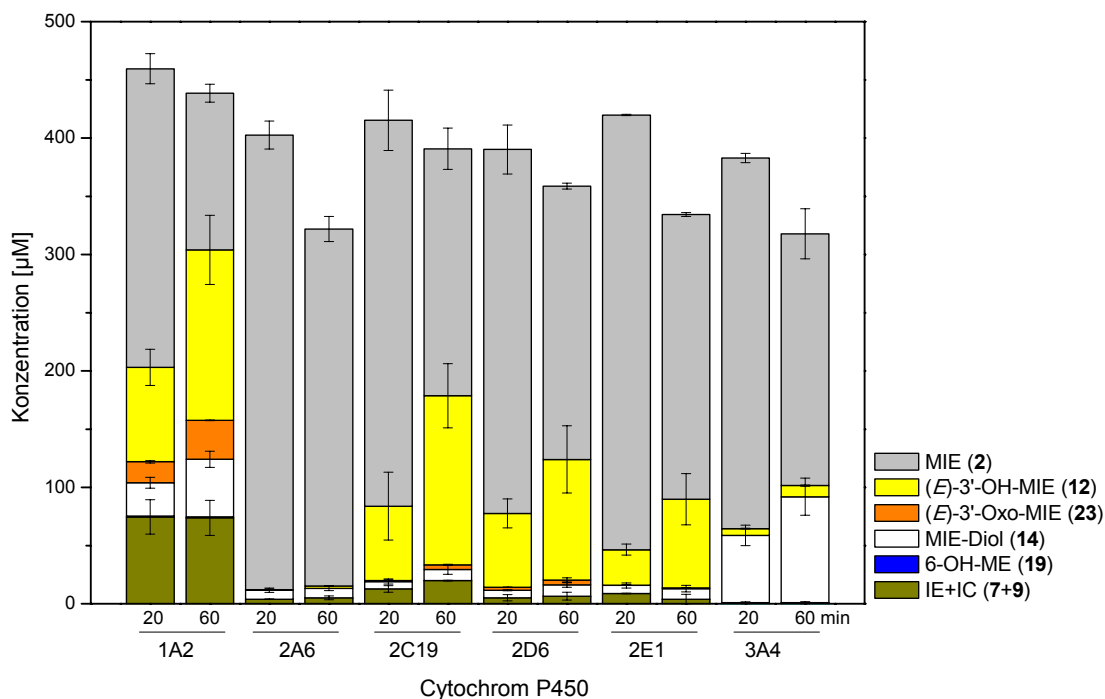


**Abbildung 67.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation verschiedener Supersomes™ (120 nM) mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**, 200 µM; 1 % MeCN) nach 60 min bei  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm). Konzentration des internen Standard (**21**): 67 µM.

Auch für **2** war CYP1A2 das aktivste der untersuchten Enzyme und zeigte ein sehr breites Metabolitenspektrum. Nach 20-minütiger Inkubation von 200 µM **2** waren knapp 67 % der Startkonzentration zu identifizierten Metaboliten umgesetzt, wobei die Gesamtwiederfindung rund 90 % betrug, welche im weiteren Inkubationsverlauf nach 60 min auf 67 % sank.



**Abbildung 68.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **200 µM 2** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.



**Abbildung 69.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **500 µM 2** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.

Hauptmetaboliten in CYP1A2-Inkubationen waren mit 23 % nach 20 min (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**), dessen Oxidationsprodukt (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) mit rund 10 % sowie *threo*-Seitenkettendiol **14a** mit rund 21 %. Rund 18 % der Startkonzentration von **2** wurde als Isoeugenol (**7**) detektiert. Während die Konzentrationen von **14a** und **23** im Inkubationsverlauf weiter zunahmen, sank die detektierbare Konzentration von Phenol **7**, was eine Weitermetabolisierung, eventuell über den Chinonmethidweg, vermuten lässt. Der ringhydroxylierte Metabolit **19** wurde in einer geringen Konzentration von 0,39 % nur nach 20 min nachgewiesen, und zwar interessanterweise ohne dass detektierbare Mengen der vermutlichen Vorstufe **20** messbar waren. Die Verbindung bei  $t_R = 7,0$  min konnte nur in einer Inkubation detektiert werden. Ob es sich hier um einen Metaboliten oder eine Verunreinigung handelt, konnte nicht geklärt werden. Anhand des UV-Spektrums handelt es sich hierbei nicht, wie man anhand der Retentionszeit vermuten könnte, um (*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäure (**26**). CYP2A6 generierte nur wenige detektierbare Metaboliten. Jedoch war das Metabolitenprofil breit, d. h. CYP2A6 war prinzipiell in der Lage, alle beobachteten Reaktionen, mit Ausnahme der Oxidation von **12** zu **23** zu katalysieren. Die Gesamtwiederfindung (Substrat + Metaboliten) war ferner bei CYP2A6 im Durchschnitt am niedrigsten. Das Profil der Umsetzung von **2** durch CYP2C19 und CYP2D6 war sehr ähnlich, wobei CYP2C19 etwas aktiver war. Beide Enzyme katalysierten die Reaktion zum Seitenkettenalkohol **12** sehr potent ( $c_{max}$  nach 60 min bei 200  $\mu$ M **2**: 31,7 % 2C19 und 19,1 % 2D6). Die Oxidation zu **23** wurde von beiden Enzymen katalysiert, verlief aber deutlich langsamer und in geringerem Umfang als bei CYP1A2. Die Bildung von **7** und der Diole **14a+14b** war mit jeweils unter 5 % gering. CYP2E1 katalysierte als einziges untersuchtes Enzym die Reaktion von **2** zu Isochavibetol (**9**), wobei die Gesamtmenge gering war. Hauptmetabolit war auch hier **12**, welches nach einstündiger Inkubation fast 16 % der Startkonzentration ausmachte. Die Diole **14a+14b** wurden auch von CYP2E1 gebildet. Deren Konzentrationen lagen im gleichen Bereich wie bei CYP2A6, 2C19 und 2D6; in der Summe unter 4 %. Obgleich vergleichsweise viel **12** gebildet wurde ( $c_{max}$  nach 60 min bei 200  $\mu$ M **2**: 16,3 %), war die quantifizierbare Menge an **23** mit unter 1 % sehr gering. CYP3A4 katalysierte potent und spezifisch die Bildung der Diole **14a+14b**. Deren Anteil machte nach 60 min 24 % aus. Daneben wurde lediglich **12** (1 %) detektiert. **20** war in Konzentrationen unterhalb des LOQ detektierbar. Während CYP1A2 ausschließlich das *threo*-Isomer **14a** bildete, wurden in den anderen untersuchten Supersomes<sup>TM</sup> die beiden möglichen Diastereomere der Diole **14a** und **14b** stets in einem fast konstanten Verhältnis von 1:4 **14b:14a** gebildet. Keines der untersuchten CYPs bildete quantifizierbare Mengen des Phenols **20** bildete, welches einen der Hauptmetaboliten in ARLM darstellte. Lediglich CYP1A2 bildete quantifizierbare Mengen des Isomerisierungsproduktes **19**.

### 5.4.3.4 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in Lebermikrosomen

Die aus verschiedenen lebermikrosomalen Inkubationen mit **2** abgeleiteten enzymkinetischen Parameter sind nachfolgend in Tabelle 26 dargestellt. Die Bildung von Seitenkettenalkohol **12** war in allen untersuchten Lebermikrosomen (LM) die am effizientesten katalysierte Reaktion und somit Hauptmetabolit. Wie auch bei den Inkubationen mit **1** zeigte sich eine veränderte Reaktivität bezüglich der Bildung von **12** in Rattenlebermikrosomen durch die Aroclor 1254-Induktion. Wurde diese Reaktion in RLM am effizientesten mit einer hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeit katalysiert, so war deren Reaktionsgeschwindigkeit bei ARLM rund 90 % kleiner, wenngleich mit einer doppelt so hohen Affinität.

**Tabelle 26.** Bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	MIE-Diol (14)	IE, IC (7, 9)	6-OH-MIE (20)	6-OH-ME (19)	Summe Metaboliten
ARLM	$v_{\max}$ (app)	0,96	0,08	2,31	0,49	1,50	2,58	6,94
	$K_M$ (app)	82,8	9,11	376	158	172	523	243
	$E_{\text{cat}}$ (app)	11,6	9,02	6,13	3,11	8,71	4,93	28,5
RLM	$v_{\max}$ (app)	9,09	0,97	2E+05	0,36	7E+13	nd	11,2
	$K_M$ (app)	194	70,7	3E+07	309	2E+18		196
	$E_{\text{cat}}$ (app)	47,0	13,7	6,27	1,15	0,05		57,3
BLM	$v_{\max}$ (app)	1,74	0,58	12,3	0,18	0,27	nq	6,62
	$K_M$ (app)	82,5	378	3836	119	134		215
	$E_{\text{cat}}$ (app)	21,1	1,53	3,21	1,47	2,00		30,8
SLM	$v_{\max}$ (app)	2,41	0,64	10,9	0,28	0,09	nd	5,06
	$K_M$ (app)	530	461	3425	657	332		426
	$E_{\text{cat}}$ (app)	4,54	1,39	3,18	0,43	0,26		11,9
HLM	$v_{\max}$ (app)	1,78	0,83	3E+14	0,38	nd	nd	5,84
	$K_M$ (app)	108	471	1E+17	95,1			388
	$E_{\text{cat}}$ (app)	16,5	1,76	1,99	4,05			15,1

Inkubationsbedingungen: Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **2**: 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{\max}$  (app): maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}$  (app)/ $K_M$  (app); [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

nq: nicht quantifizierbar

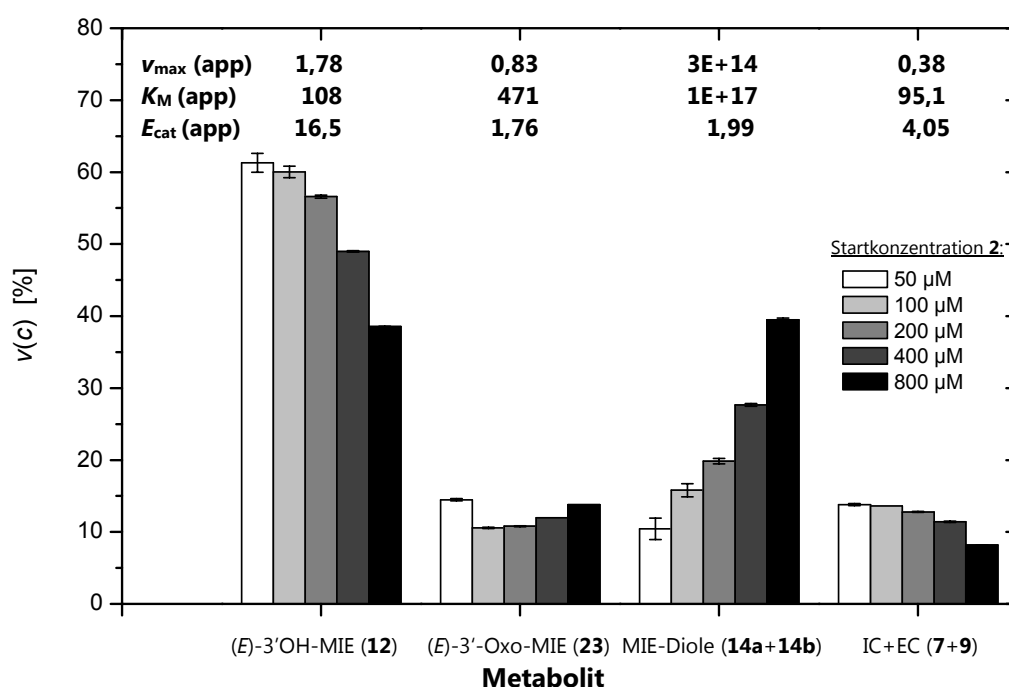
nd: nicht detektierbar

Einhergehend mit der Bildung von **12** war dessen Oxidation zu **23** ebenfalls in RLM und ARLM am effizientesten, wobei besonders hohe Affinitäten für diese Reaktion bestimmt wurden. In den anderen LM war  $v_{\max}$  für die Bildung von **23** nur geringfügig kleiner als in RLM, jedoch mit geringeren  $K_M$ -Werten im Bereich von 400  $\mu\text{M}$ . An dieser Stelle sei allerdings



nochmals darauf hingewiesen, dass die mathematischen Modelle zur Bestimmung der Bildung von **23** die vorgelagerte Reaktion von **2** zu **12** nicht berücksichtigen und die tatsächliche Bildung von **23** deshalb in allen LM vermutlich etwas schneller und mit deutlich höherer Affinität abläuft. Die Diole **14a+14b** wurden ebenfalls am effizientesten in RLM und ARLM gebildet, wobei die Affinität dieser Reaktion in allen untersuchten LM gering war. Mit relativ hoher Affinität aber vergleichsweise geringer maximaler Reaktionsgeschwindigkeit fand in allen LM die O-Demethylierung von **2** zu **7** bzw. **9** statt. Die Ringhydroxylierung zu **20** wurde in allen LM außer HLM beobachtet. Hier waren ARLM mit Abstand am effizientesten. In RLM wurde die Bildung von **20** nur in Inkubationen mit hohen Startkonzentrationen beobachtet, weshalb die bestimmten Parameter wenig aussagekräftig sind. Die einzigen LM, in deren Inkubationen (nach 20 Minuten) die Isomerisierung von **20** zu **19** beobachtet wurde, waren ARLM, wobei diese Reaktion vergleichsweise effizient katalysiert wurde.

Die prozentualen Beiträge der Reaktionsgeschwindigkeiten zum Gesamtmetabolismus von **2** in HLM bei verschiedenen Substratkonzentrationen ist in Abbildung 70 gezeigt.



**Abbildung 70.** Abhängigkeit der Metabolitenbildungsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration: Prozentualer Beitrag der gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten bei gegebener Substratstartkonzentration  $v(c)$  der einzelnen Metaboliten an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit ( $\Sigma v(\text{alle identifizierten Metaboliten})/v(\text{Metabolit } i)$ ) der Reaktionen von HLM mit (*E*-Methylisoeugenol (**2**). Oben: kinetische Parameter  $v_{\max}$ ,  $K_M$  und  $E_{\text{cat}}$ . Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{\max}$  (app): max. apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

Es wird ersichtlich, dass – anders als beim Metabolismus von Methyleugenol (**1**) – hier die Bildung der Seitenkettendirole (**14a** + **14b**) mit steigender Substratkonzentration zunimmt und bei kleinen Substratkonzentrationen gering ist. Gegenteilig verhalten sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der Bildung von **12**, welches mit sinkenden Substratkonzentrationen stärker zum Gesamtmetabolismus beiträgt. Die Beiträge zum Gesamtumsatz von **2** zeigen im Falle von **23** sowie **7** + **9** nur eine geringe Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

In Tabelle 27 sind die prozentualen Werte von  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$  für die Bildung der verschiedenen Metaboliten von **2** in Lebermikrosomen zusammengefasst. Diese Daten verdeutlichen, dass im Falle von **2** zwei Reaktionen eine bedeutende Rolle zukommt: Der Bildung von Alkohol **12** sowie der Bildung der Dirole **14**. Diese Metaboliten weisen in allen untersuchten LM eine starke Abhängigkeit von der Substratstartkonzentration auf. Während bei hohen Substratkonzentrationen ( $v_{\max}$  %) die Bildung der Dirole **14** überwiegt, gewinnt die Bildung von **12** mit sinkenden Substratkonzentrationen zunehmend an Bedeutung, was durch die geringen  $K_M$ -Werte für diese Reaktionen in allen LM zum Ausdruck kommt. Eine Ausnahme bilden ARLM, bei denen die Bildung von **20**, unabhängig von der Substratkonzentration, einen Beitrag von 23–28 % leistet.

**Tabelle 27.** Prozentuale bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Lebermikrosomen.

LM	Parameter	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	MIE-Diol (14)	IE, IC (7, 9)	6-OH-MIE (20)	6-OH-ME (19)
ARLM	$v_{\max}$ (app)	18	2	42	9	28	2
	$E_{\text{cat}}$ (app)	30	23	16	8	23	nb
RLM	$v_{\max}$ (app)	0	0	100	0	nb	nd
	$E_{\text{cat}}$ (app)	69	20	9	2	0	
BLM	$v_{\max}$ (app)	12	4	82	1	2	nd
	$E_{\text{cat}}$ (app)	72	5	11	5	7	
SLM	$v_{\max}$ (app)	17	4	76	2	1	nd
	$E_{\text{cat}}$ (app)	46	14	32	4	3	
HLM	$v_{\max}$ (app)	0	0	100	0	nd	nd
	$E_{\text{cat}}$ (app)	68	7	8	17		

$v_{\max}$  (app): prozentuale maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit

$E_{\text{cat}}$  (app): prozentuale „apparente katalytische Effizienz“

nd: nicht detektierbar;

nb: Wert wurde bei der Berechnung (wegen nicht-realer Enzymsättigung) nicht berücksichtigt

Summen  $\neq$  100 % sind rundungsbedingt.

Es sollte beachtet werden, dass die prozentualen  $v_{\max}$ -Werte für die Bildung der Diole **14** in HLM und RLM mit Werten von 100 % eine rein mathematische Extrapolation für hohe Substratkonzentrationen darstellen, die real wahrscheinlich nicht erreicht werden können und somit andere Reaktionen, wenngleich in geringem Ausmaß, dennoch stattfinden werden.

### 5.4.3.5 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in Cytochrom P450-Enzymen und deren Beteiligung in HLM

In Tabelle 28 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit Supersomes<sup>TM</sup> zusammengefasst. Diese Daten bestätigen quantitativ die bereits aus den Ergebnissen in Kap. 5.4.3.3 ablesbaren Trends.

**Tabelle 28.** Bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup>.

CYP	Parameter	3'-OH-MIE (12)	3'-Oxo-MIE (23)	MIE-Diol (14)	IE, IC (7, 9)	6-OH-MIE (20)	6-OH-ME (19)	Summe Metaboliten
CYP1A2	$k_{\text{cat}}$	22,0	6,73	4E+12	114,8	nd	1E+13	248
	$K_{\text{M}}$	155	108	1E+14	1639		1E+16	1479
	$E_{\text{cat}}$	142	62,4	26,3	70,0		1,02	168
CYP2A6	$k_{\text{cat}}$	0,70	nd	2E+04	1,89	nd	nd	1E+05
	$K_{\text{M}}$	268		8E+03	55,7			1E+04
	$E_{\text{cat}}$	2,61		3093	33,9			8633
CYP2C19	$k_{\text{cat}}$	10,7	wd	2E+03	91,9	nd	nd	9E+05
	$K_{\text{M}}$	13,8		3E+03	2E+04			1E+09
	$E_{\text{cat}}$	773		645	5,2			0,80
CYP2D6	$k_{\text{cat}}$	77	1,56	7E+04	1,67	nd	nd	1E+15
	$K_{\text{M}}$	1491	257	9E+04	203			2E+16
	$E_{\text{cat}}$	51,5	6,07	799	8,22			58
CYP2E1	$k_{\text{cat}}$	4,23	2E+13	6E+03	0,85	nd	nd	7E+15
	$K_{\text{M}}$	156	1E+17	7E+03	132			4E+17
	$E_{\text{cat}}$	27,1	0,15	950	6,42			18,9
CYP3A4	$k_{\text{cat}}$	4,68	wd	33,6	nd	nd	nq	171,5
	$K_{\text{M}}$	502		365				2696
	$E_{\text{cat}}$	9,3		92				64

Inkubationsbedingungen: CYP-Konzentration jeweils 120 nM; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **2**: 50, 100, 200, 500, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_{\text{M}}$ : (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$k_{\text{cat}}$ : Wechselzahl; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{nmol Cytochrom P450})^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$ : „katalytische Effizienz“ =  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ; [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];

nd: Metabolit nicht detektierbar

nq: nicht quantifizierbar

wd: zu wenige Datenpunkte (Metabolit wurde nicht über den gesamten beobachteten Konzentrationsbereich gebildet)

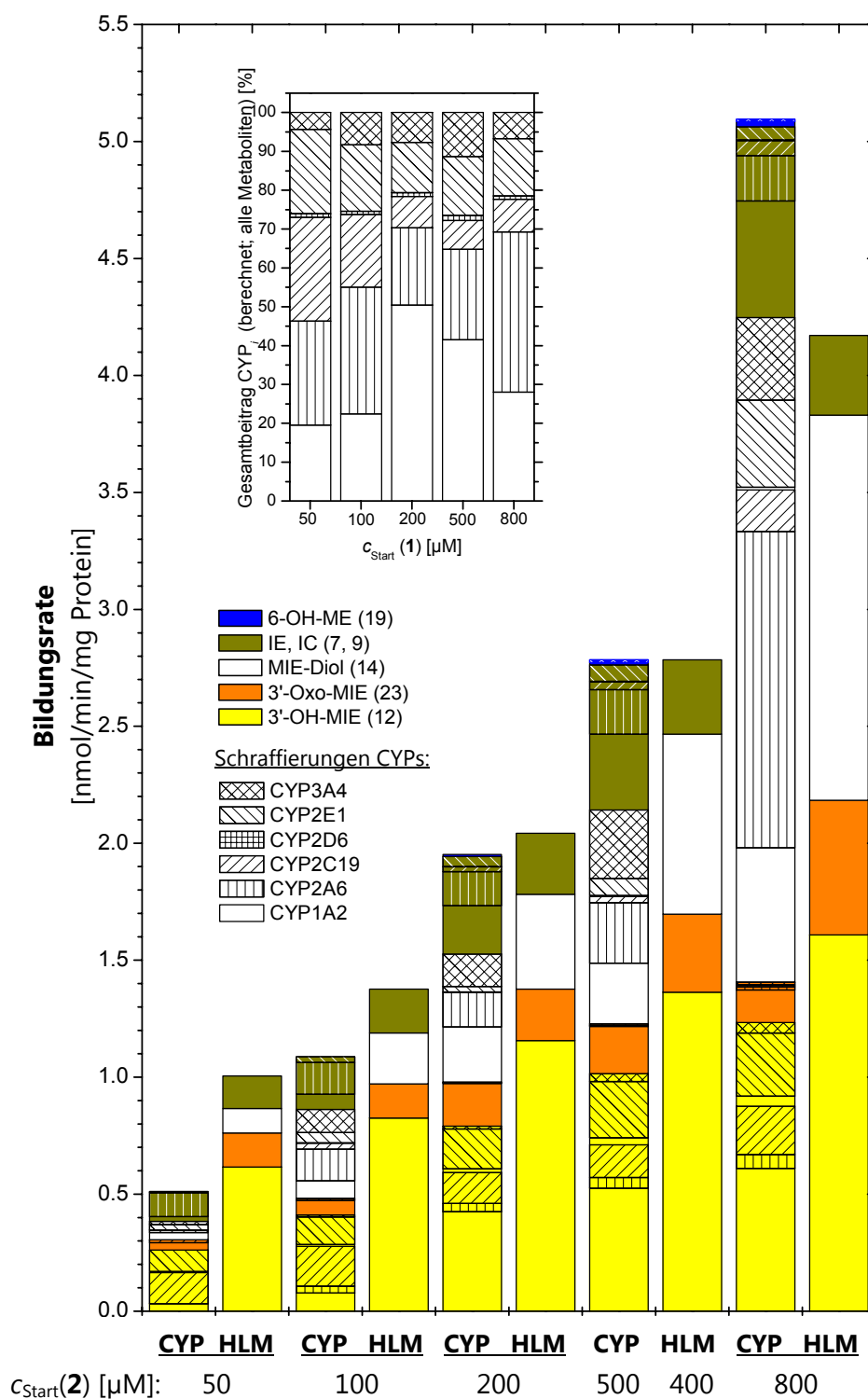
Wie auch in den Inkubationen der Supersomes<sup>TM</sup> mit Methyleugenol (**1**) erwies sich auch für **2** CYP1A2 als metabolischer „*allrounder*“. Lediglich **20** war nach den 20-minütigen Inkubationen in CYP1A2 und allen weiteren CYPs nicht detektierbar. Anstelle dessen wurde durch CYP1A2 bei höheren Konzentrationen von **2** die Bildung **19** von beobachtet, jedoch mit geringer Affinität.

Das quantitative Ausmaß der Beteiligung von CYP1A2 am Metabolismus in HLM **2** (Insert in Abbildung 71) ist geringer als im Falle von Methyleugenol (**1**). Bei geringen Substratkonzentrationen wird eine ausgewogene Beteiligung von jeweils rund 27 % für CYP2A6 und CYP2C19, 22 % für CYP2E1 und 20 % für CYP1A2 vorhergesagt.

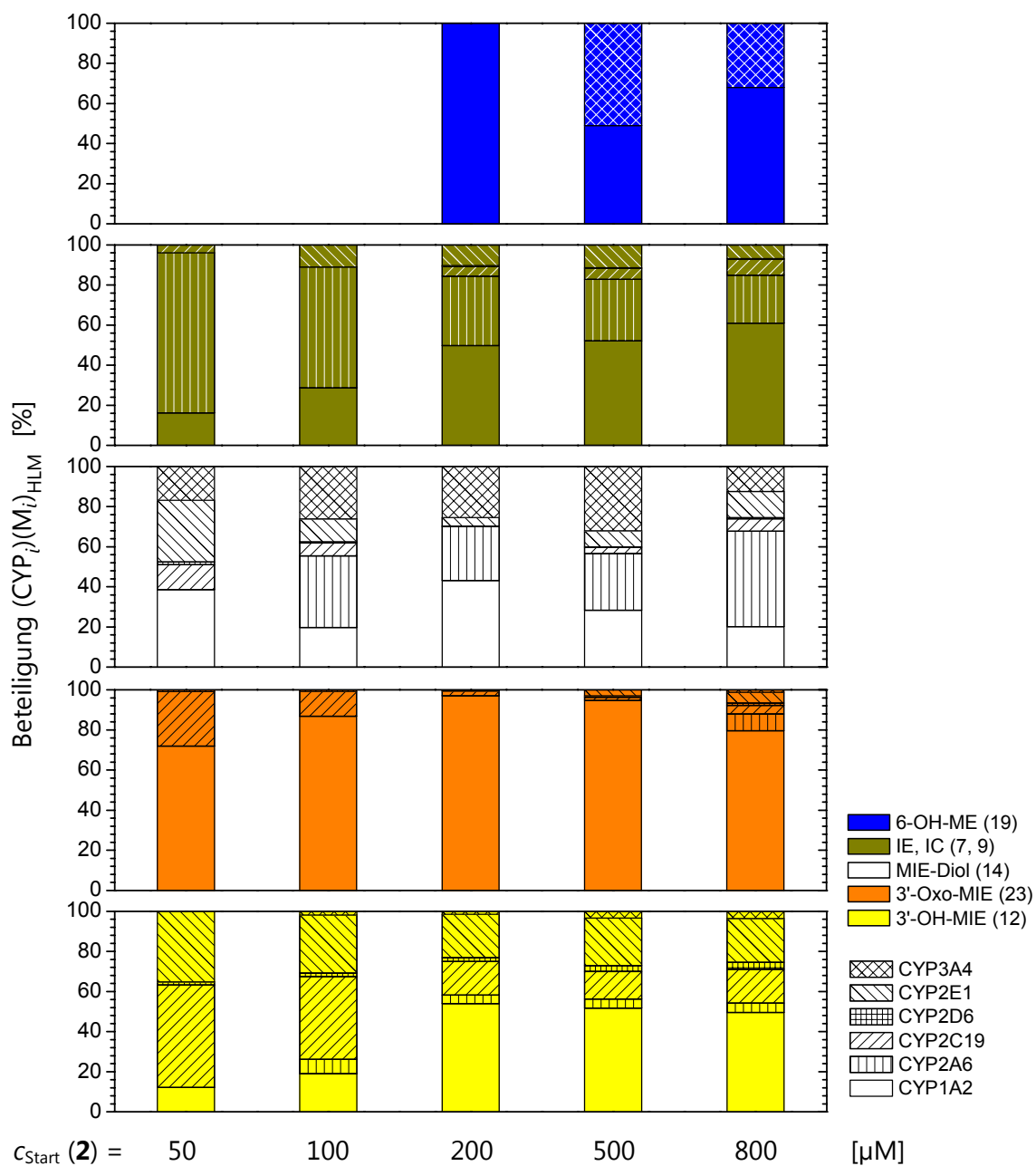
Die Prädiktivität der aus den CYP-Daten abgeleiteten Metabolitenbildungsraten in HLM (Abbildung 71, Seite 157) ist verglichen mit den gemessenen Aktivitäten in HLM insbesondere im mittleren Substrat-Konzentrationsbereich ausgesprochen gut.

Die Daten zur berechneten prozentualen Beteiligung der CYPs an den verschiedenen Reaktionen in HLM (Abbildung 72) weisen darauf hin, dass CYP1A2 bei Substratkonzentrationen oberhalb von 200  $\mu\text{M}$  zu rund 50 % an der Bildung von **12** beteiligt ist. Der Beitrag von CYP1A2 zu dieser Reaktion sinkt im Falle kleiner Substratkonzentrationen von **2** zu Gunsten von CYP2C19 und CYP2E1 deutlich ab. Im Falle sehr geringen, humanrelevanten Konzentrationen bzw. -dosen von **2** ist es somit wahrscheinlich, dass CYP1A2 keine bedeutende Rolle für die Bildung von **12** zukommt, was insbesondere der geringe  $K_M$ -Wert von CYP2C19 für die diese Reaktion widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wird die Reaktion von **12** zum Aldehyd **23** über den gesamten beobachteten Konzentrationsbereich zum Großteil von CYP1A2 katalysiert. Die Extrapolation der Bildungsraten von **23** gegen sehr kleine Substratkonzentration, ergibt eine Beteiligung von rund 60 % für CYP1A2 und 40 % für CYP2C19.

Die Beteiligung der verschiedenen CYPs an der Bildung der Dirole **14** lässt wegen der generell hohen  $K_M$ -Werte für diese Reaktion keinen klaren Trend für deren Beteiligung bei sehr kleinen Konzentrationen von **2** erkennen. Am ehesten kommt CYP3A4 wegen des kleinsten  $K_M$ -Wertes für diese Reaktion in Frage. Die *O*-demethylierten Metaboliten **7** und **9** werden bei geringen Konzentrationen von **2** in HLM zum überwiegenden Teil von CYP2A6 gebildet, wobei **7** in höheren Konzentrationen als **9** gebildet wird. Die Bildung von **20** als auch **19** wird in HLM nur bei hohen Substratkonzentrationen unter Beteiligung von CYP1A2 und CYP3A4 vorhergesagt. Im Falle sehr kleiner Substratkonzentrationen sind diese Metaboliten nicht zu erwarten. Dies entspricht den tatsächlichen Beobachtungen mit HLM.



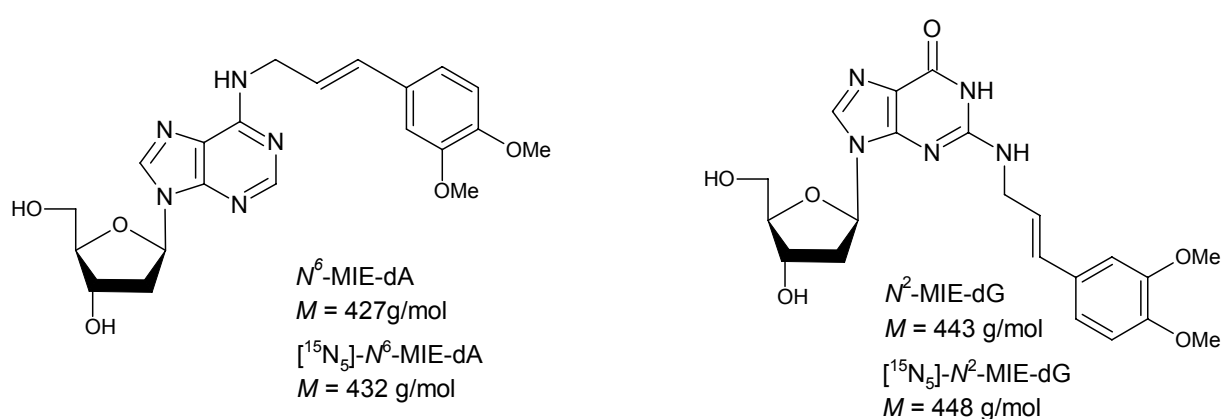
**Abbildung 71.** Vergleich der gemessenen (HLM) und der aus kinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen berechneten Bildungsrate (**CYP**;  $v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)$ ) der Metaboliten von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in humanen Lebermikrosomen. Insert oben links: Berechnete prozentuale Beteiligung aller untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von **2** (Beteiligung (CYP)<sub>HLM</sub>). Die Berechnungen erfolgten nach denen in Kap. 5.4.1.7 aufgeführten Methoden. Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweite bzw. Standardabweichung) entfernt.



**Abbildung 72.** Berechnete prozentuale Beteiligung humaner CYPs an der Bildung der Metaboliten von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in HLM (berechnet nach Gleichung 9, Kap. 5.4.1.7). Zur besseren Übersicht wurden alle Spannweiten entfernt.

#### 5.4.4 Bildung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten durch Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und deren Metaboliten

Die mögliche Rolle von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) als proximales Kanzerogen von Methyleugenol (**1**) wurde bereits tiefgreifend in der Literatur diskutiert (Chan und Caldwell, 1992; Gardner *et al.*, 1997; Jeurissen *et al.*, 2006), auch wenn konkrete Beweise bislang fehlten. Herrmann *et al.* (2011) konnten als erste zeigen, dass beide Enantiomere von **11**, aber auch **12** in der Lage sind im SULT-modifizierten DNA-Addukte zu bilden. Da in unseren mikrosomalen Inkubationen weitere prinzipiell reaktive Metaboliten von **1** nachgewiesen wurden, stellte sich nun die Frage, ob diese Metaboliten zu den adversen Effekten von **1** – neben dem bekannten **11** – beitragen können. Weiterhin stellte sich konkret die Frage nach der DNA-Reaktivität anderer potentiell reaktiver Metaboliten von **1** bzw. deren Fähigkeit, DNA-Addukte *in vitro* zu bilden. Um dies zu untersuchen, wurden primäre Rattenhepatozyten (pRH) mit den beiden Substanzen Methyleugenol **1** und Methylisoeugenol **2** sowie deren synthetisierten Metaboliten **11**, **12**, **15**, **19**, **22** und **23** in höchstmöglichen, nicht zytotoxischen Konzentrationen für zwei und zwölf Stunden inkubiert. Hiernach wurde die DNA isoliert, in Nukleoside gespalten, mit isotopenmarkiertem Standard versetzt und eine definierte Menge (gleicher ursprünglicher DNA-Gehalt) auf die Bildung der DNA-Addukte  $N^6$ -(*trans*-Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyadenosin ( $N^6$ -MIE-dA) und  $N^2$ -(*trans*-Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin ( $N^2$ -MIE-dG), bzw. analoge Addukte mittels einer etablierten UPLC-MS/MS-Methode hin untersucht. Die Struktur der Addukte ist in Abbildung 73 wiedergegeben.



**Abbildung 73.** Strukturen der untersuchten DNA-Addukte gebildet bei der Inkubation von Methyleugenol (**1**) bzw. Metaboliten von **1** und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) mit DNA. Links:  $N^6$ -(*trans*-Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyadenosin ( $N^6$ -MIE-dA); rechts:  $N^2$ -(*trans*-Methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin ( $N^2$ -MIE-dG) sowie die molaren Massen  $M$  der Addukte und der zugehörigen Stickstoff-isotopenmarkierten internen Standards.

In Tabelle 29 sind die Ergebnisse dieser Arbeiten dargestellt. Die abgebildeten Daten wurden nicht alleine durch den Autor dieser Arbeit erarbeitet. Die Daten zur Zytotoxizität wurden hauptsächlich von Lucas W. Weishaupt im Rahmen seiner Diplomarbeit unter Betreuung des Autors erhoben (Weishaupt, 2011; Cartus *et al.*, 2012).

**Tabelle 29.** Zytotoxizität und Anzahl der detektierten DNA-Addukte nach Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und deren Phase-I-Metaboliten.<sup>a</sup>  
Aus: Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

Behandlung	Zytotoxizität <sup>d</sup>		Inkubations- konzentration [ $\mu$ M]	Addukte pro $10^8$ Nukleoside			
	LDH-leakage EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M], 24 h	Resazurin		2 h		12 h	
				N <sup>6</sup> -MIE-dA	N <sup>2</sup> -MIE-dG	N <sup>6</sup> -MIE-dA	N <sup>2</sup> -MIE-dG
ohne				–	–	–	–
ME ( <b>1</b> )	> 2000	307 $\pm$ 52	250	–	20 $\pm$ 6	4 $\pm$ 0	193 $\pm$ 14
MIE ( <b>2</b> )	–	164 $\pm$ 48	250	–	–	–	–
1'-OH-ME ( <b>11</b> )	93 $\pm$ 33	46 $\pm$ 14	25	9 $\pm$ 5	668 $\pm$ 108	21 $\pm$ 5	1026 $\pm$ 157
1'-Oxo-ME ( <b>22</b> )	116 $\pm$ 13	13 $\pm$ 0.5	2.5	–	–	–	–
3'-OH-MIE ( <b>12</b> )	1183 $\pm$ 238	1397 $\pm$ 350	200	–	30 $\pm$ 4	–	–
3'-Oxo-MIE ( <b>23</b> )	1478 $\pm$ 422	328 $\pm$ 58	375	–	21 $\pm$ 7	–	27 $\pm$ 6
6-OH-ME ( <b>19</b> ) <sup>b</sup>	550 $\pm$ 65	463 $\pm$ 26	75	–	–	–	–
ME-Epoxid ( <b>15</b> ) <sup>c</sup>	1342 $\pm$ 453	310 $\pm$ 2.8	100	–	–	–	–

<sup>a</sup> Die Zellen wurden den verschiedenen Substanzen für 2 oder 12 h exponiert. Die angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von drei unabhängigen Inkubationen (Hepatozyten von drei verschiedenen Tieren). – Anzahl unterhalb des LOQ (3 bzw. 12 Addukte pro  $10^8$  Nukleoside für N<sup>6</sup>-MIE-dA bzw. N<sup>2</sup>-MIE-dG).

<sup>b</sup> 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) kann möglicherweise Addukte bilden, die sich von den hier untersuchten wegen der zusätzlichen Sauerstofffunktion in Position 6 unterscheiden. Deshalb wurden die erhaltenen Nukleoside zusätzlich auf das Vorhandensein von Produkten mit *m/z*-Übergängen von 444  $\rightarrow$  328 (dA Addukte) und 460  $\rightarrow$  344 (dG Addukte) untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren negativ.

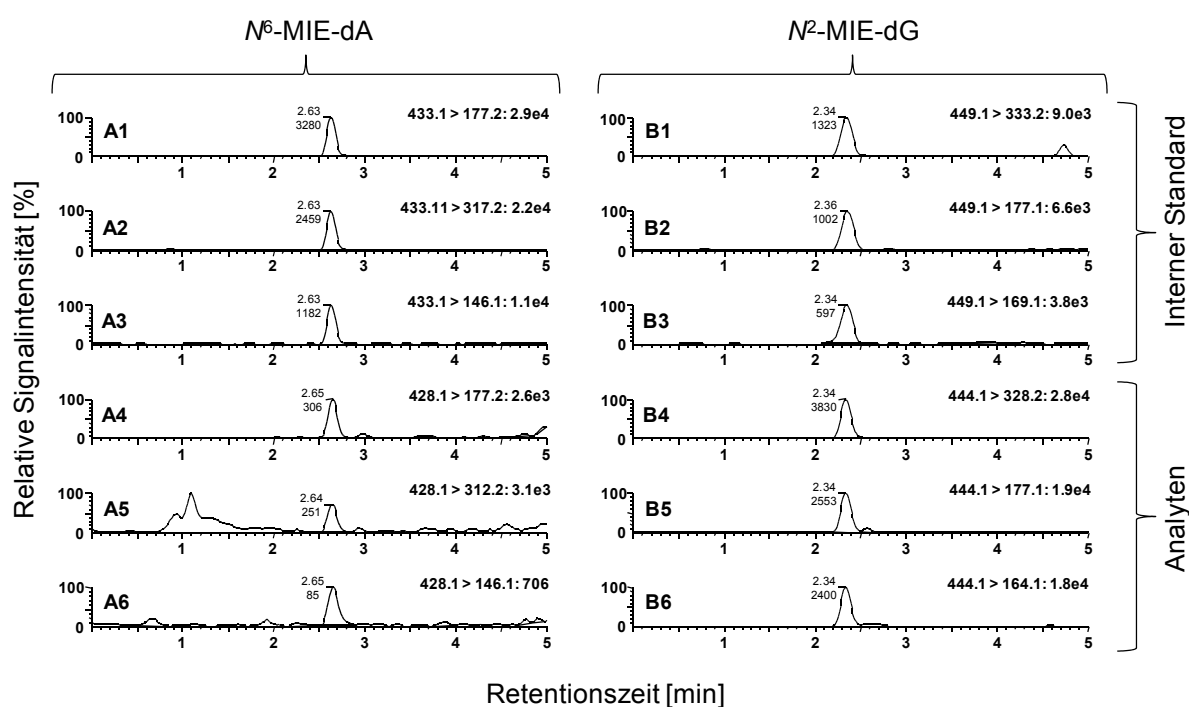
<sup>c</sup> Die Reaktion des Epoxids **15** mit nukleophilen DNA-Bereichen könnte zu Addukten führen, die sich von den hier untersuchten durch das Vorhandensein eines weiteren Sauerstoffatoms und zwei Wasserstoffatomen unterscheiden. Deshalb wurden die erhaltenen Nukleoside zusätzlich auf das Vorhandensein von Produkten mit *m/z*-Übergängen von 446  $\rightarrow$  330 (dA Addukte) und 462  $\rightarrow$  346 (dG Addukte) untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren negativ.

<sup>d</sup> LDH-leakage: L-Lactatdehydrogenase-*leakage assay*; Resazurin: Resazurinreduktionstest

Die Generierung und Charakterisierung (DNA-Gehalte) der Proben erfolgte an der TU Kaiserslautern durch den Autor dieser Arbeit. Die weiteren Arbeiten (Verdau der DNA in Nukleoside und Messung der DNA-Addukte) wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Ernährungstoxikologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hansruedi Glatt, Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, nach deren Methode (Herrmann *et al.*, 2012) durchgeführt: Die Probenvorbereitung (Verdau der genomischen DNA in Nukleoside) erfolgte durch Frau Dipl. Chem. Kristin Herrmann, die Messung der Proben mittels UPLC erfolgte durch Herrn Dr. Wolfram Engst. Ein beispielhaftes Set an Massenspuren ist in Abbildung 74 gezeigt. Nach Inkubation von pRH mit **1** wurden DNA-Addukte mit dG sowohl nach zwei, als auch nach zwölf Stunden detektiert, während die dA-Addukte nur nach zwölf Stunden und in einer Menge knapp oberhalb des LOQ nachgewiesen wurden. Das proximale Kanzerogen **11** bildete, insbesondere unter Berücksichtigung der zehnfach niedrigeren Inkubationskonzentration (25  $\mu$ M) im Vergleich zur Inkubation mit **1** (250  $\mu$ M), die mit Abstand meisten DNA-Addukte, sowohl mit dA als auch dG. Nach zwei Stunden Inkubationsdauer mit **11** wurden 334-mal mehr dG-Addukte



als bei Inkubation mit der Muttersubstanz **1** detektiert. Nach zwölf Stunden wurden immer noch rund 53-mal mehr dA- und dG-Addukte bei der Inkubation mit **11** im Vergleich zur Inkubation mit **1** gebildet. Wenige DNA-Addukte wurden ebenfalls mit den propenylischen Verbindungen (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**) und (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) gebildet, wobei beide Metaboliten in vergleichsweise hohen Konzentrationen (200 und 375  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurden. Während nach Inkubation von pRH mit **23** nach zwei und zwölf Stunden wenige dG-Addukte detektiert wurden, waren bei den Inkubationen mit **12** lediglich nach zwei, nicht jedoch nach zwölf Stunden Inkubationsdauer DNA-Addukte mit dG nachweisbar.



**Abbildung 74.** Massenspektren ( $\text{ESI}^+$ ) von drei charakteristischen Übergängen der dA- (links) und dG-Addukte (rechts) aus verdauter DNA von mit 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**; 25  $\mu\text{M}$ ; 12 h) inkubierten primären Rattenhepatozyten. Die Massenspektren 1–3 zeigen die Übergänge des isotonenmarkierten Standards, die Massenspektren 4–6 die der Analyten. Die Übergänge 1 und 4 dienten jeweils als Quantifier. Die verwendete MRM-Methode ist im Anhang dieser Arbeit und in Herrmann *et al.*, 2012, 2013 näher erläutert. Abbildung modifiziert aus Cartus *et al.*, 2012, *Toxicol Sci*, 129, 1, 21-34.

Nach Inkubationen von pRH mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und weiteren Metaboliten von **1** (**22**, **15** und **19**) konnten zu keinem Zeitpunkt Addukte mit dA oder dG nachgewiesen werden. Epoxid **15** und Phenol **19** würden, wegen der zusätzlichen Sauerstofffunktion(en) zu anderen DNA-Addukten als  $N^2$ -MIE-dG und  $N^6$ -MIE-dA führen würden. Die Suche nach DNA-Addukten der entsprechenden Massen lieferte jedoch negative Ergebnisse, wobei beachtet werden muss, dass für diese Addukte keine Standards verfügbar waren und somit auch keine Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen für etwaige DNA-Addukte bestimmt werden konnten.

---

### 5.4.5 Metabolismus von Asaron-Isomeren

Die propenylischen Verbindungen  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**), erwiesen sich im Tierversuch an Mäusen als hepatokanzerogen (Wiseman *et al.*, 1987), während für  $\gamma$ -Asaron (**5**) bislang keine Kanzerogenitätsstudien vorliegen. Diese Kanzerogenität von **3** und **4** ist insofern ungewöhnlich, als dass die Mehrzahl der bisher untersuchten propenylischen PP nicht kanzerogen war. Wiseman *et al.* (1987) zeigten weiterhin, dass die vorherige Gabe von Pentachlorphenol (PCP), welches einen potenten Hemmstoff verschiedener fremdstoffmetabolisierender Sulfotransferasen (SULT) darstellt, keinen Effekt auf die Lebertumorinzidenz der mit **3** oder **4** behandelten Tiere hatte. Daraus ist zu folgern, dass der Kanzerogenität der Asarone ein anderer, bislang unbekannter Mechanismus als bei Methyleugenol (**1**), Estragol oder Safrol zu Grunde liegen muss. Ferner scheint die direkte Bildung eines 1'-Hydroxyderivates (welche die proximalen Kanzerogene kanzerogener, allylischer PP darstellen) aus propenylischen PP unwahrscheinlich, was ebenfalls einen anderen Mechanismus favorisiert.

Die gezeigte Isomerisierung von (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**), welches eine *trans*-konfigurierte Propenylseitenkette besitzt, zu der allylischen Verbindung 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) im Zuge der Untersuchungen des hepatischen Metabolismus von Methyleugenol (**2**; Kap. 5.4.3) führte zu der Frage, ob die propenylischen Asaron-Isomere **3** und **4** einer vergleichbaren Isomerisierungsreaktion im hepatischen Metabolismus unterliegen könnten. Da diese Isomerisierung bislang ausschließlich bei **20** beobachtet wurde, schien eine Beteiligung der Sauerstofffunktion in Position 6 (Hydroxygruppe) in diesem Molekül eine wesentliche Voraussetzung für die Katalyse dieser Reaktion zu sein. Da Asarone in Position 6 ebenfalls eine Sauerstofffunktion besitzen (Methoxygruppe), ist diese Voraussetzung auch hier gegeben zu sein. Es stellte sich die Frage, ob die Asaron-Isomere **3** und **4** möglicherweise ein 1'-Hydroxyderivat bilden könnten, welches im Zuge des Fremdstoffmetabolismus über den klassischen Weg allylischer PP aktiviert würde oder ob es andere reaktive Metaboliten gibt, die für einen alternativen Mechanismus der Kanzerogenese der Asarone **3** und **4** verantwortlich sein könnten.

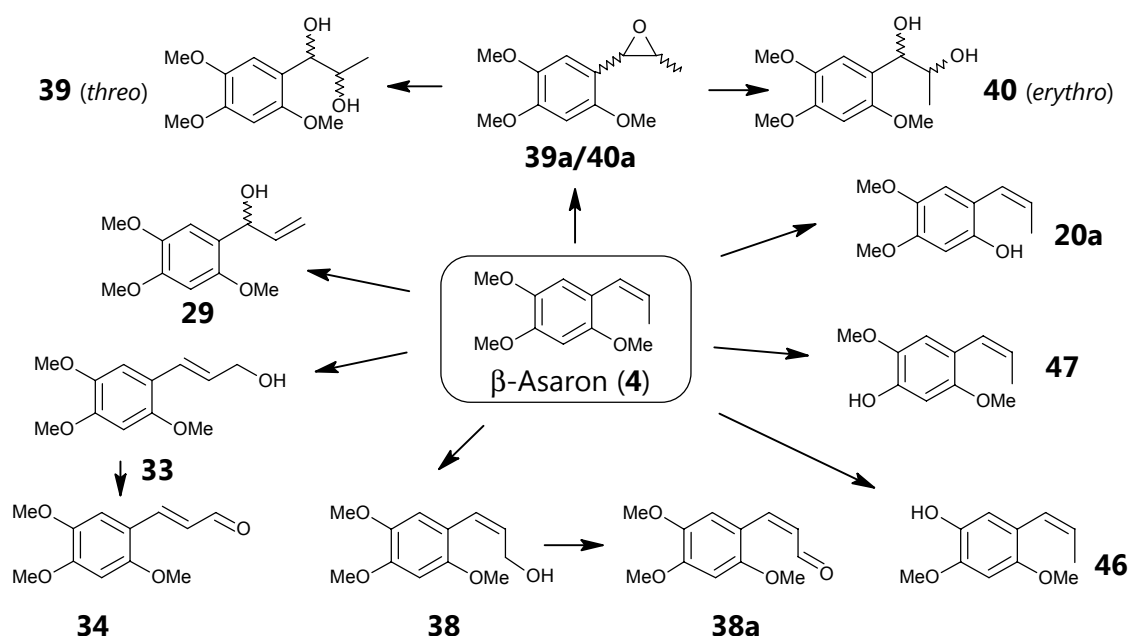
Da zu  $\gamma$ -Asaron (**5**) bislang nahezu keine toxikologischen Studien vorliegen, wurde es als Verbindung unbekannter Kanzerogenität, in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen.

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zum Metabolismus der Asaron-Isomere **3–5** gezeigt.

## 5.4.6 Metabolismus von $\beta$ -Asaron (4)

### 5.4.6.1 Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\beta$ -Asaron (4)

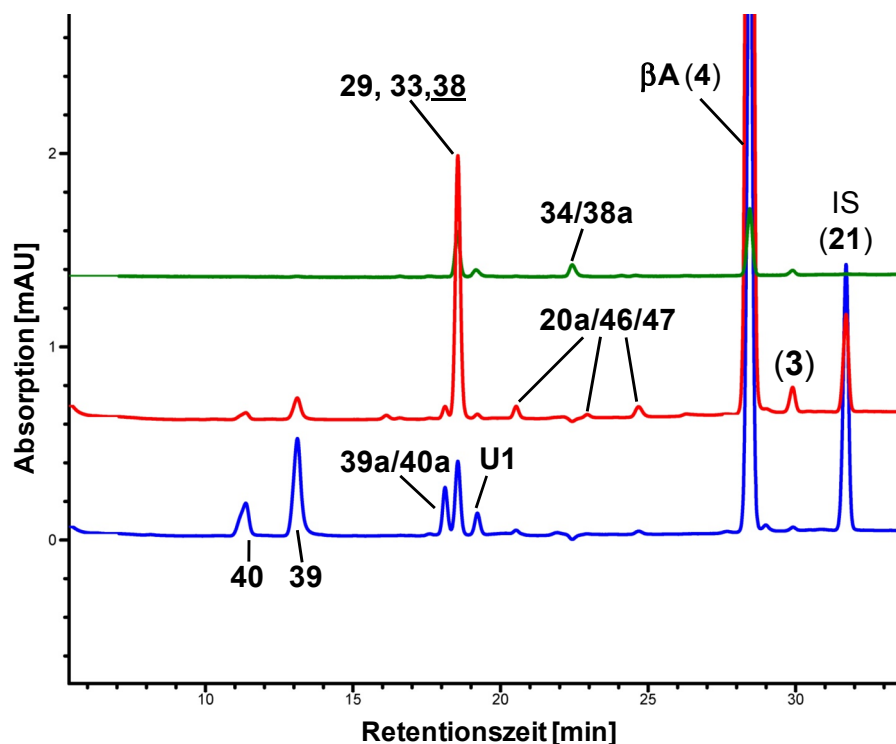
Die  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchung der Metaboliten von  $\beta$ -Asaron (4) wurde (zeitlich) vor den Untersuchungen zum Metabolismus von  $\alpha$ -Asaron (3) durchgeführt. Demzufolge werden zunächst die Ergebnisse von  $\beta$ -Asaron dargestellt. Abbildung 75 zeigt die  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch identifizierte Metaboliten (29, 33, 34, 38, 39, 40) sowie anhand von Analogieschlüssen mutmaßlich gebildeten Metaboliten der Inkubation von ARLM mit  $\beta$ -Asaron (4). Hierzu wurde wie bei Methyleugenol (1) vorgegangen, was in Kapitel 7.5.4 näher beschrieben ist (Startkonzentration 4 = 1,2 mM; Inkubationsdauer = 10 h). Repräsentative UV-Chromatogramme der Inkubation von ARLM mit 4 sind in Abbildung 76 wiedergegeben.



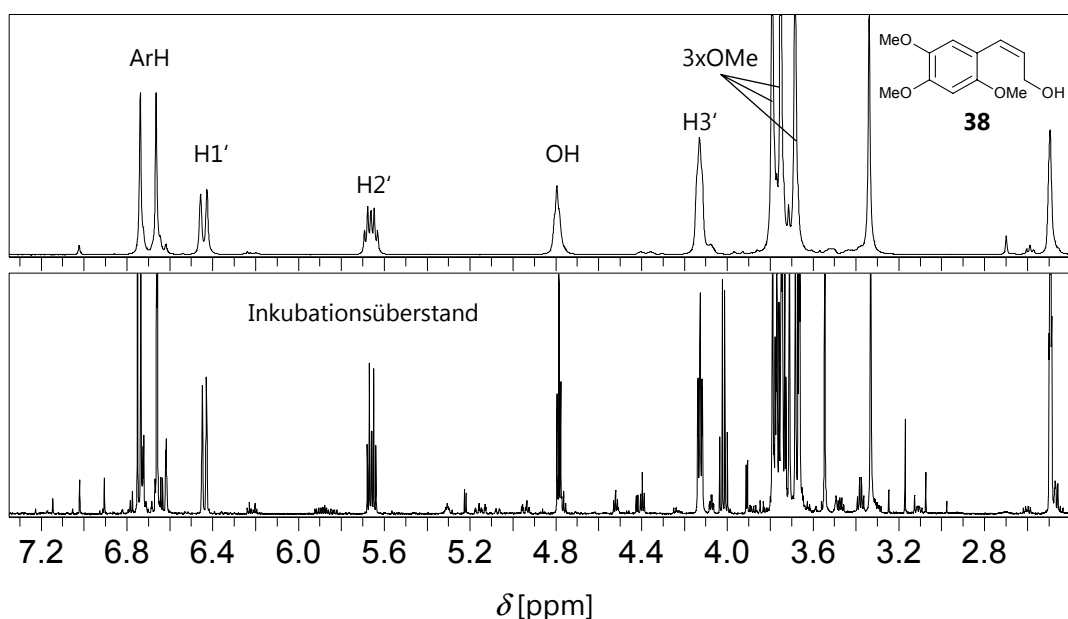
**Abbildung 75.** Identifizierte und mutmaßlich gebildete Metaboliten (20a, 46, 47) der Inkubationen von Lebermikrosomen mit  $\beta$ -Asaron (4).

### Seitenkettenalkohole 38, 33 und 29

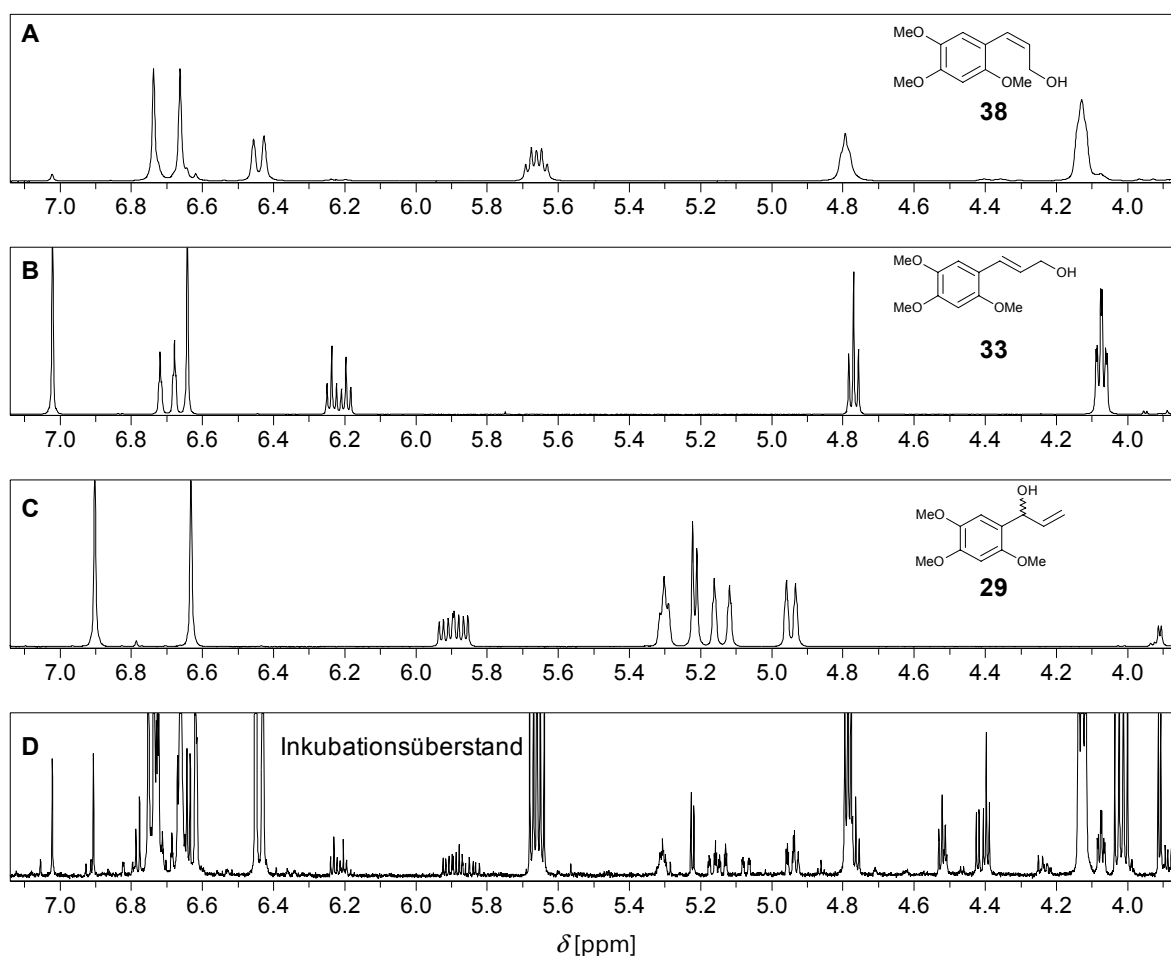
Die Abbildungen 77 und 78 zeigen die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Fraktion des Inkubationsüberstandes von ARLM mit 4, welche zwischen  $t_R = 18$ –19 min eluiert. Der Peak bei  $t_R = 18,6$  min (in Abbildung 76 mit 29, 33, 38 beschriftet), wird von drei koeluiierenden Verbindungen verursacht. In der höchsten Konzentration konnte der *cis*-konfigurierte Seitenkettenalkohol (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (38) nachgewiesen werden (Abbildung 77). Im gleichen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten neben 38 in geringeren Konzentrationen sowohl das *trans*-Isomer (*E*)-3'-Hydroxyasaron (33) als auch das allylische 1'-Hydroxyasaron (29) nachgewiesen werden (s. Abbildung 78).



**Abbildung 76.** HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten des Inkubationsüberstandes der Reaktion von ARLM mit  $\beta$ -Asaron (**4**, Startkonzentration 400  $\mu$ M; Inkubationsdauer 20 min) bei verschiedenen Messwellenlängen:  $\lambda = 280$  nm (blau); 261 nm (rot); 340 nm (grün). Referenzwellenlängen:  $\lambda = 360, 360$  und 450 nm. Konzentration des internen Standards (**21**) 67  $\mu$ M. Die Substanznummern sind in Abbildung 75 und in der dieser Arbeit vorangestellten Substanzübersicht erläutert.



**Abbildung 77.** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (oben: **38**, synthetisiert, NMR-Spektrum Nr. PAC99) und des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 18$ –19 min aus der Inkubation von ARLM mit **4** (unten; NMR-Spektrum Nr. PAC122).



**Abbildung 78.** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der synthetisierten Verbindungen **38** (A; NMR-Spektrum Nr. PAC99), **33** (B; NMR-Spektrum Nr. PAC100), **29** (C; NMR-Spektrum Nr. PAC71) und dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 18\text{--}19$  min aus der Inkubation von **ARLM** mit **4** (D; NMR-Spektrum Nr. PAC122).

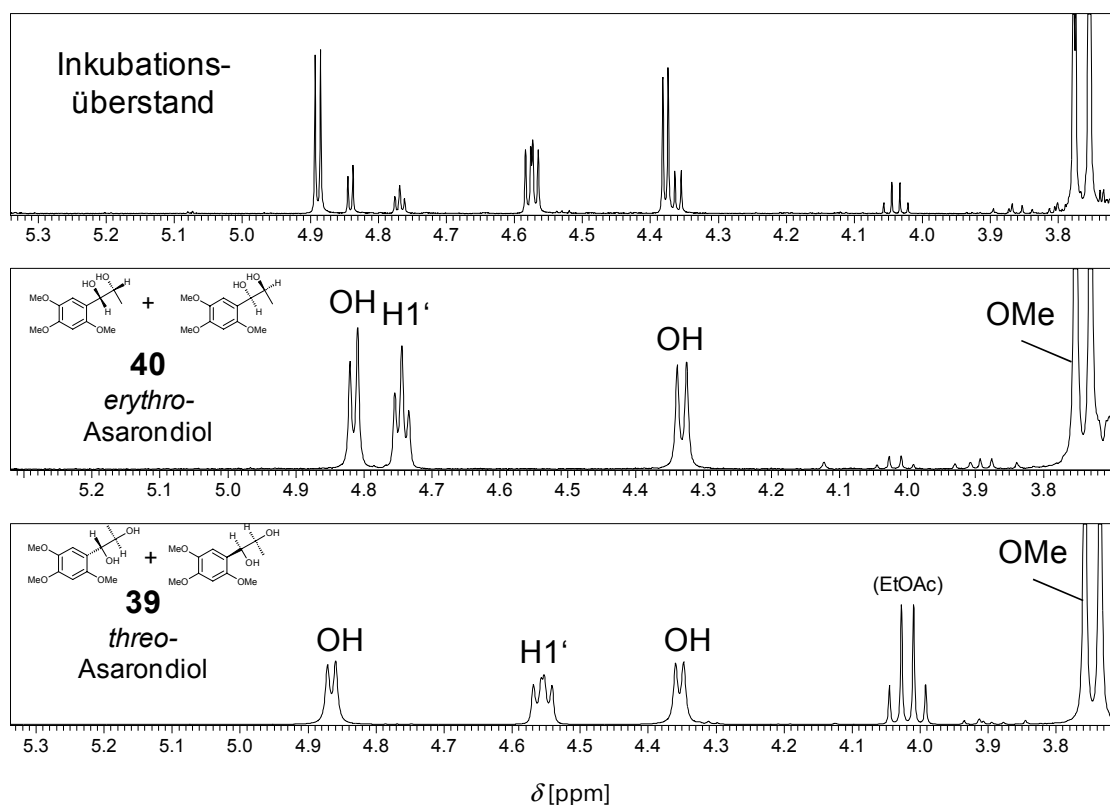
Die Anteile der drei Seitenkettenalkohole im abgebildeten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum betragen 70 % **38**, 18 % **29** und 12 % **33**. In Übereinstimmung damit erzeugte dieser Peak bei der massenspektrometrischen Untersuchung nur ein Hauptmassensignal von  $m/z = 207,2$ , was dem Fragment  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  aller drei Verbindungen entspricht, wohingegen der Molekülpeak von  $[\text{M}+\text{H}]^+$  nur in sehr geringer Intensität detektiert wurde. Dieses Verhalten deckt sich mit den Daten aller drei Referenzsubstanzen.

Die direkte Bildung von 1'-Hydroxyasarone (**29**) aus **4** ist ein relativ überraschender Befund, konnte aber zweifelsfrei bewiesen werden. Inkubationen von synthetischem **38** bzw. **33** mit **ARLM** lieferten keinen Hinweis auf eine durch enzymatische Isomerisierung stattfindende Bildung von **29**.

### Seitenkettendiole **39** und **40**

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden synthetisierten Diole **39** und **40** und das Spektrum des Inkubationsüberstandes im betreffenden Elutionsbereich ( $t_R = 11\text{--}14$  min) sind in Abbildung 79 gezeigt.

Somit konnte die Identität der beiden Peaks bei  $t_R = 11,3$  und  $13,1$  min zweifelsfrei geklärt werden. Die Massensignale, UV-Spektren und Retentionszeiten beider Verbindungen (bzw. Peaks) stimmen mit denen der synthetisierten Referenzsubstanzen überein.

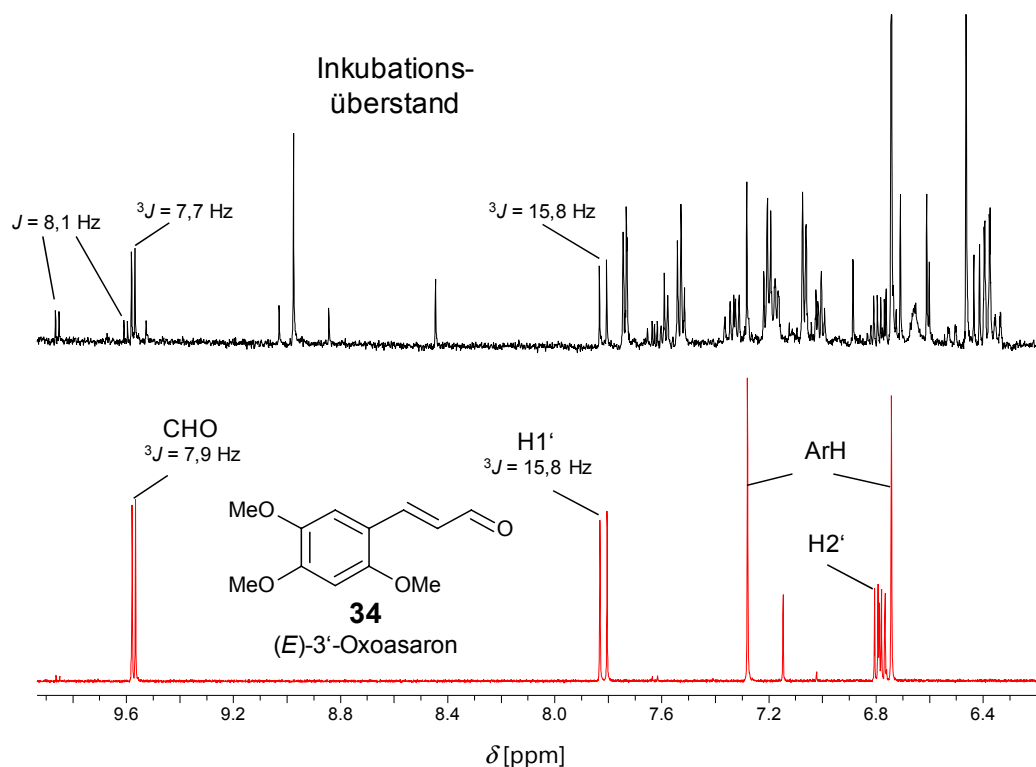


**Abbildung 79.** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 11$  bis 14 min aus der Inkubation von ARLM mit **4** (oben, NMR-Spektrum Nr. PAC121), Mitte: *erythro*-Asaron-Diol **40** (synthetisiert, NMR-Spektrum Nr. NS41) und unten: *threo*-Asaron-Diol **39** (synthetisiert, NMR-Spektrum Nr. NS42).

### Oxo-Verbindungen **34** und **38a**

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Fraktion im Elutionsbereich zwischen  $t_R = 21,5\text{--}23,0$  min ist in Abbildung 80 (Seite 167) dargestellt. Bei  $t_R = 22,4$  min erkennt man im UV-Chromatogramm (Abbildung 76) bei den Messwellenlängen von  $\lambda = 230$  und  $280$  nm einen negativen Peak. Dieser Peak erzeugt ein für Carbonylverbindungen typisches UV-Spektrum und konnte durch Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von synthetisiertem **34** und dem Inkubationsüberstand eindeutig (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) zugeordnet werden. Im gleichen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung

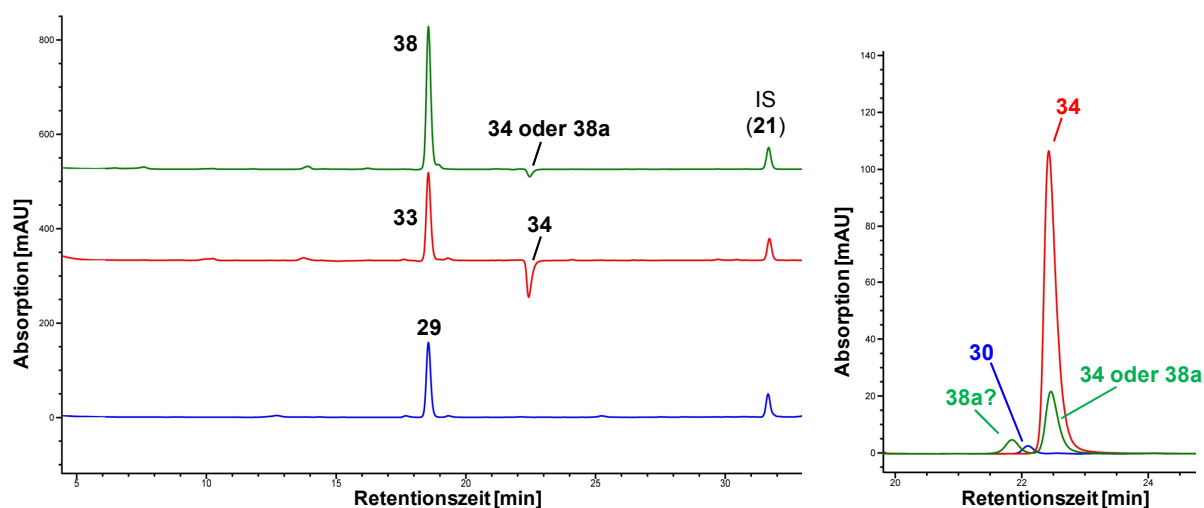
80 oben) sind zwei weitere Dubletts bei  $\delta = 9,60$  und  $9,86$  ppm mit einer Kopplungskonstante von je  $J = 8,04$  Hz zu erkennen, welche wahrscheinlich ebenfalls von Aldehydprotonen erzeugt werden. Eines dieser Signale könnte (*Z*)-3'-Oxoasaron (**38a**) zugeordnet werden. Dafür spricht, dass im Bereich der zu erwartenden H1' und H2'-Protonen von **38a** mehrere Signale, mit Kopplungskonstanten im Bereich von  $J = 11$ – $13$  Hz liegen, wie sie bei einer *cis*-Konfiguration auftreten. Eine genaue Zuordnung ist wegen der schlecht integrierbaren Signale aufgrund der geringen Konzentrationen nicht möglich. Wenn **38a** gebildet wurde, so beträgt dessen relative Konzentration maximal 27 % von der für **34** bestimmten Menge (anhand des Integrals der Aldehydprotonen im NMR-Spektrum). Um dies näher zu untersuchen, wurden ARLM für zwei Stunden jeweils mit den drei Seitenkettenalkoholen **29**, **33** und **38** inkubiert (Abbildung 81). Als Hauptprodukte dieser Reaktion wurden die korrespondierenden Oxo-Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen identifiziert.



**Abbildung 80.** Ausschnitte der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 21,5$  bis  $23,0$  min aus der Inkubation von ARLM mit **4** (oben, NMR-Spektrum Nr. PAC124-2) und (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**, unten, synthetisiert, Datei PAC84).

Während in Inkubationen mit 1'-Hydroxyasaron (**29**) sehr wenig 1'-Oxoasaron (**30**;  $t_R = 22,1$  min) gebildet wurde, konnten rund 27 % des eingesetzten (*E*)-3'-Hydroxyasarons (**33**) in oxidierte Form als (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**;  $t_R = 22,4$  min) wiedergefunden werden. (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (**38**) wurde mäßig umgesetzt. In Abbildung 81 (rechts) sieht man, dass hier zwei Verbindungen bei  $t_R = 21,8$  und  $22,4$  min gebildet wurden, die anhand ihrer UV-Spektren beide eine Carbonylfunktion besitzen. Bei der Verbindung mit  $t_R = 21,8$  min könnte

es sich folglich um (*Z*)-3'-Oxoasaron **38a** handeln und bei  $t_R = 22,4$  min um **34**. Dafür spricht, dass das UV-Spektrum des Peaks bei  $t_R = 22,4$  min identisch mit dem von **34** ist ( $\lambda_{\max} = 246, 301, 372$  nm). Die Verbindung bei  $t_R = 21,8$  min weist ein UV-Spektrum mit Banden bei  $\lambda_{\max} = 260, 294$  und  $372$  nm auf. Eine einfache Erklärung für einen Mechanismus, der eine Isomerisierung der Substrat-Alkohole **29**, **33** und **38** (Abbildung 81) bewirkt, gibt es allerdings nicht. Eine weitere Möglichkeit ist, dass **34** und **38a** – wie die Alkohole – koeluierten und zufällig ebenfalls keine Unterschiede in den UV-Spektren aufweisen und die Verbindung bei  $t_R = 21,8$  min somit ein neuer, unbekannter Metabolit ist. Das Ausmaß der mikrosomalen Oxidation der Seitenkettenalkohole nahm in folgender Reihenfolge zu: **29**  $\ll$  **38**  $<$  **33**. Es bleibt festzuhalten, dass, obwohl **38** den Hauptmetaboliten der Inkubation von ARLM mit  $\beta$ -Asaron (**4**) darstellt und die Menge von **33** fünffach geringer war, die von **33** abgeleitete Oxoverbindung **34** in höheren Konzentrationen detektiert wurde. Weiterhin war 1'-Oxoasaron (**30**) nicht detektierbar, auch wenn 1'-Hydroxyasaron (**29**) 18 % der Seitenkettenalkohole bei der Inkubation von ARLM mit  $\beta$  **4** ausmachte.

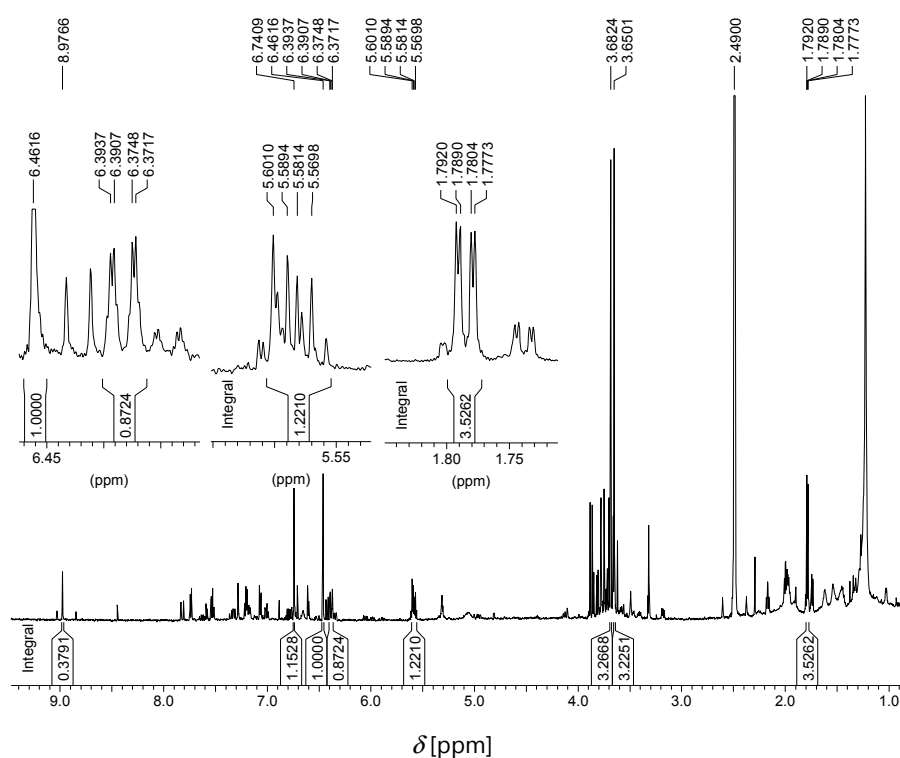


**Abbildung 81.** HPLC-UV-Chromatogramme der Überstände von Inkubationen von **29** (blau), **33** (rot) bzw. **38** (grün) (Startkonzentration jeweils  $500 \mu\text{M}$ ) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen über einen Zeitraum von 2 h bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 280$  nm (links,  $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm) und Ausschnitt zwischen  $t_R = 20$ – $25$  min bei einer Detektionswellenlänge von  $\lambda = 340$  nm (rechts,  $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm).

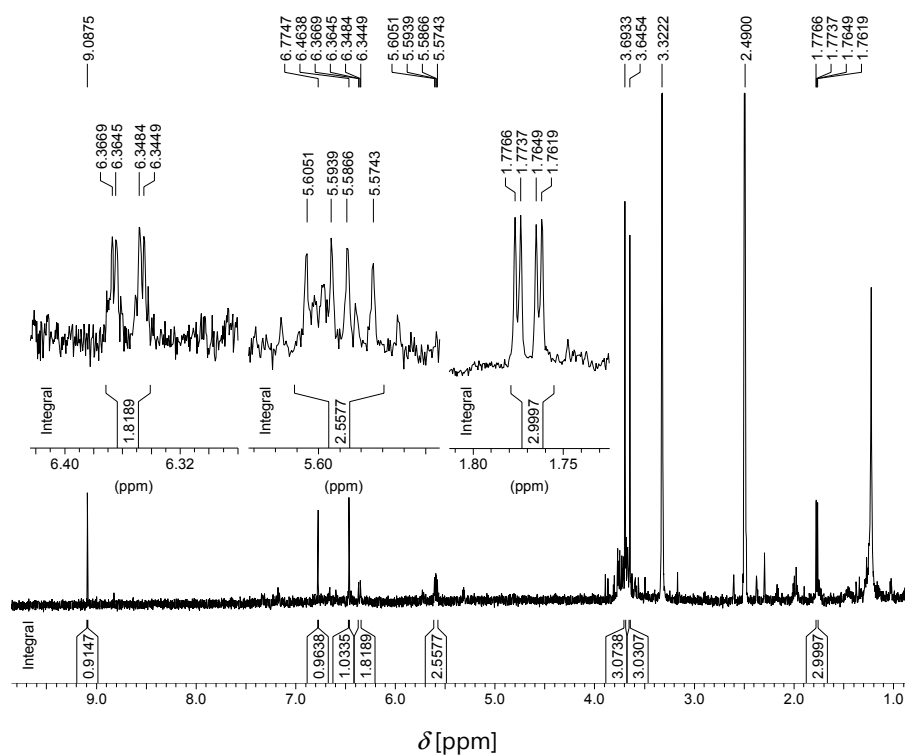
### Demethylierte $\beta$ -Asaron-Derivate **20a**, **46** und **47**

Im Chromatogramm aus Abbildung 76 wurden drei Verbindungen bei Retentionszeiten von  $t_R = 20,7$ ;  $23,1$  und  $24,8$  min mit identischem propenylischem UV-Spektrum ( $\lambda_{\max} = 250, 302$  nm) detektiert. Diese wurden als *O*-demethylierte  $\beta$ -Asanderivate **20a**, **46** und **47** charakterisiert. In den beiden nachfolgenden Abbildungen 82 und 83 sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren im entsprechenden Retentionsbereich dargestellt.





**Abbildung 82.** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 21,5$  bis  $23,0$  min aus der Inkubation von ARLM mit **4** (NMR-Spektrum Nr. PAC124-2; 600 MHz).

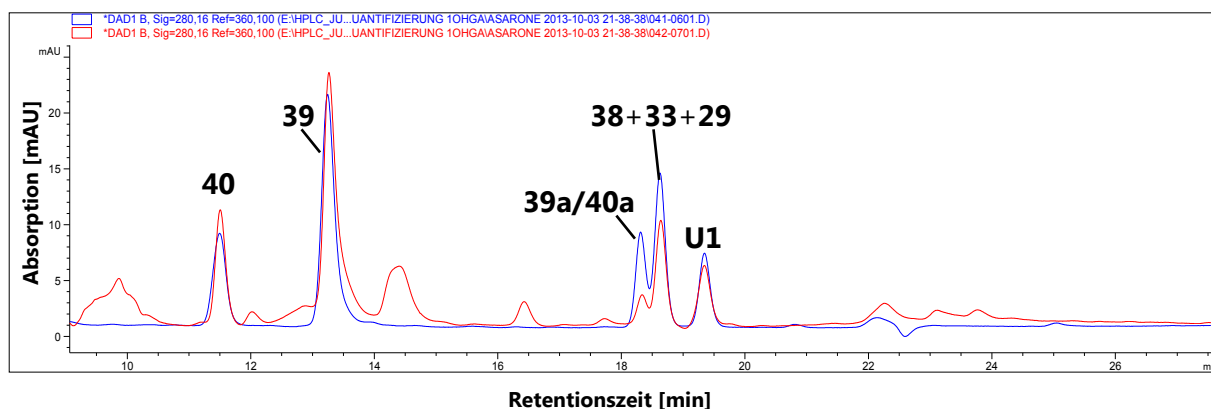


**Abbildung 83.** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des isolierten Peaks (präparative HPLC) in einem Retentionsbereich von  $t_R \approx 23,5$ – $25,0$  min aus der Inkubation von ARLM mit **4** (NMR-Spektrum Nr. PAC123-1; 600 MHz).

In beiden Spektren sind jeweils zwei aromatische Protonen, zwei Methoxygruppen sowie jeweils ein phenolisches Signal bei  $\delta = 8,98$  ppm (Abbildung 82) bzw. 9,09 ppm (Abbildung 83) erkennbar. Die Kopplungskonstanten der vermutlichen H1' und H2'-Protonen bestätigen, dass es sich um *cis*-konfigurierte Verbindungen handeln muss ( $^3J = 11,3$  und  $11,1$  Hz). Von der Verbindung bei  $t_R = 20,7$  min konnte wegen der geringen Konzentration kein aussagekräftiges NMR-Spektrum erhalten werden. Eine explizite Zuordnung, welcher Peak den Metaboliten **20a**, **46** und **47** zugerechnet werden kann, war nicht möglich. Im Vergleich zu **46** und **47** würde man für **20a** eine frühere Retentionszeit und ein stärker entschirmtes phenolisches Proton im NMR-Spektrum erwarten ( $\delta = 11\text{--}12$  ppm). Daher könnte es sich bei der Verbindung mit einer Retentionszeit von  $t_R = 20,7$  min, ohne konkreten  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Hinweis, um **20a** handeln. Allerdings würde man im Vergleich mit Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**) sowie Isoeugenol (**7**) und Isochavibetol (**9**) zwischen Verbindung **46** und **47** einen geringeren Unterschied der Retentionszeiten erwarten.

### Epoxide **39a** und **40a**

Der Peak bei  $t_R = 18,2$  min in Abbildung 76 (Seite 164) erzeugte ein Massensignal von  $m/z = 225,2$  und weist ein UV-Spektrum mit Banden bei  $\lambda_{\text{max}} = 230$  und  $290$  nm auf. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung dieses Peaks gelang nicht. Die erste Vermutung, dass es sich hierbei um 1'-Hydroxyasaron (**29**) handele, konnte nach Synthese der Referenzsubstanz **29** nicht bestätigt werden, da weder Retentionszeit noch das Massensignal dieses Peaks mit den Werten von synthetisch hergestelltem **29** übereinstimmten. **29** besitzt zwar ein Molekulargewicht von  $M = 224,2$  g/mol, jedoch wurde wie bei allen anderen Seitenkettenalkoholen in dieser Arbeit ausschließlich das  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ -Signal von  $m/z = 207,2$  detektiert.

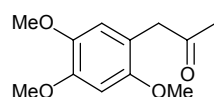
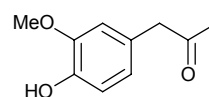


**Abbildung 84.** HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation von  $\beta$ -Asaron (**4**,  $400 \mu\text{M}$ ) mit Aroclor1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 280$  nm. Das blaue Chromatogramm zeigt den unbehandelten Inkubationsüberstand, das rote Chromatogramm zeigt das Chromatogramm des gleichen Inkubationsüberstandes, jedoch nachbehandelt mit 10 Vol.-% 1N Natronlauge für 20 min bei Raumtemperatur.

Am wahrscheinlichsten ist, dass es sich um (*E*)-1',2'-Asaronepoxid (**39a**) und/oder (*Z*)-1',2'-Asaronepoxid (**40a**) handelt. Massesignal und UV-Spektrum unterstützen diese Vermutung. So wurden der Molekülpeak  $[M+H]^+$  sowie die Addukte mit  $H_2O$ ,  $Na^+$  und  $K^+$  in den gleichen Verhältnissen, wie man sie auch bei Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) beobachtet, detektiert. Auch die Retentionszeit des Peaks liegt in einem Bereich, indem die Epoxide **39a/40a** zu erwarten sind. Um indirekt zu überprüfen, ob es sich um die vermuteten Epoxide **39a/40a** handelt, wurde **4** für eine Stunde mit ARLM inkubiert und der aufgearbeitete Überstand nachfolgend für weitere 20 min mit Natronlauge inkubiert. Dabei verringerte sich die Fläche des Epoxidpeaks zu Gunsten der Flächen der Peaks der beiden Diole **39** und **40** (Abbildung 84).

### Unbekannter Metabolit bei $t_R = 19,1$ min

Im NMR-Spektrum PAC122 (Abbildung 77 und Abbildung 78) bleiben ausgehend von den konsistenten Signalintegralen nach Abzug der bereits zugeordneten (**29**, **33**, **38**) Signale noch die Signale eines weiteren Minormetaboliten übrig (Tabelle 30). Diese werden höchstwahrscheinlich von der bisher nicht identifizierten Verbindung **U1** bei  $t_R = 19,1$  min (Abbildung 76) erzeugt. **U1** erzeugt ein UV-Spektrum mit  $\lambda_{max} = 230$  (15), 285 (8,3) und 350 (2,9) nm (relative Absorption in mAU), wodurch eine propenylische Verbindung ausgeschlossen werden kann. Die Absorptionsbande bei  $\lambda = 350$  nm spricht für ein Keton. Eine mögliche Verbindung, die diese Signale erzeugen könnte, stellt 1-(3,5,6-Trimethoxyphenyl)-propan-2-on (**50**) dar.

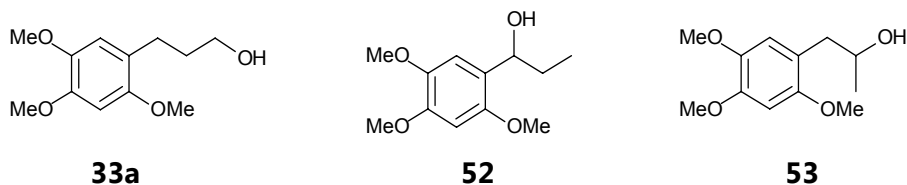
**50****51**

**Tabelle 30.** Beobachtete Signale von **U1** bei  $t_R = 19,1$  min und berechnete Signale von 1-(3,5,6-Trimethoxyphenyl)-propan-2-on.

Signal	Interpretation	$\delta$ ( <b>U1</b> ) gemessen [ppm] PAC122, DMSO- $d_6$ , 600 MHz, RT	$\delta$ ( <b>50</b> ) berechnet [ppm] (ChemDraw Ultra 10.0, CambridgeSoft)
2 x s, je 1H	ArH	6,75; 6,66	6,79; 6,35
3 x s, je 3H	OMe	3,77; 3,71; 3,66	3,83 (3x)
1 x s, 2H	CH <sub>2</sub>	3,54	3,45
1 x s, 3H	CH <sub>3</sub>	2,04	1,89

Solheim und Scheline (1976) konnten **51** nach Verabreichung von Methylisoeugenol (**2**; 400 mg/kg KG; *i. p.*) in Spuren im Urin, aber nicht in der Gallenflüssigkeit männlicher Ratten nachweisen, was die prinzipielle Bildung von **50** aus **4** möglich scheinen lässt.

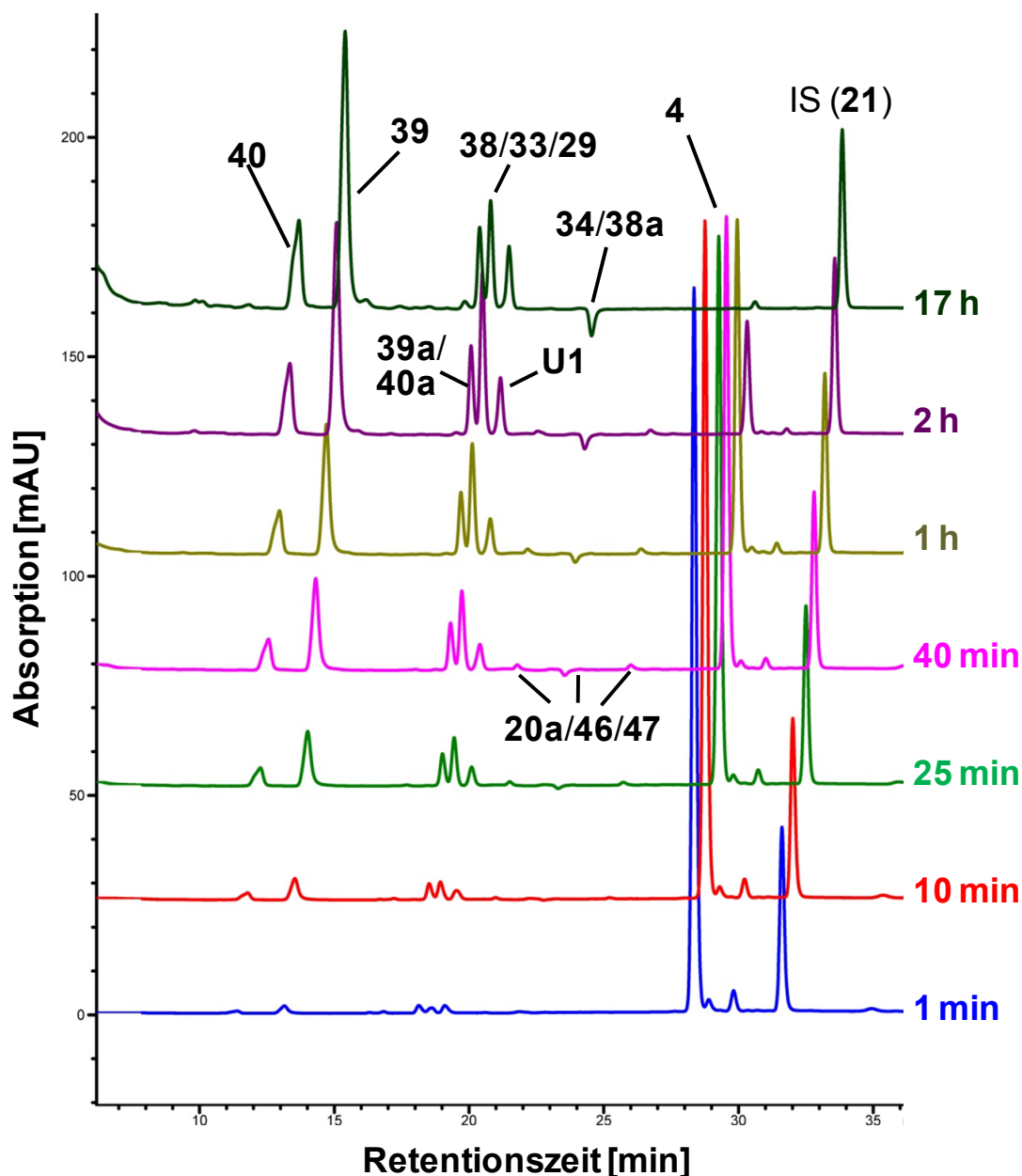
**U1** erzeugt ferner zwei intensive Massensignale bei  $m/z = 249,4$  und  $265,3$  und zwei schwache Signale bei  $m/z = 209,2$  und  $227,3$ . Die beiden ersten Signale stammen wahrscheinlich von den (bei LC-MS häufig beobachteten) Moleküladdukten mit Natrium und Kalium. Wenn die beobachteten Signale also  $[M+Na]^+$  und  $[M+K]^+$  repräsentieren, so würde man als Molekülmasse  $M = 226,2$  g/mol erwarten und man würde  $m/z = 227,3$  als  $[M+H]^+$  und  $209,2$  als  $[M+H-H_2O]^+$  interpretieren. Da **50** eine Molekülmasse von  $M = 224,2$  g/mol aufweist, sprechen die beobachteten Massensignale gegen die Bildung von **50**. Eine weitere Möglichkeit, die die Massensignale, nicht aber die NMR-Signale erklären würde, wäre die Bildung von **33a**, **52** oder **53**. Die Retentionszeit von **U1** würde beide Möglichkeiten unterstützen, da sowohl **33a** als auch die zu **50** ähnliche Verbindung 3,4,6-Trimethoxyacetophenon (**42**) ähnliche Retentionszeiten um  $t_R = 19$  min aufweisen.



Eine Erklärung des Peaks von **U1** wäre, dass sich **50** in mikrosomalen Inkubationen bildet, dann aber unter den LC-ESI<sup>+</sup>-MS-Bedingungen zu **53** reduziert wurde.

#### 5.4.6.2 Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\beta$ -Asaron (**4**) in Lebermikrosomen

Für die Untersuchung des Zeitverlaufes des Phase-I-Metabolismus von  $\beta$ -Asaron (**4**), wurden Lebermikrosomen (LM) zusammen mit einem NADPH-generierenden System über 17 h inkubiert (vgl. Kapitel 7.2.2) und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, welche nach entsprechender Aufarbeitung HPLC-chromatographisch analysiert wurden. Abbildung 85 (Seite 173) zeigt beispielhaft das Set von Chromatogrammen zum Zeitverlauf des Metabolismus von Rinderlebermikrosomen (BLM) mit **4**. Negativkontrollen ohne den Zusatz von NADPH sowie Inkubationen mit hitzeinaktivierten Mikrosomen lieferten keine detektierbaren Metaboliten.



**Abbildung 85.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten zum Zeitverlauf der Inkubation von  $\beta$ -Asaron (**4**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (**ARLM**). Startkonzentration von **4**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h; Messwellenlänge  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm).

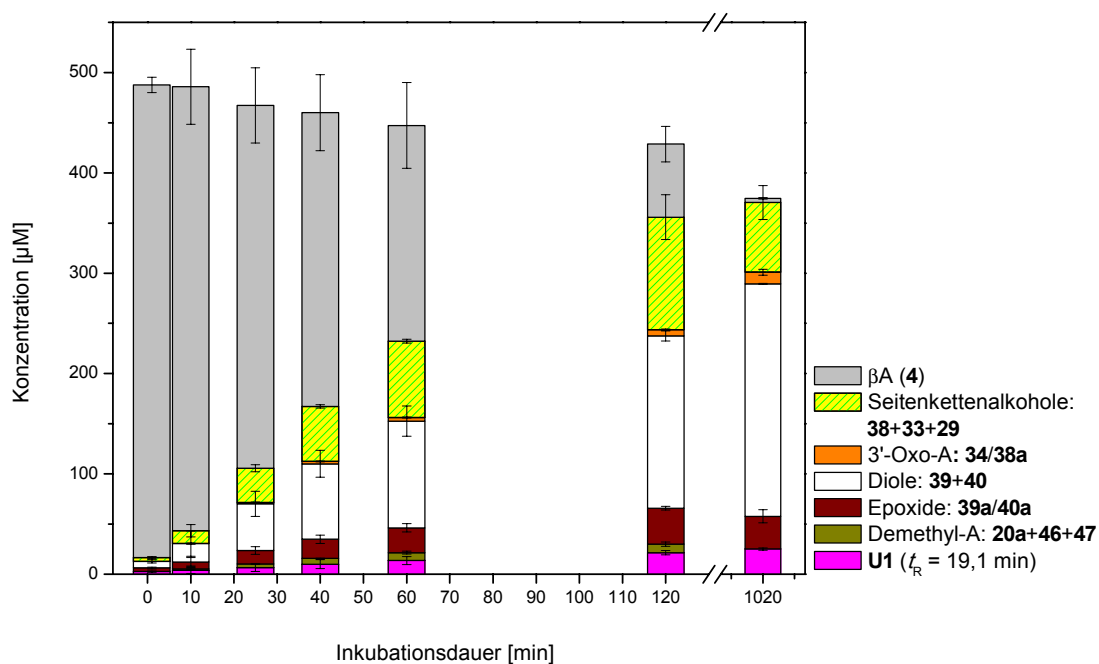
In den Abbildungen 86 bis 90 (S. 175 ff.) sind die Konzentrationen der detektierten Metaboliten aus Inkubationen von **4** mit verschiedenen LM gegen die Zeit aufgetragen.

Dominierend bei Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) und allen anderen Inkubationen mit **4** ist der Epoxid-Diol-Weg, der über die vermutlichen Epoxide **39a** (*trans*) und/oder **40a** (*cis*) zu den beiden Diolen **39** (*threo*) und **40** (*erythro*) führt. So wurden

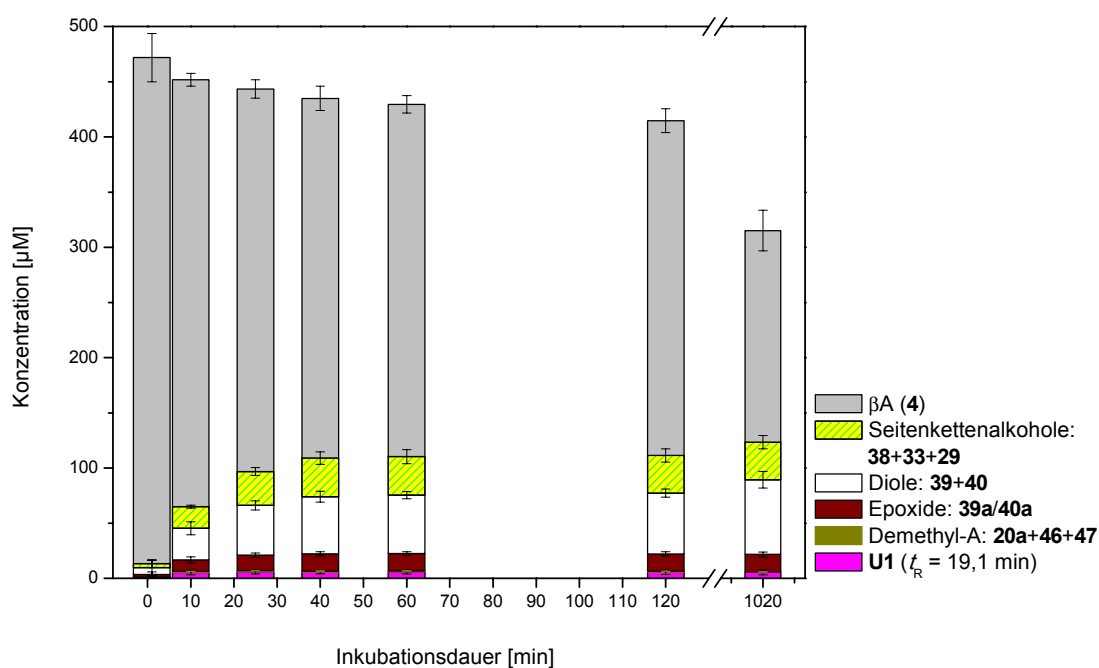
nach 17 h Inkubationszeit fast die Hälfte (46,3 %) der Startkonzentration von **4** in Form der Diole **39** und **40** detektiert. Die Summe der Epoxide **39a/40a** erreichte nach 2 h eine maximale Konzentration von 7,2 % und verringerte sich auch nach 17 h nur gering (6,5 %). Daneben wurden mit einer maximalen Konzentration von 22,4 % die Seitenkettenalkohole **38/33/29** detektiert, deren genaue Zusammensetzung, wie bereits erläutert, nicht angegeben werden konnte. Anhand der UV-Spektren ist jedoch sicher, dass **38** zu jedem Zeitpunkt die Hauptkomponente darstellte. Die Konzentrationen von **U1** und **34/38a** stiegen kontinuierlich an und erreichten nach 17 h 5,0 % bzw. 2,3 %. Die Summe der O-demethylierten Verbindungen **20a/46/47** stieg innerhalb von zwei Stunden auf 1,7 %, während nach 17 h Inkubationsdauer keiner dieser Metaboliten mehr detektierbar war. Nach 17 Stunden waren noch lediglich 0,85 % der Startkonzentration von **4** vorhanden. Die Gesamtwiederfindung zu diesem Zeitpunkt war mit 75 % relativ hoch. Die Bildungsgeschwindigkeiten der Metaboliten waren zumindest über die ersten 60 min in guter Näherung linear.

Das Metabolitenprofil der Inkubationen von nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM) mit **4** war identisch mit dem der ARLM-Inkubationen. Jedoch war die frühe Bildungsgeschwindigkeit der Metaboliten etwas höher und erreichte deutlich schneller, bereits nach 40 min, ein Plateau, nach dessen Erreichen sich die Konzentrationen der detektierten Metaboliten nicht mehr wesentlich änderten. Die Gesamtwiederfindung der Metaboliten stieg zu keinem Zeitpunkt über 25 % und betrug nach zwei Stunden 22,3 % der Startkonzentration, aufgeschlüsselt in 11 % der Diole **39+40**, 6,8 % der Seitenkettenalkohole **38/33/29**, 3,2 % der Epoxide **39a/40a**, 1,1 % des unbekanntes Metaboliten **U1** sowie 0,2 % der Phenole **20a+46+47**. Die Oxoverbindungen **34/38a** konnten nicht quantifiziert werden.

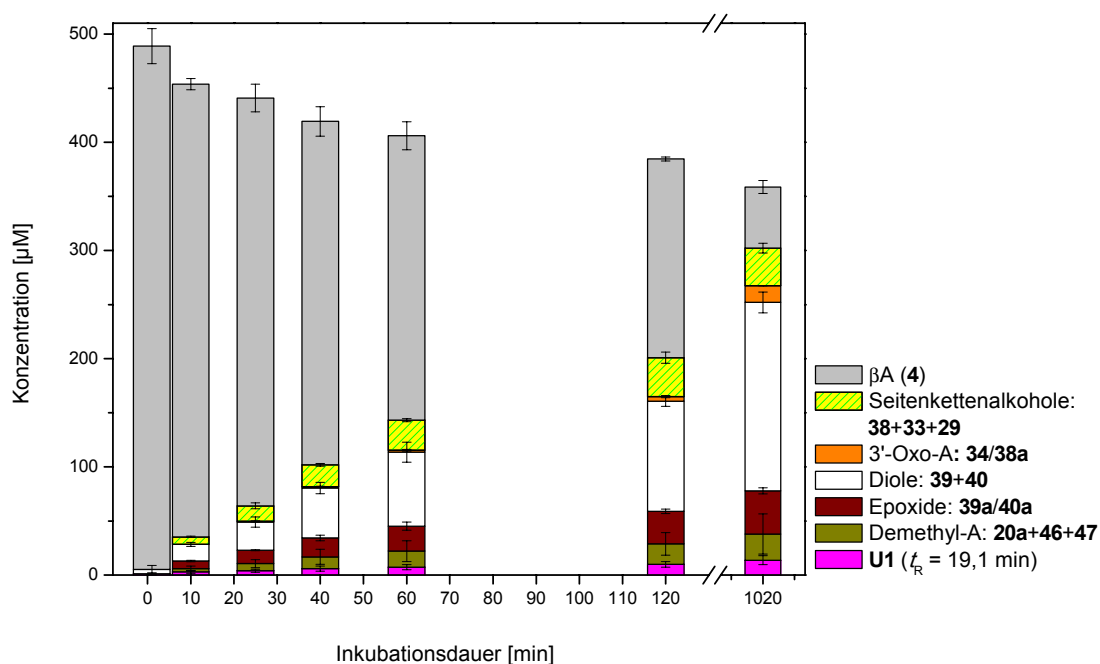
Die weiteren untersuchten Lebermikrosomen unterschieden sich nur geringfügig von den bisher beschriebenen. Unterschiede gab es lediglich bezüglich der beobachteten Konzentrationen einzelner Metaboliten, aber nicht hinsichtlich des Metabolitenspektrums. So wies die Inkubation von **4** mit Schweinelebermikrosomen (SLM) hohe Ähnlichkeit zu den Inkubationen mit RLM auf, wobei die Metabolitenkonzentrationen bei SLM zu späten Inkubationszeitpunkten etwas höher waren. Die Inkubationen mit Rinderlebermikrosomen (BLM) wie auch mit humanen Lebermikrosomen (HLM) lagen hinsichtlich der Metabolitenkonzentrationen zwischen ARLM und SLM. Insgesamt ergab sich bei  $\beta$ -Asaron (**4**) ein deutlich homogeneres Bild als beispielsweise bei den Inkubationen mit Methyleugenol (**1**) oder (*E*)-Methylisoeugenol (**2**). Die Bildung der Metaboliten in allen Inkubationen war zumindest in den ersten 25 Minuten in guter Näherung linear.



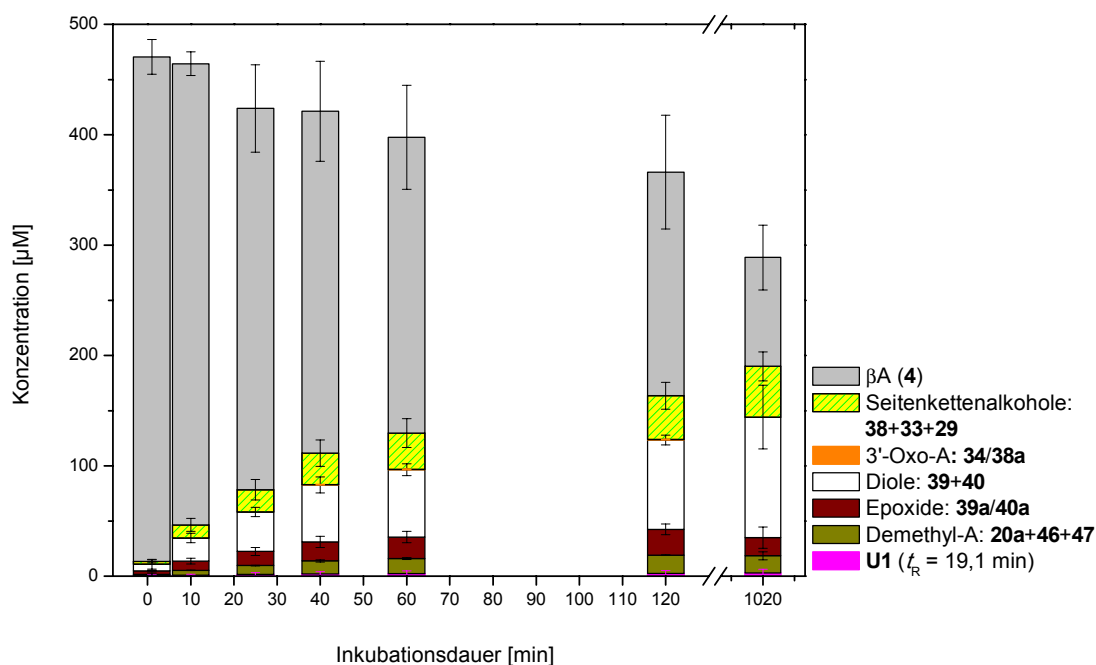
**Abbildung 86.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\beta$ -Asaron (4) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM). Startkonzentration von 4: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit ARLM verschiedener Tiere.



**Abbildung 87.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\beta$ -Asaron (4) mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM). Startkonzentration von 4: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.

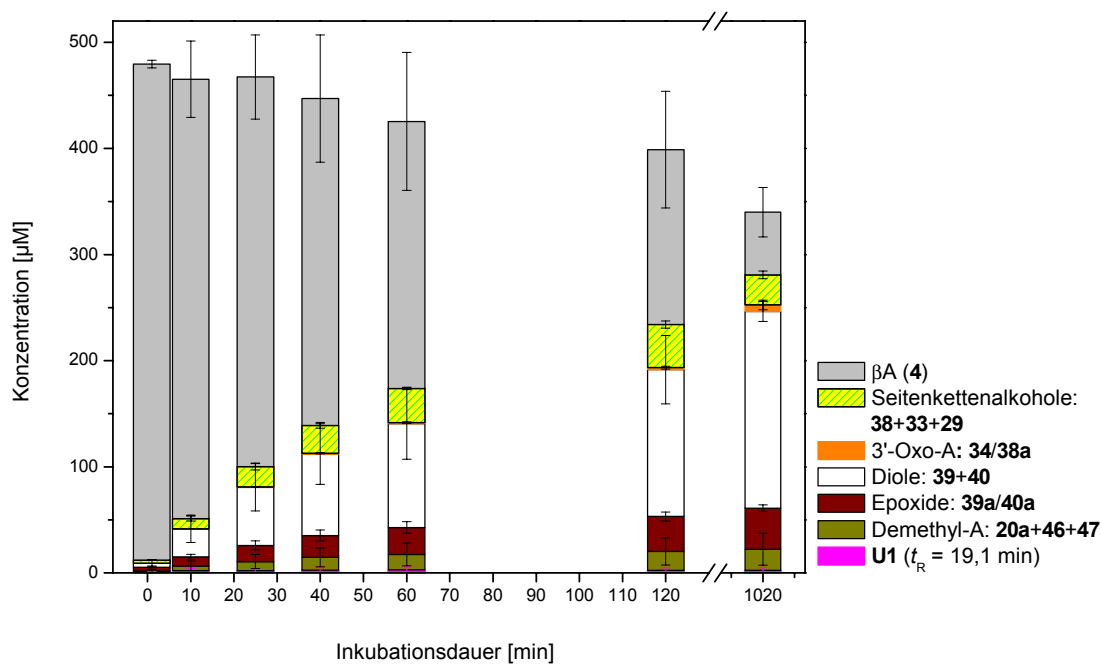


**Abbildung 88.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\beta$ -Asaron (**4**) mit Rinderlebermikrosomen (**BLM**). Startkonzentration von **4**:  $500 \mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit BLM des gleichen Tieres.



**Abbildung 89.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\beta$ -Asaron (**4**) mit Schweinelebermikrosomen (**SLM**). Startkonzentration von **4**:  $500 \mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit SLM des gleichen Tieres.





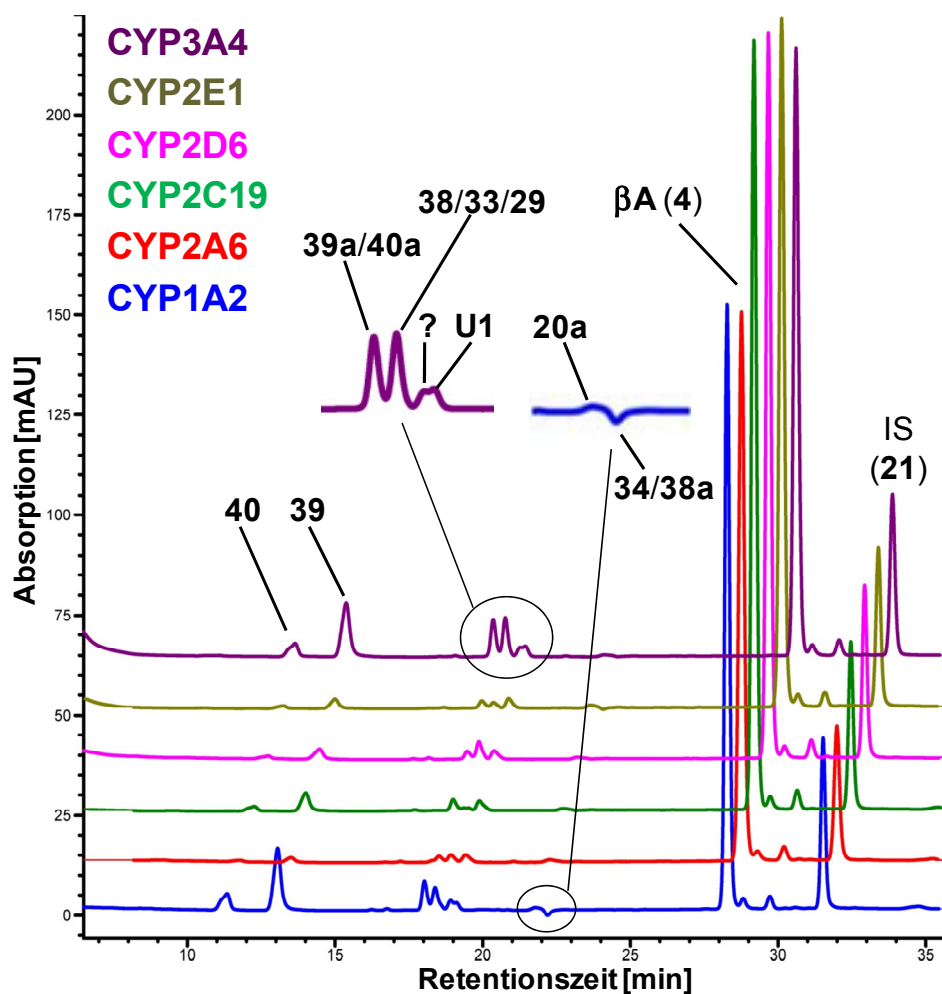
**Abbildung 90.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\beta$ -Asaron (4) mit humanen Lebermikrosomen (HLM). Startkonzentration von 4: 500  $\mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 0, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit der gleichen Charge gepoolter HLM von 150 männlichen und weiblichen Spendern.

### 5.4.6.3 Metabolismus von $\beta$ -Asaron (**4**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Inkubationen humaner CYP-Enzyme mit  $\beta$ -Asaron (**4**) dargestellt. In Abbildung 91 (Seite 179) ist ein beispielhaftes Set von Chromatogrammen der Inkubationen der sechs Supersomes<sup>TM</sup> mit **4** gezeigt. Die Konzentrationen der Metaboliten dieser Umsetzungen nach 20 und 60 Minuten bei einer Startkonzentration von 200  $\mu$ M bzw. 500  $\mu$ M sind in Abbildung 92 bzw. Abbildung 93 (Seite 180) gezeigt.

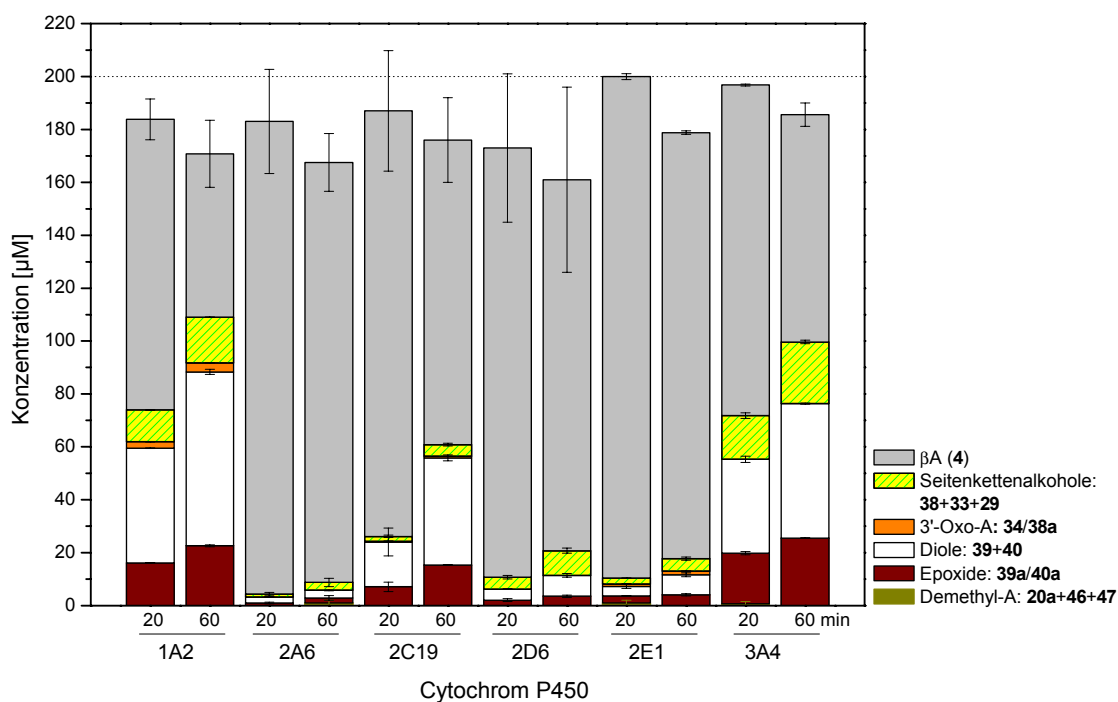
In den Inkubationen von Supersomes<sup>TM</sup> mit **4** fällt auf, dass der Epoxid-Diol-Weg – wie bei den lebermikrosomalen Inkubationen – den Hauptmetabolisierungspfad von **4** darstellt. Im Gegensatz zu Inkubationen mit Methyleugenol (**1**) wo das Seitenkettenepoxid lediglich in Inkubationen mit CYP2E1 detektiert werden konnte, bildeten alle sechs untersuchten humanen CYPs in Inkubationen mit **4** die Epoxide **39a/40a**, teilweise in vergleichsweise hohen Konzentrationen. Dabei korrelierte die detektierbare Menge der Epoxide mit der Konzentration der entsprechenden Diole **39+40**. Ferner stieg die Konzentration der Diole und Epoxide im Zeitraum zwischen 20 und 60 min nach Umsetzung von **4** mit allen untersuchten Enzymen weiter an, wohingegen bei Inkubationen mit **1** die Konzentration des Epoxids im Inkubationsverlauf in etwa konstant blieb und lediglich die Menge des korrespondierenden Diols zunahm. Das Verhältnis der Diole betrug in allen Inkubationen nahezu konstant etwa 4:1 **39:40**. Die O-Demethylierung wurde im Gegensatz zu Inkubationen mit Lebermikrosomen von keinem der sechs Enzyme in nennenswertem Ausmaß katalysiert. Quantifizierbare Konzentrationen wurden lediglich von der Verbindung ( $t_R = 20,8$  min) welche wahrscheinlich **20a** repräsentiert in den Inkubationen von **4** mit CYP2A6 nach 60 min sowie mit CYP2E1 und CYP3A4 nach je 20 min detektiert. In den Inkubationen mit den letztgenannten Enzymen war nach einstündiger Inkubation keines der O-demethylierten Produkte mehr nachweisbar.

Die nicht identifizierte Verbindung **U1** mit  $t_R = 19,1$  min ist in den Abbildungen 92 und 93 nicht einbezogen. Die geschätzten Konzentrationen betragen maximal 5 % der eingesetzten Startkonzentration des Substrates, wobei CYP1A2 die höchsten Konzentrationen dieser Verbindung generierte. Ferner wurde die Bildung einer weiteren unbekanntem Verbindung, insbesondere bei CYP1A2 und 3A4 mit einer Retentionszeit von  $t_R = 19,0$  min, beobachtet (in Abbildung 91 mit „?“ gekennzeichnet). Diese Verbindung weist ein UV-Spektrum mit Banden bei  $\lambda_{max} = 236, 276$  und 344 nm auf, was auf das Vorhandensein von konjugierten Doppelbindungen der Seitenkette dieser Verbindung hindeutet. Weitere Hinweise auf die Identität dieser Verbindung konnten nicht erhalten werden.

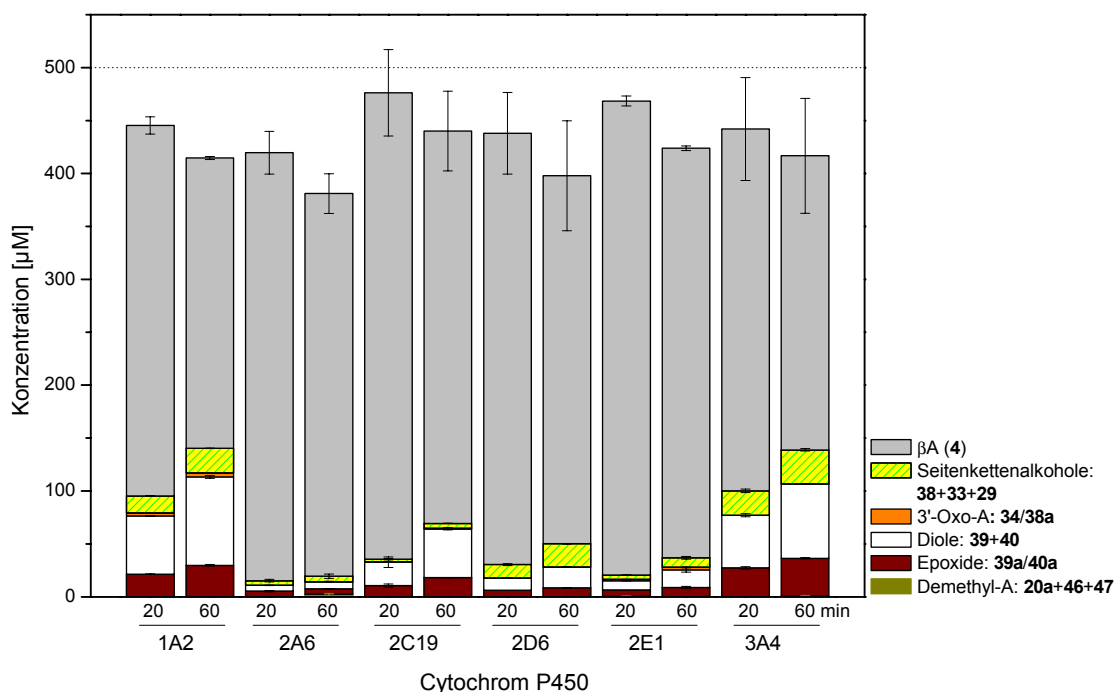


**Abbildung 91.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation verschiedener Supersomes™ (120 nM) mit  $\beta$ -Asaron (**4**, 500  $\mu$ M; 1 % MeCN) nach 20 min bei  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm). Konzentration des internen Standard (**21**): 67  $\mu$ M.

CYP1A2 und 3A4 katalysierten die Bildung der Epoxide **39a/40a**, der Diole **39+40** und der Seitenkettenalkohole **38/33/29** in ähnlichem Umfang. Allein die Bildung von **34/38a** wurde in Inkubationen mit CYP3A4 nicht beobachtet, während CYP1A2 geringe Mengen **34/38a** bildete. CYP2A6 konnte alle Reaktionen katalysieren, jedoch in insgesamt geringem Umfang. So wurden nach einer Stunde nur 5 % der Startkonzentration von 200  $\mu$ M **4** zu detektierbaren Metaboliten umgesetzt. CYP2C19 war das drittaktivste Enzym in Hinblick auf die Umsetzung von **4**. Nach 60 min waren rund 20 % der Diole **39** und **40** detektierbar, zusammen mit knapp 8 % der Epoxide **39a/40a**. Die Seitenkettenalkohole **38/33/29** wurden in geringen Konzentrationen (2,2 %) gebildet. Die Menge von **34/38a** ist mit 0,3 % der eingesetzten Konzentration von **4** gerade noch quantifizierbar. CYP2D6 und CYP2E1 waren ähnlich aktiv, während CYP2E1 mehr **34/38a** bildete und CYP2D6 etwas potenter bei der Bildung der Seitenkettenalkohole **38/33/29** war. Der Gesamtumsatz, der zu detektierbaren Metaboliten führte, lag jeweils bei unter 12 %.



**Abbildung 92.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\beta$ -Asaron (**4**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **200  $\mu$ M 4** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.



**Abbildung 93.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\beta$ -Asaron (**4**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **500  $\mu$ M 4** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.

#### 5.4.6.4 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\beta$ -Asaron (**4**) in Lebermikrosomen

Wie die Untersuchung der Zeitverläufe zeigte, war bei  $\beta$ -Asaron (**4**) im Gegensatz zu den Inkubationen von Lebermikrosomen mit Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) die Hauptreaktion in allen untersuchten Spezies nicht die Bildung der Seitenkettenalkohole, sondern die Bildung der Epoxide **39a/40a** bzw. der Diole **39** und **40**. Dieser Befund konnte auch durch Ableitung von enzymkinetischen Parametern bestätigt werden. In Tabelle 31 sind die enzymkinetischen Parameter für die Bildung der Metaboliten von **4** in den verschiedenen Lebermikrosomen (LM) zusammengefasst.

**Tabelle 31.** Bildungskinetische Parameter der detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\beta$ -Asaron (**4**) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	Seitenketten- alkohole ( <b>38, 33, 29</b> )	3'-Oxo-A ( <b>34</b> )	A-Epoxide ( <b>39a/40a</b> )	A-Diole ( <b>39, 40</b> )	Demethyl ( <b>20a, 46, 47</b> )	Summe Metaboliten
ARLM	$v_{\max}$ (app)	0.99	0.06	0.93	2.37	0.49	4.60
	$K_M$ (app)	58	5E-12	74.5	48.5	484	55
	$E_{\text{cat}}$ (app)	17.1	1E+13	12.4	48.9	1.02	83.2
RLM	$v_{\max}$ (app)	2.15	nd	1.61	4.13	0.16	8.64
	$K_M$ (app)	275		210	163	399	243
	$E_{\text{cat}}$ (app)	7.80		7.7	25.28	0.40	35.6
BLM	$v_{\max}$ (app)	0.65	nd	1.49	2.27	0.17	4.83
	$K_M$ (app)	92.0		224	85	47	126
	$E_{\text{cat}}$ (app)	7.04		6.7	26.59	3.58	38.3
SLM	$v_{\max}$ (app)	0.54	nd	1.71	3.21	0.40	5.14
	$K_M$ (app)	170		920	685	38	373
	$E_{\text{cat}}$ (app)	3.19		1.86	4.69	10.5	13.8
HLM	$v_{\max}$ (app)	0.75	nd	1.13	2.61	0.49	4.53
	$K_M$ (app)	281		473	389	447	336
	$E_{\text{cat}}$ (app)	2.68		2.39	6.71	1.09	13.5

Inkubationsbedingungen: Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **4**: 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

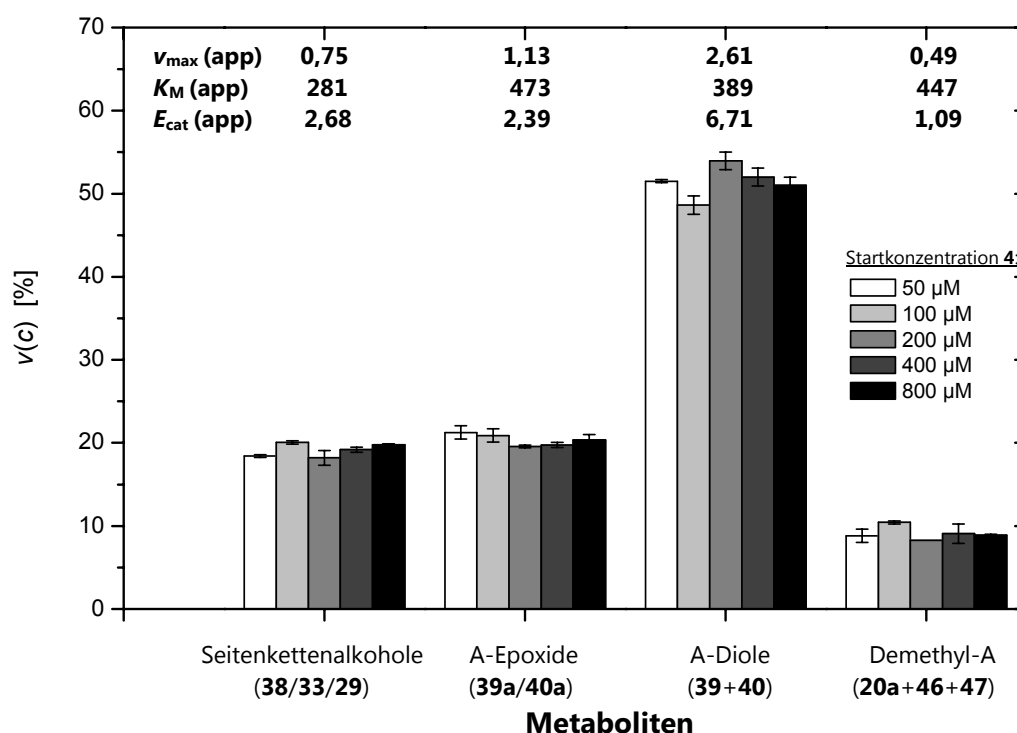
$v_{\max}$  (app): maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1}$  (mg mikrosomales Protein) $^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}$  (app)/ $K_M$  (app); [ $\mu\text{l min}^{-1}$  (mg mikrosomales Protein) $^{-1}$ ]

nd: nicht detektierbar

Die Bildung der Epoxide **39a/40a** und Diole **39+40** war in allen untersuchten LM der mit Abstand effizienteste bzw. schnellste Reaktionsweg. Auf Platz zwei folgte die Bildung der Seitenkettenalkohole **38/33/29**, die insbesondere in ARLM und BLM mit hohen Affinitäten gebildet wurden. Für deren Bildung wurde in BLM, SLM und HLM eine biphasische Reaktions-

kinetik beobachtet. Da eine separate Quantifizierung der einzelnen Seitenkettenalkohole nicht möglich war und diese somit als Summe bestimmt wurden, könnte dies darin begründet sein, dass einer der drei Alkohole eine stärker abweichende Bildungskinetik aufweist als die anderen. Da bei keinem der untersuchten CYPs eine biphasische Reaktionskinetik für die Bildung der Summe der Seitenkettenalkohole beobachtet wurde, ist es wahrscheinlicher, dass dieser Effekt mit den unterschiedlichen Affinitäten einzelner Enzyme in LM zu dieser Reaktion begründet ist. Nach 20 Minuten Inkubationsdauer wurden nur in ARLM quantifizierbare Mengen von Aldehyd **34** detektiert.



**Abbildung 94.** Abhängigkeit der Metabolitenbildungsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration: Prozentualer Beitrag der gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten bei gegebener Substratstartkonzentration  $v(c)$  der einzelnen Metaboliten an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit ( $\Sigma v(\text{alle identifizierten Metaboliten})/v(\text{Metabolit } i)$ ) der Reaktionen von HLM mit  $\beta$ -Asaron (**4**). Oben: kinetische Parameter  $v_{\max}$ ,  $K_M$  und  $E_{\text{cat}}$ . Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten.  
 $K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]  
 $v_{\max}$  (app): max. apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]  
 $E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

Das Ranking der katalytischen Gesamteffizienz des Umsatzes von **4** lautet ARLM > BLM  $\approx$  RLM > SLM  $\approx$  HLM. Ferner waren die beobachteten Bildungsgeschwindigkeiten im Schnitt bei allen untersuchten LM etwas größer als bei Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**). **4** wurde also insgesamt schneller und mit höherem Umsatz umgesetzt, was schon bei der Untersuchung der Zeitverläufe zu verzeichnen war. Die quantitativen Unterschiede zwischen ARLM, BLM, SLM und humanen Lebermikrosomen sind gering. Lediglich die kinetischen Para-

meter von RLM heben sich aufgrund der beobachteten hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten hervor. Wie schon aus dem Zeitverlauf der Inkubation von RLM mit **4** (Abbildung 87, Seite 175) abzulesen war, bildeten RLM in der initialen Reaktionsphase sehr schnell hohe Metabolitenkonzentrationen, erreichten aber auch schnell ein Plateau, nach dessen Erreichen sich die Metabolitenkonzentrationen nicht mehr bedeutend änderten.

In Abbildung 94 (Seite 182) sind die prozentualen gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten für die identifizierten Metaboliten von **4** in HLM bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgetragen. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen erkennt man keine Konzentrationsabhängigkeit für die Bildung der einzelnen Metaboliten. D. h. die Bildungsgeschwindigkeiten der einzelnen Metaboliten werden in HLM auch bei geringen Substratkonzentrationen ungefähr konstant sein. Die berechneten prozentualen  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$ -Werte in Tabelle 32 bestätigen dies und zeigen, dass dieses Verhalten auch für die anderen untersuchten LM, mit Ausnahme von SLM, zutrifft. In SLM wurde die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **20a/46/47** sehr effizient katalysiert, was in einem hohen prozentualen Wert von  $E_{\text{cat}}$  zum Ausdruck kommt. Das bedeutet, dass der *O*-Demethylierung bei geringen Substratkonzentrationen in SLM eine große Bedeutung zukommt, während gleichzeitig die Bildung der Diol/Epoxyde verringert sein wird. In den anderen LM spielte die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen nur eine untergeordnete Rolle.

**Tabelle 32.** Prozentuale bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\beta$ -Asaron (**4**) mit Lebermikrosomen.

LM	Parameter	Seitenketten- alkohole (38, 33, 29)	3'-Oxo-A (34)	A-Diole (39, 40)	A-Epoxyde (39a/40a)	Demethyl (20a, 46, 47)
ARLM	$v_{\max}$ (app)	20	1	49	19	10
	$E_{\text{cat}}$ (app)	22	nb	62	16	1
RLM	$v_{\max}$ (app)	27	0	51	20	2
	$E_{\text{cat}}$ (app)	19	0	61	19	1
BLM	$v_{\max}$ (app)	14	0	50	33	4
	$E_{\text{cat}}$ (app)	16	0	61	15	8
SLM	$v_{\max}$ (app)	9	0	55	29	7
	$E_{\text{cat}}$ (app)	16	0	23	9	52
HLM	$v_{\max}$ (app)	15	0	52	23	10
	$E_{\text{cat}}$ (app)	21	0	52	19	8

$v_{\max}$  (app): prozentuale maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit

$E_{\text{cat}}$  (app): prozentuale „apparente katalytische Effizienz“

nb: Wert wurde bei der Berechnung (wegen nicht-realer Enzymsättigung) nicht berücksichtigt

Summen  $\neq$  100 % sind rundungsbedingt.

### 5.4.6.5 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\beta$ -Asaron (4) in Cytochrom P450-Enzymen und deren Beteiligung in HLM

In Tabelle 33 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von  $\beta$ -Asaron (4) mit Supersomes<sup>TM</sup> dargestellt. CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 katalysierten effizient und mit hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten die Bildung der Epoxide **39a/40a** bzw. der Dirole **39** und **40**. Die Bildung der Seitenkettenalkohole **38**, **33** und **29** wurde hauptsächlich von CYP1A2 und CYP3A4 katalysiert. CYP2E1 und CYP3A4 waren die einzigen untersuchten Enzyme, bei denen quantifizierbare Mengen der O-demethylierten Verbindungen **20a/46/47** gebildet wurden. Allerdings waren die gebildeten Konzentrationen gering und CYP3A4 bildete nur bei der höchsten Konzentration quantifizierbare Mengen, so dass keine kinetischen Daten abgeleitet werden konnten.

**Tabelle 33.** Bildungskinetische Parameter für die quantifizierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\beta$ -Asaron (4) mit verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup>.

CYP	Parameter	Seitenketten- alkohole (38, 33, 29)	3'-Oxo-A (34)	A-Diole (39, 40)	A-Epoxide (39a/40a)	Demethyl (20a, 46, 47)	Summe Metaboliten
CYP1A2	$k_{cat}$	6,22	1,10	23,5	37,6	nd	40,2
	$K_M$	72,0	49,2	52,6	56,4		58,5
	$E_{cat}$	86,3	22,4	447	666		687
CYP2A6	$k_{cat}$	1,70		1,25	1,46	nd	4,09
	$K_M$	159	nd	179	242		196
	$E_{cat}$	10,7		6,97	6,02		20,9
CYP2C19	$k_{cat}$	0,73		6,93	3,96	nd	11,0
	$K_M$	114	nd	21,9	88,4		36,1
	$E_{cat}$	6,46		316	44,8		304
CYP2D6	$k_{cat}$	2E+06		6,33	2,29	nd	20,4
	$K_M$	8E+07	nd	309	201		386
	$E_{cat}$	20,2		20,5	11,4		52,8
CYP2E1	$k_{cat}$	1,25	0,34	2,54	1,38	0,18	3,8
	$K_M$	302	162	469	378	67,0	170
	$E_{cat}$	4,15	2,09	5,4	3,64	2,76	22,5
CYP3A4	$k_{cat}$	17,4	nd	35,2	18,7	nd	72,7
	$K_M$	265		236	239		253
	$E_{cat}$	65,6		149	78,3		288

Inkubationsbedingungen: CYP-Konzentration jeweils 120 nM; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **4**: 50, 100, 200, 500, 800  $\mu$ M in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$ : (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu$ M]

$k_{cat}$ : Wechselzahl; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{nmol Cytochrom P450})^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]

$E_{cat}$ : „katalytische Effizienz“ =  $k_{cat}/K_M$ ; [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];

nd: Metabolit nicht detektierbar

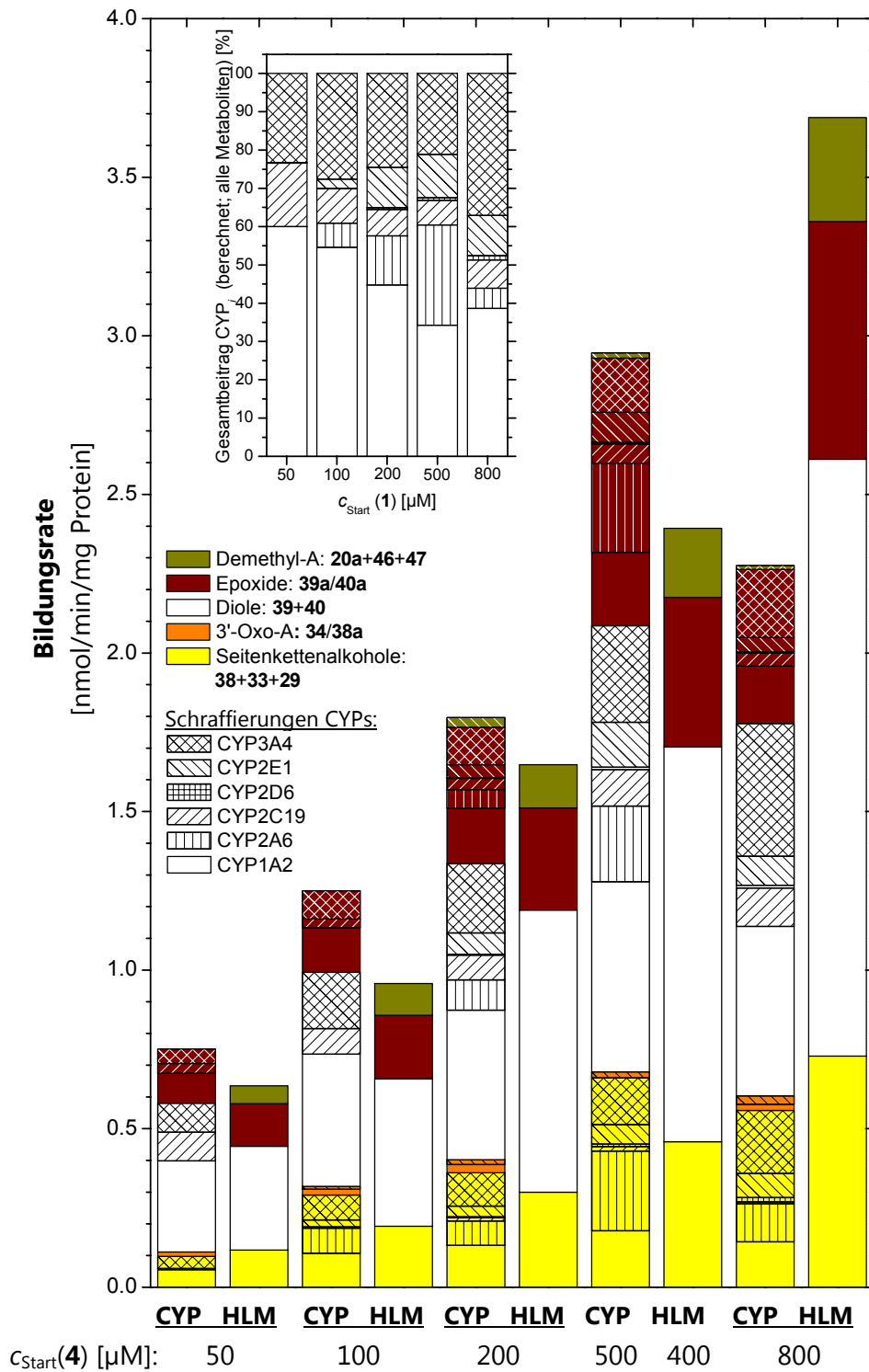
Die aus den Reaktionsgeschwindigkeiten einzelner Supersomes<sup>TM</sup> berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten in HLM sind in Abbildung 95 dargestellt. Das Insert dieser Abbildung



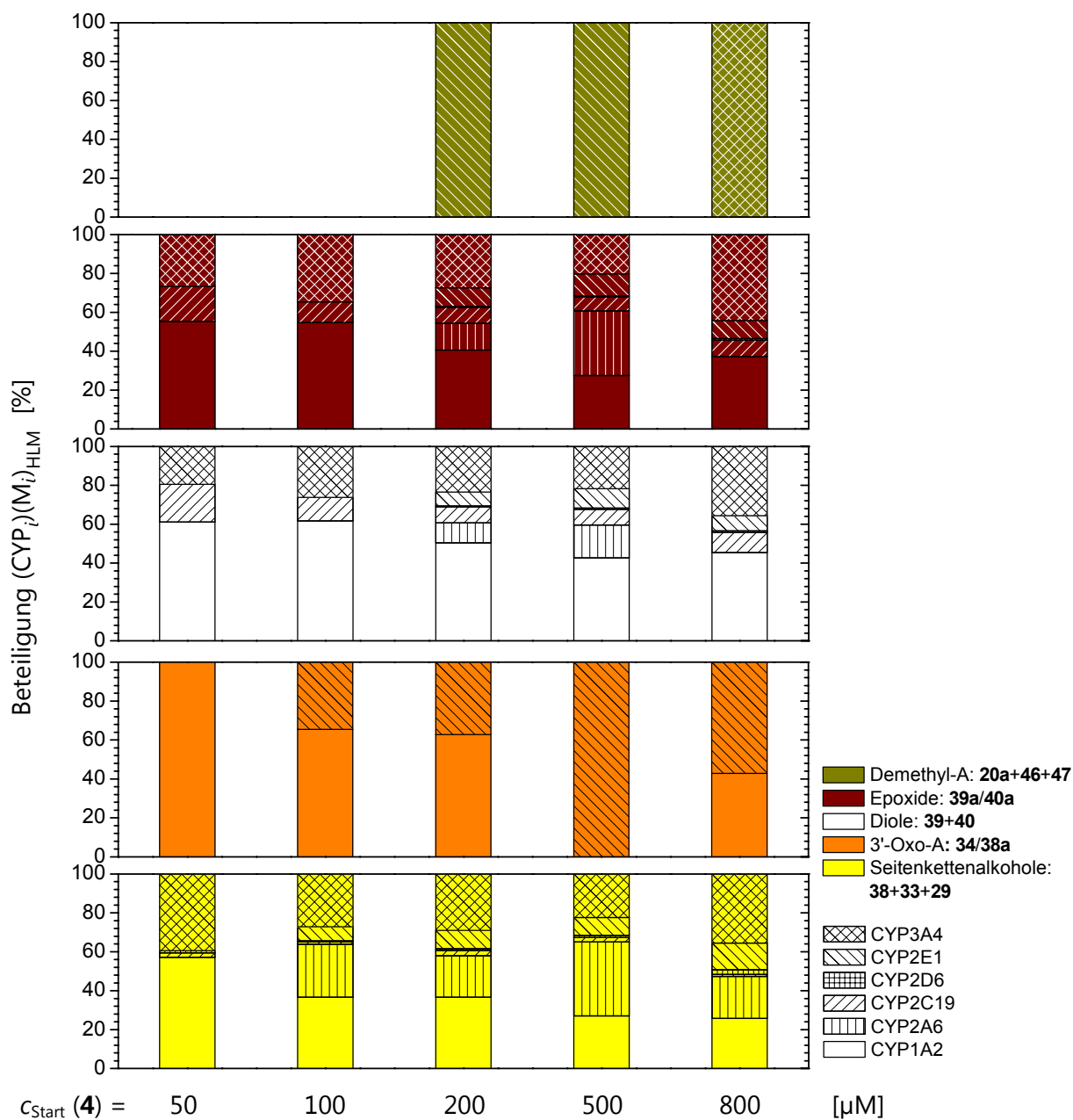
---

zeigt, dass bei der geringsten untersuchten Substratkonzentration (50  $\mu\text{M}$ ) CYP1A2 insgesamt mit rund 60 % an der Bildung der Metaboliten beteiligt ist. Den Rest stellen CYP3A4 und CYP2C19. In den höheren Substratkonzentrationen nimmt der Beitrag von CYP1A2 ab und die Beiträge von CYP2E1 und insbesondere CYP2A6 nehmen deutlich zu, wobei die Zunahme des Beitrages dieser Enzyme alle Metaboliten betrifft. Die berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten sind leicht überprädiktiv, bilden aber insgesamt die tatsächlichen gemessenen Gesamtgeschwindigkeiten und die Beiträge der einzelnen Metaboliten gut ab.

Die aus diesen Daten berechneten prozentualen Beteiligungen der einzelnen CYPs an der Bildung der einzelnen Metaboliten ist in Abbildung 96 (Seite 187) gezeigt. Für alle Metaboliten ergibt sich der Trend, dass CYP1A2 mit sinkender Substratkonzentration eine höhere Bedeutung zukommt, was in Einklang mit den geringen  $K_M$ -Werten für alle durch CYP1A2-katalysierte Reaktionen von **4** steht. Die Bildung der Seitenkettendiole wird in HLM bei niedrigen Konzentrationen wahrscheinlich hauptsächlich durch CYP1A2, CYP2A6 und CYP3A4 katalysiert. Die anschließende mikrosomale Oxidation von **12** zu **23**, welche auch in Supersomes<sup>TM</sup> nur in geringem Ausmaß beobachtet wurde, wird wahrscheinlich zum Großteil von CYP1A2 und CYP2E1 katalysiert. Die Bildung der Epoxide **39a/40a** bzw. der Diole **39** und **40** wird im Falle kleiner Substratkonzentrationen zum Großteil von CYP1A2 und in geringerem Ausmaß von CYP2C19 und CYP3A4 katalysiert. Wegen der hohen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten, aber geringeren  $K_M$ -Werten kommt CYP3A4 erst in hohen Substratkonzentrationen eine größere Bedeutung zu. Für die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **20a/46/47** sind in HLM wahrscheinlich noch weitere als die untersuchten CYPs verantwortlich. Lediglich im Falle hoher Substratkonzentrationen und nur für CYP2E1 und CYP3A4 waren diese Metaboliten in Inkubationen von Supersomes<sup>TM</sup> mit **4** nachweisbar.



**Abbildung 95.** Vergleich der gemessenen (HLM) und der aus kinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen berechneten Bildungsrate (**CYP**;  $v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)$ ) der Metaboliten von  $\beta$ -Asaron (**4**) in humanen Lebermikrosomen. Insert oben links: Berechnete prozentuale Beteiligung aller untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von **4** (Beteiligung  $(\text{CYP}_i)_{\text{HLM}}$ ). Die Berechnungen erfolgten nach denen in Kap. 5.4.1.7 aufgeführten Methoden. Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweiten) entfernt.

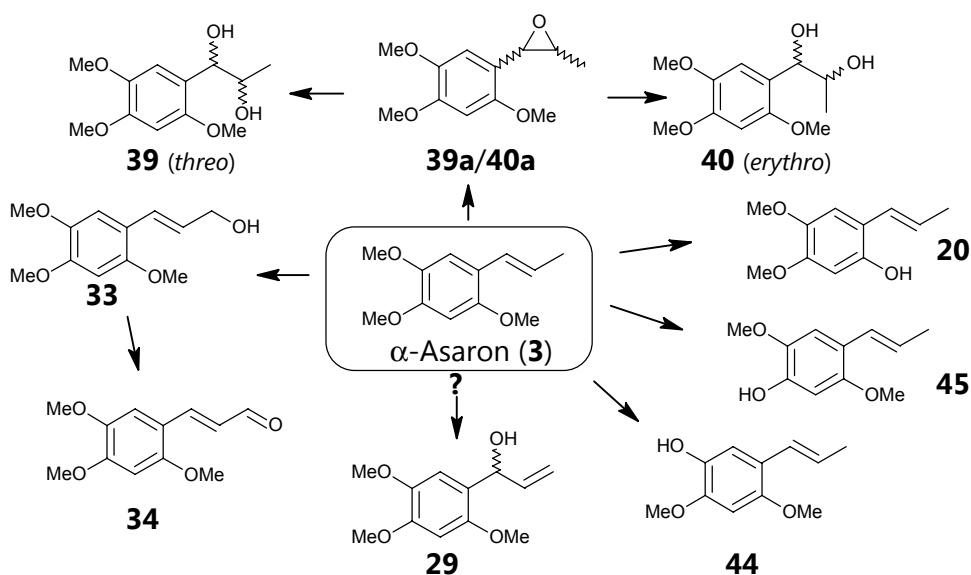


**Abbildung 96.** Berechnete prozentuale Beteiligung humaner CYPs an der Bildung der Metaboliten von  $\beta$ -Asaron (4) in HLM (berechnet nach Gleichung 9, Kap. 5.4.1.7). Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweiten) entfernt.

## 5.4.7 Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (3)

### 5.4.7.1 Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\alpha$ -Asaron (3)

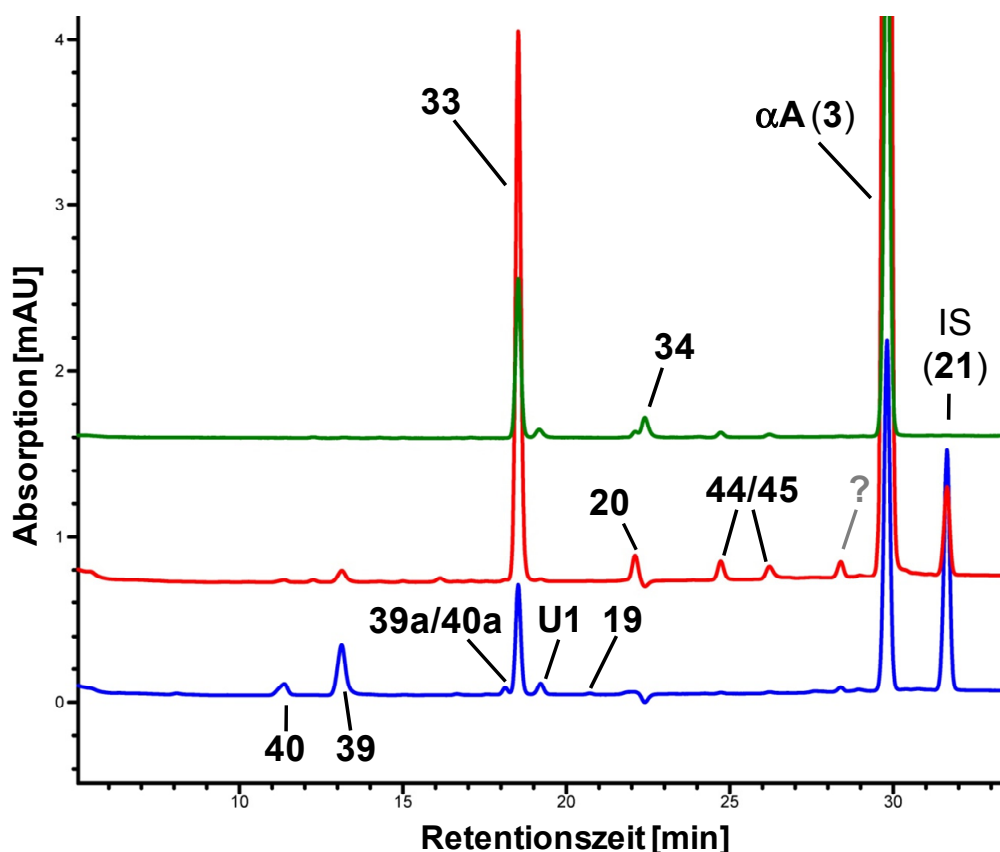
Die Identifizierung der Metaboliten von  $\alpha$ -Asaron (**3**) erfolgte durch Analogieschlüsse sowie insbesondere durch Vergleich der Retentionszeiten, UV-Spektren und Massensignale (LC-MS/MS), ohne dass gesonderte  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Beweise geführt wurden. Abbildung 97 zeigt eine Übersicht der identifizierten und mutmaßlich in mikrosomalen Inkubationen mit **3** gebildeten Metaboliten. Ein beispielhaftes Chromatogramm der Inkubation von **3** mit ARLM ist in Abbildung 98 dargestellt.



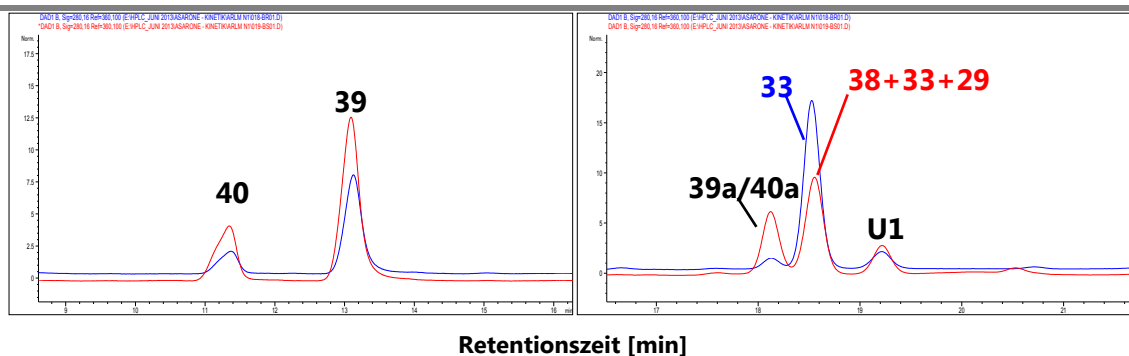
**Abbildung 97.** Identifizierte und mutmaßlich gebildete Metaboliten (**39a**, **44**, **45**) der Inkubationen von Lebermikrosomen mit  $\alpha$ -Asaron (**3**).

In Abbildung 99 (S. 190) sind die Überlagerungen der UV-Chromatogramme im Retentionszeitenbereich der Diolen bzw. Seitenkettenalkohole der Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) bzw.  $\beta$ -Asaron (**4**) mit ARLM gezeigt. Da alle weiteren untersuchten physiko-chemischen Parameter der Verbindungen identisch waren, wurde daraus geschlossen, dass es sich bei den beiden Diolen **39** und **40** sowohl bei **3** als auch **4** um die gleichen Verbindungen handelt. Das Verhältnis **40:39** betrug dabei in allen lebermikrosomalen Inkubationen mit **3** ca. 1:4–5. Die spektroskopische Untersuchung der Peaks im Seitenkettenalkoholbereich mit  $t_R \approx 18,5$  min ergab keine Hinweise auf die Bildung von (*Z*)-3'-Hydroxyasaron (**38**). Daher konnte die Quantifizierungs- bzw. Unterscheidungsmethode von bzw. zwischen **33** und **29** (s. Kap. 5.3.2) angewendet werden. Alle Messungen wurden auf die mögliche Bildung von **29** hin untersucht. Dabei wurde mit Ausnahme der Inkubationen von ARLM und CYP3A4 nachgewiesen, dass der Peak mit  $t_R = 18,5$  min zu 100 % aus **33** bestand. In Inkubationen mit ARLM

und CYP3A4 mit **3**, wurde der Anteil von **29** in diesem Peak konsistent und reproduzierbar auf bis zu 7 % bestimmt, wobei eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde. Je länger die Inkubationsdauer oder höher die Startkonzentration von **3**, desto höher der berechnete Anteil von **29**. Da kein NMR-spektroskopischer Beweis für die Bildung von **29** erbracht wurde, bleibt es jedoch fraglich, ob **29** tatsächlich gebildet wurde oder es sich nicht vielmehr um ein Artefakt der beschriebenen Quantifizierungsmethode handelt: ARLM und CYP3A4 bilden im Vergleich zu den anderen untersuchten LM und Supersomes™ relativ hohe Konzentrationen der Epoxide **39a/40a**. Je nach Fläche des Alkoholpeaks bei  $t_R = 18,5$  min ( $\lambda_{\max} = 215, 262, 315$  nm) und der des Epoxidpeaks bei  $t_R = 18,2$  min ( $\lambda_{\max} = 228, 290$  nm), ist es denkbar, dass durch geringfügige Koelution von **39a/40a** in den Peak von **33** (vgl. Abbildung 98 und 99) der Flächenanteil des Alkoholpeaks bei  $\lambda = 280$  nm etwas vergrößert würde. Dadurch würde die berechnete Konzentration von **33** < 100 % betragen. In der Berechnung der Konzentrationen wurde ein potentieller Anteil von **29** daher nicht berücksichtigt. Die Massensignale der synthetischen Verbindungen **39** und **40** sowie **33** und **34** sind jeweils identisch mit den Massensignalen aus mikrosomalen Inkubationen.



**Abbildung 98.** HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten des Inkubationsüberstandes der Reaktion von ARLM mit  $\alpha$ -Asaron (**3**, Startkonzentration 400  $\mu$ M, Inkubationsdauer 20 min) bei verschiedenen Messwellenlängen:  $\lambda = 280$  nm (blau); 261 nm (rot); 340 nm (grün). Referenzwellenlängen:  $\lambda = 360, 360$  und 450 nm. Konzentration des internen Standards (**21**) 67  $\mu$ M. Die Substanznummern sind in Abbildung 97 und in der dieser Arbeit vorangestellten Substanzübersicht erläutert.



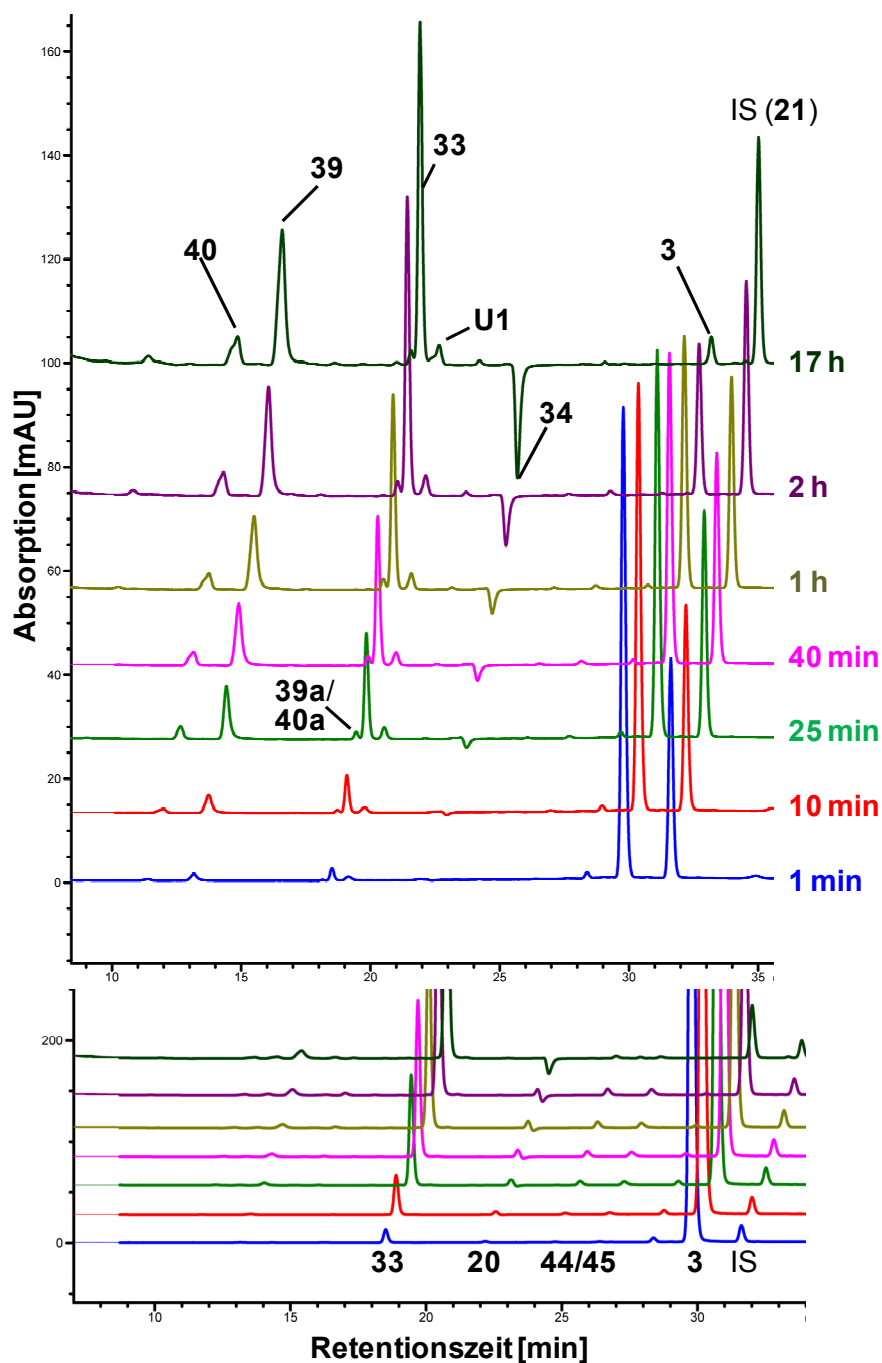
**Abbildung 99.** Überlagerung der HPLC-UV-Chromatogramme von  $\alpha$ -Asaron (**3**, blau) und  $\beta$ -Asaron (**4**, rot). Links: Diole **39** und **40**; rechts: Alkoholbereich: **29**, **33** bzw., **38** und **U1** bei  $\lambda = 280$  nm.

Die beiden in Abbildung 98 als **44/45** gekennzeichneten Metaboliten repräsentieren wegen ihrer Massensignale und UV-Spektren höchstwahrscheinlich die einfach O-demethylierten Verbindungen (*E*)-3-Hydroxyasaron (**44**) bzw. (*E*)-4-Hydroxyasaron (**45**), wobei aus Ermangelung der Referenzsubstanzen keine Zuordnung beider Verbindungen getroffen werden konnte. Anhand der Analogie zu Eugenol (**6**; „4-Hydroxymethyleugenol“,  $t_R = 24,4$  min) und Chavibetol (**8**; „3-Hydroxymethyleugenol“;  $t_R = 24,8$  min) wäre es wahrscheinlich, dass die früher eluierende Verbindung mit  $t_R = 24,9$  min die 4-Hydroxyverbindung **45** darstellt, während die mit  $t_R = 26,4$  min später eluierende Verbindung dem 3-Hydroxyderivat **44** zuzuordnen wäre. (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) wurde anhand der übereinstimmenden UV-Spektren, Retentionszeiten und Massensignale von Metabolit und synthetisierter Referenz identifiziert.

#### 5.4.7.2 Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (**3**) in Lebermikrosomen

In Abbildung 100 ist beispielhaft ein Set von Chromatogrammen der Inkubation von ARLM mit  $\alpha$ -Asaron (**3**, 500  $\mu$ M) bei verschiedenen Messwellenlängen sowie der identifizierten Metaboliten gezeigt. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 101 bis 105, Seite 193 ff.) illustrieren die Ergebnisse zur Untersuchung des Zeitverlaufes der Inkubationen verschiedener Lebermikrosomen (LM) mit **3**.

Hauptmetabolit in den Inkubationen von **3** mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM; Abbildung 101, Seite 193) war (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**), dessen Konzentration stetig anstieg und nach 17 h 44,2 % betrug. Das Oxidationsprodukt dieses Alkohols, (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) war zum ersten Mal nach 25 min detektierbar. Die Konzentration von **34** stieg im Inkubationsverlauf ebenfalls stetig an. Nach 17 h lagen 8,4 % der ursprünglichen Konzentration von **3** als **34** vor.



**Abbildung 100.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten zum Zeitverlauf der Inkubation von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM). Startkonzentration von **3**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h; **oben**: Messwellenlänge  $\lambda = 280$  nm; **unten**: Die gleichen Chromatogramme wie oben, aber bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 261$  nm zur besseren Sichtbarmachung der O-demethylierten Verbindungen **20, 44/45** ( $\lambda_{\text{ref}}$  jeweils 450 nm).

Bereits nach 10 min waren die kontinuierlich gebildeten Diole **39** und **40** detektierbar, deren Gesamtkonzentration nach 17 h 18,0 % betrug und die konstant im Verhältnis 1:4 (**40**:**39**) gebildet wurden. Die Epoxide **39a/40a** waren ebenfalls bereits nach 10 min detektierbar. Deren Gesamtkonzentration stieg innerhalb von zwei Stunden auf maximal 0,9 % und blieb im

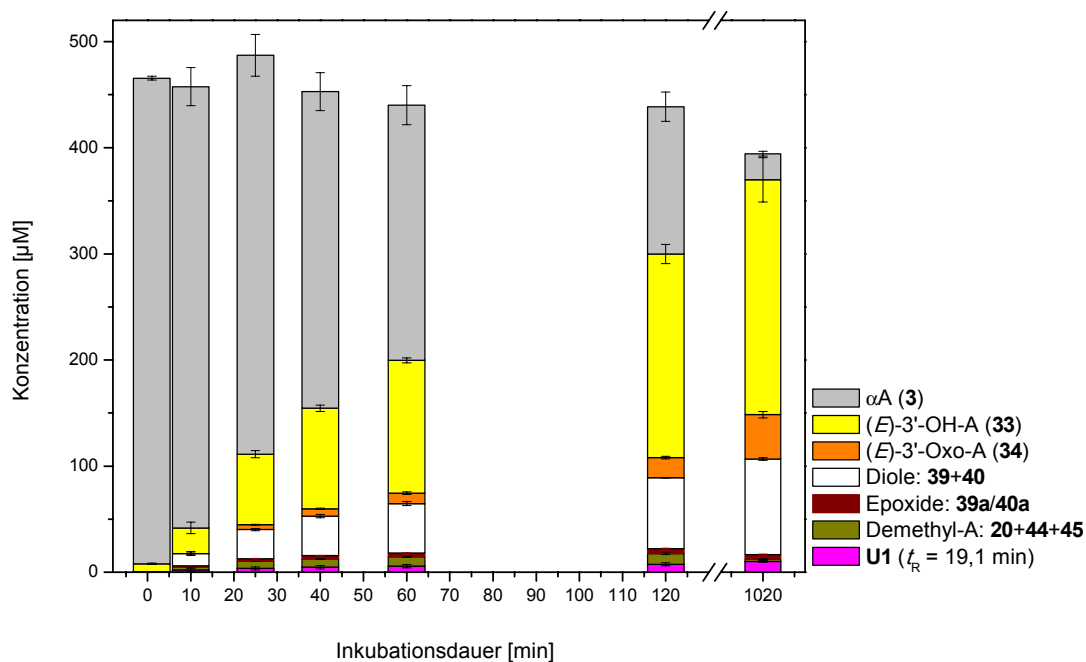
weiteren Inkubationsverlauf konstant bei diesem Wert. In geringen Konzentrationen wurden die *O*-demethylierten Verbindungen **20+44/45** mit maximal 2,1 % nach zwei Stunden detektiert, wobei nach 17 h nur noch 0,4 % nachweisbar waren. Das Verhältnis **20:44:45** war dabei ungefähr gleichmäßig verteilt. Der nicht identifizierte Metabolit **U1** war mit maximal 2,0 % nach 17 Stunden detektierbar. Die Metabolitenkonzentrationen bei den Inkubationen von Rattenlebermikrosomen (**RLM**; Abbildung 102) mit **3** erreichten nach 40 Minuten ein Plateau, nach dessen Erreichen sich die Gesamtkonzentration der detektierten Metaboliten nicht mehr wesentlich änderte. Hauptmetabolit war hier mit großem Abstand **33** (maximal 15,7 % nach 40 min), dessen Konzentration nach 17 h zu Gunsten des oxidierten Sekundärmetaboliten **34** auf 10,4 % sank. **34** war wie bei ARLM nach 25 min zum ersten Mal detektierbar und erreichte nach 17 h eine maximale Konzentration von 4,5 %. Die Diole **39** und **40** erreichten bereits nach 25 min zusammen eine Konzentration von 2,7 %, die im weiteren Inkubationsverlauf nur leicht stieg. Die Konzentration der korrespondierenden Epoxide **39a/40a** war auch bei RLM mit nahezu konstanten 0,09 % nachzuweisen und war somit gerade noch quantifizierbar. In geringen Konzentrationen wurden **U1** und die *O*-demethylierten Verbindungen detektiert, wobei letztere nach 40 min eine maximale Konzentration von 0,6 % erreichen und nach 17 h nicht mehr detektierbar waren.

Rinderlebermikrosomen (**BLM**; Abbildung 103) unterschieden sich wenig von ARLM, bildeten aber, abgesehen von den *O*-demethylierten Verbindungen, etwas geringere Konzentrationen der einzelnen Metaboliten. Schweinelebermikrosomen (**SLM**; Abbildung 104) zeigten insgesamt eine ähnliche Bildungscharakteristik wie RLM, jedoch mit deutlich anderem quantitativen Metabolitenspektrum. Während in RLM **33** den Hauptanteil der Metaboliten ausmachte, waren es in SLM die Seitenkettendiole **39** und **40**. Nach einer Stunde lagen bereits 9,7 % und nach 17 Stunden 14,5 % der Diole in einem Verhältnis von 1:4 (**40:39**) vor. Korrespondierend mit der hohen Bildungsrate der Diole war auch die Konzentration der Epoxide **39a/40a** bei der Inkubation von **3** mit SLM am höchsten. Während in den ersten beiden Stunden im Schnitt nur 0,1 % detektiert wurden, stieg die Konzentration nach 17 h auf 0,7 %. Des Weiteren wurden die *O*-demethylierten Verbindungen mit zusammen maximal 3,4 % und **U1** mit maximal 1,6 % nach jeweils zwei Stunden detektiert.

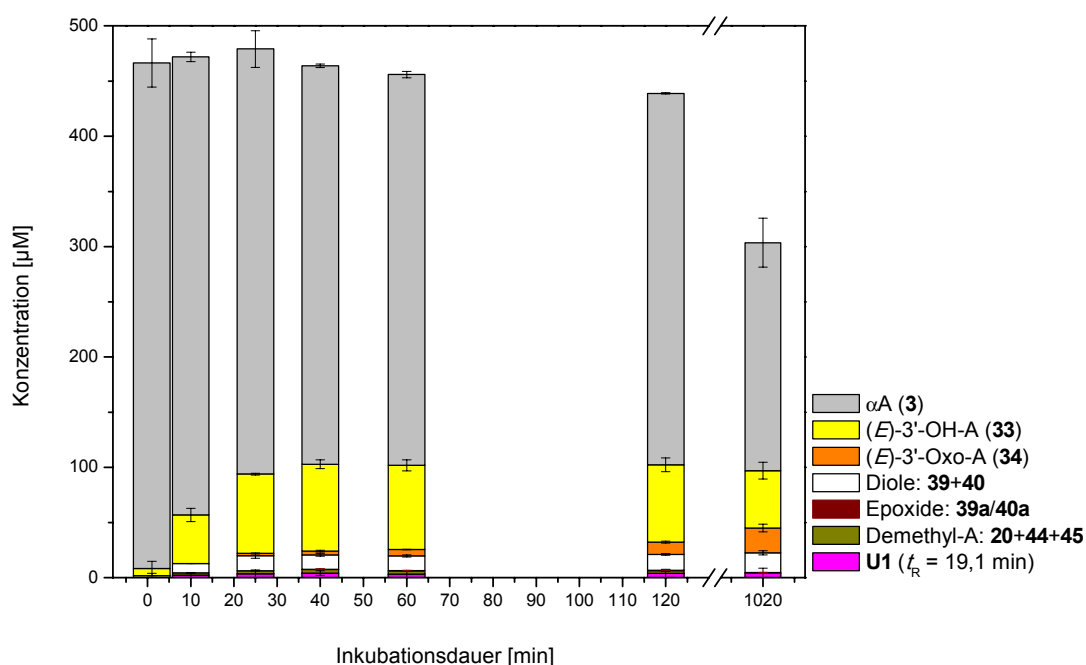
Humane LM (**HLM**; Abbildung 105) zeigten ein ähnliches Bild wie ARLM, waren aber aktiver in der Bildung der Diole **39** und **40** sowie des Aldehyds **34**. Nach 2 h lagen rund 41 % der eingesetzten Startkonzentration in Form detektierbarer Metaboliten vor, wobei die Gesamtwiederfindung 56 % betrug.

Die Bildungsraten der Metaboliten in allen Inkubationen mit **3** waren über die ersten 25 min nahezu linear, wobei in den Umsetzungen von RLM mit **3**, wie bei den anderen Inkubationen, am schnellsten ein Plateau konstanter Metabolitenkonzentrationen erreicht wurde.

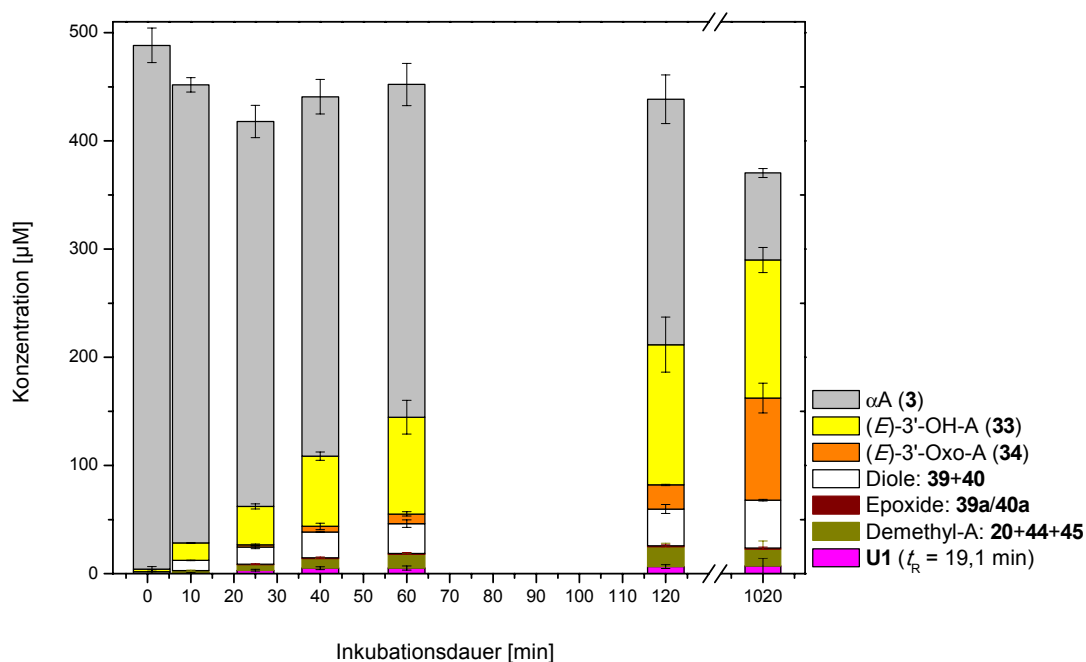




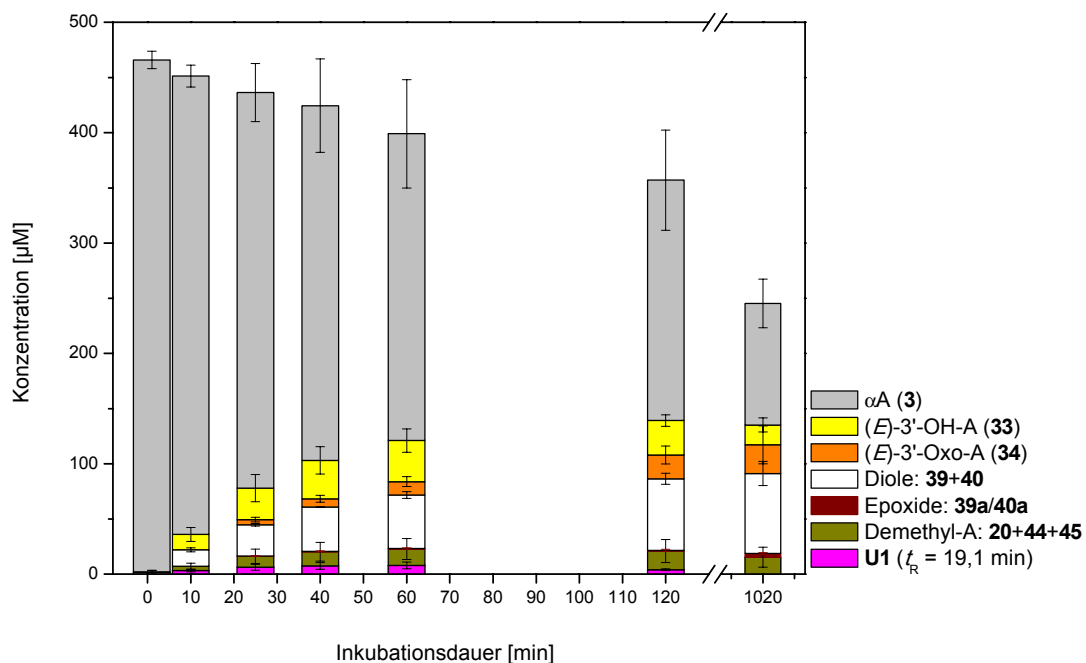
**Abbildung 101.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM). Startkonzentration von **3**: 500 µM, 1 % MeCN, Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit ARLM verschiedener Tiere.



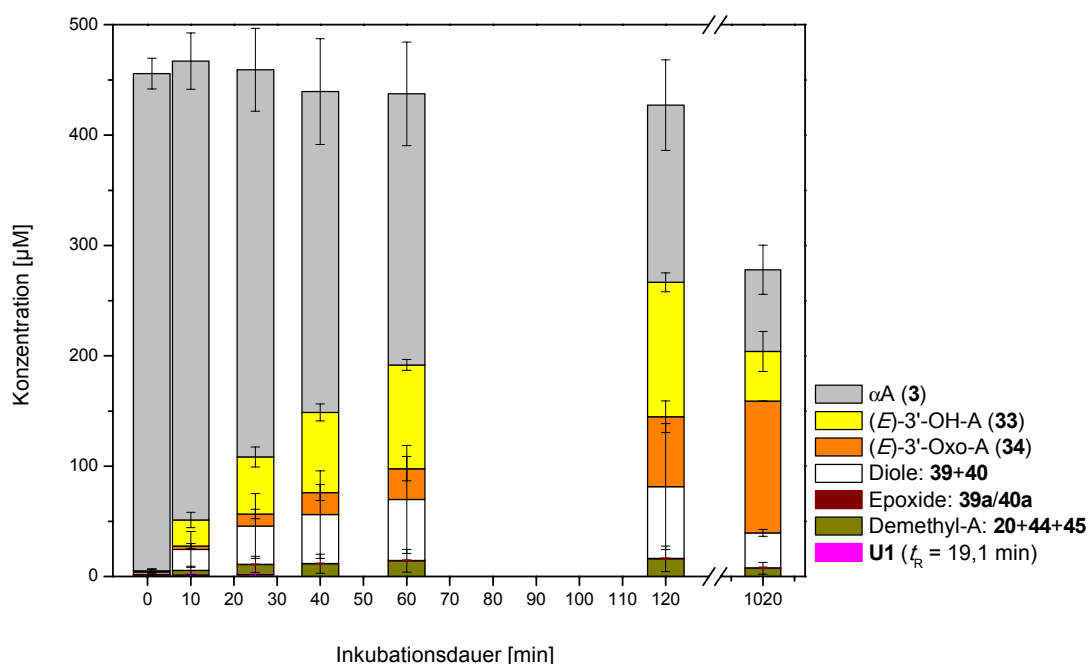
**Abbildung 102.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM). Startkonzentration von **3**: 500 µM, 1 % MeCN, Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.



**Abbildung 103.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Rinderlebermikrosomen (BLM). Startkonzentration von **3**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN, Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit BLM des gleichen Tieres.



**Abbildung 104.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Schweinelebermikrosomen (SLM). Startkonzentration von **3**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN, Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit SLM des gleichen Tieres.

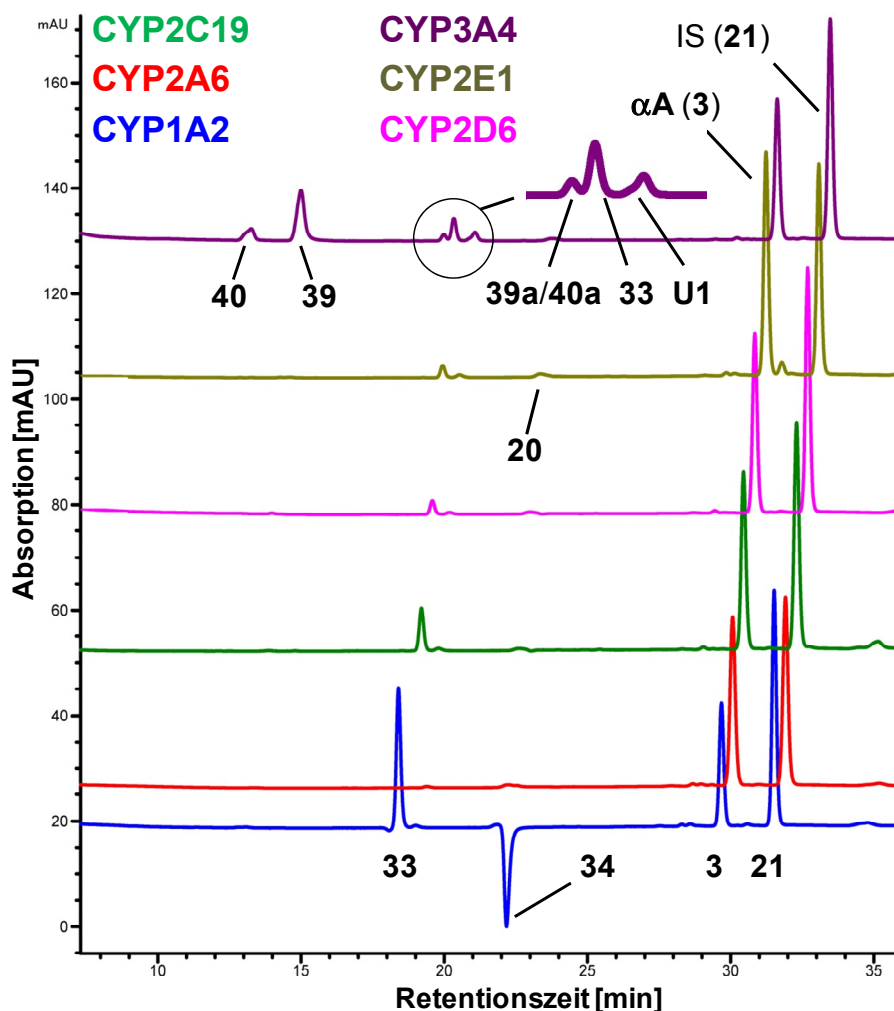


**Abbildung 105.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit humanen Lebermikrosomen (**HLM**). Startkonzentration von **3**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN, Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit der gleichen Charge gepoolter HLM von 150 männlichen und weiblichen Spendern.

### 5.4.7.3 Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (**3**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

$\alpha$ -Asaron (**3**) zeigte die ausgeprägteste Spezifität in Hinblick auf die durch humane CYPs katalysierten Reaktionen. Der Gesamtumsatz aller Enzyme und auch das Metabolitenprofil sind dem von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) sehr ähnlich. Abbildung 106 zeigt ein beispielhaftes Set von Chromatogrammen der Inkubationen der sechs Supersomes<sup>TM</sup> mit **3**. Die aus den Chromatogrammen berechneten Konzentrationen der Metaboliten dieser Umsetzungen sind in Abbildung 107 und Abbildung 108 (Seite 197) dargestellt. CYP1A2 katalysierte nur zwei Reaktionen: die Bildung von (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) und dessen Oxidation zu (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**). Beide Reaktionen wurden äußerst potent katalysiert. In Inkubationen mit 200  $\mu$ M **3** wurden nach einer Stunde mehr als die Hälfte des eingesetzten Substrates als **33** und rund 28 % **34** detektiert. Für CYP2A6 war **3** ein schlechtes Substrat. In messbaren Konzentrationen wurden lediglich das *O*-demethylierte  $\alpha$ -Asaron-Isomer **20** sowie in sehr geringer Konzentration **34** detektiert. Da **34** detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass der Seitenkettenalkohol **33** ebenfalls entstand. Die Gesamtausbeute detektierbarer Metaboliten betrug bei beiden Startkonzentrationen und Zeitpunkten maximal 5 %. CYP2C19 katalysierte potent die Bildung von **33**. Nach einer Stunde wurden bei der Inkubation mit 200  $\mu$ M **3** 27 % zu **33**

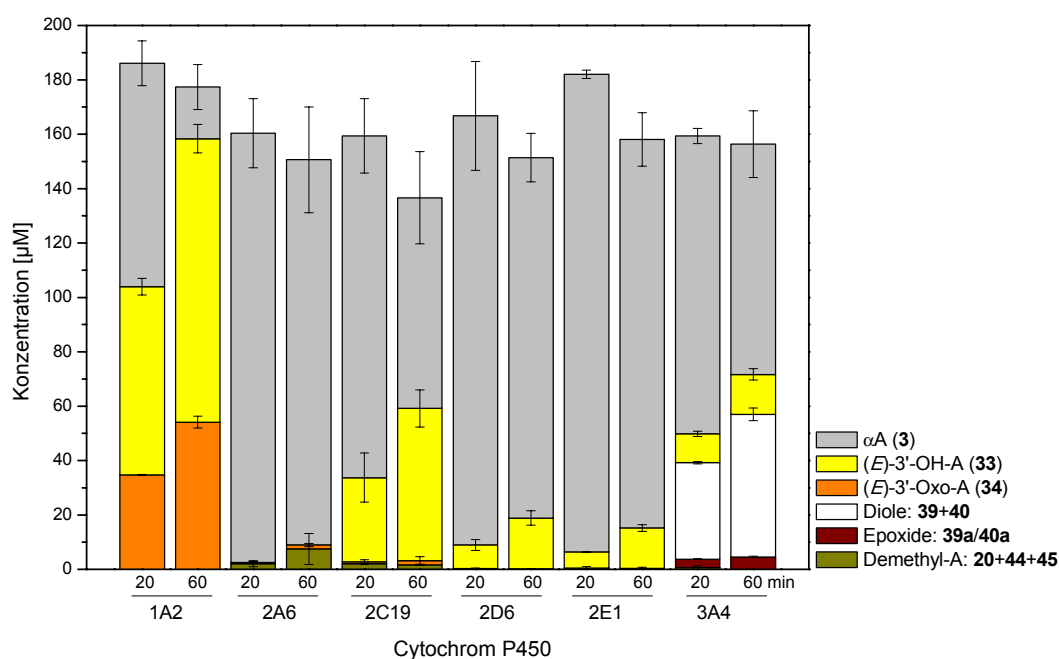
umgesetzt. Die Oxidation zu **34** fand auch hier statt, jedoch in sehr geringem Umfang. Ebenfalls in sehr geringen Konzentrationen waren die *O*-demethylierten Metaboliten **20** + **44/45** detektierbar, wobei **20** den Hauptanteil ausmachte.



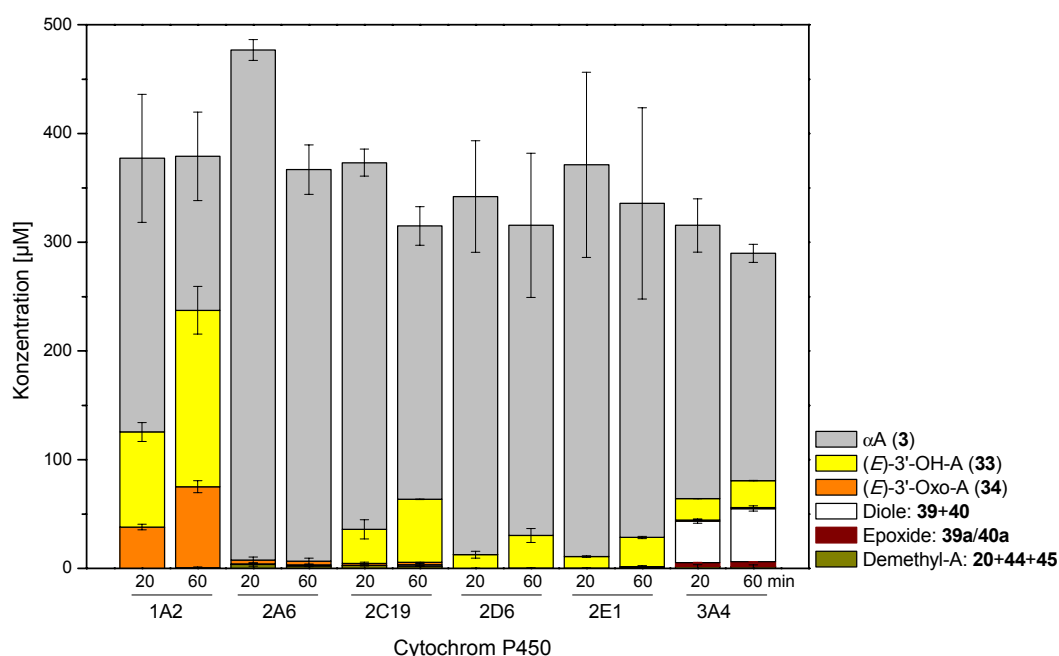
**Abbildung 106.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation verschiedener Supersomes™ (120 nM) mit  $\alpha$ -Asaron (**3**; 200  $\mu$ M; 1% MeCN) nach 20 min bei  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 360$  nm). Konzentration des internen Standard (**21**): 67  $\mu$ M.

CYP2D6 und CYP2E1 katalysierten vorrangig die Bildung von **33**, deren Konzentrationen nach einer Stunde 9,4 % bzw. 7,5 % betragen. In Spuren konnte daneben **34** in Gehalten von jeweils unter 0,3 % detektiert werden. CYP3A4 katalysierte die Bildung von **33** in vergleichbarem Ausmaß wie CYP2D6. Daneben war es das einzige untersuchte Enzym, welches die Bildung der Epoxide **39a/40a** und der Seitenkettendiole **39** und **40** katalysierte. Die Konzentration der Epoxide änderte sich nur unwesentlich im Inkubationsverlauf (1,6–2,3 %), während die Konzentration der Diole von 18 % nach 20 min auf 26 % nach einer Stunde stieg (für 200  $\mu$ M **3**). CYP3A4 katalysierte schließlich auch die Bildung des nicht

identifizierten Metaboliten **U1** bei  $t_R = 19,2$  min, dessen Konzentrationen nicht in den Abbildung 107 und Abbildung 108 angegeben sind, aber auf maximal 3 % geschätzt wurden.



**Abbildung 107.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **200  $\mu$ M 3** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.



**Abbildung 108.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **500  $\mu$ M 3** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.

### 5.4.7.4 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (**3**) in Lebermikrosomen

Die aus verschiedenen Inkubationen von Lebermikrosomen (LM) oder Supersomes<sup>TM</sup> mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) gewonnenen kinetischen Daten sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeiten und katalytischen Effizienzen unterscheiden sich nur geringfügig von denen, die bei  $\beta$ -Asaron (**4**) bestimmt wurden. Jedoch ist die Metabolitenverteilung hier eine andere. War bei **4** die Bildung der Epoxide/Diole der dominierende Reaktionsweg, so ist bei **3** die Bildung des Seitenkettendiols (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) – außer bei SLM – in allen anderen untersuchten LM die vorherrschende Reaktion. Die Diole **39** und **40** wurden auch in den Inkubationen von LM mit **3** gebildet, wobei im Gegensatz zu den Inkubationen mit **4** wesentlich geringere Konzentrationen der korrespondierenden Epoxide **39a/40a** detektiert wurden.

**Tabelle 34.** Bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	<i>E</i> -3'-OH-A ( <b>33</b> )	<i>E</i> -3'-Oxo-A ( <b>34</b> )	A-Epoxide ( <b>39a/40a</b> )	A-Diole ( <b>39, 40</b> )	Demethyl ( <b>20, 44, 45</b> )	Summe Metaboliten
ARLM	$v_{\max}$ (app)	1,94	0,35	0,11	0,96	0,48	2,92
	$K_M$ (app)	31,8	2E+140	87,8	23,4	402	18,1
	$E_{\text{cat}}$ (app)	61,1	0,00	1,29	41,2	1,21	161
RLM	$v_{\max}$ (app)	3,41	0,11	0,09	1,27	0,32	5,17
	$K_M$ (app)	94	12,7	288	408	293	137
	$E_{\text{cat}}$ (app)	36,4	8,63	0,32	3,12	1,08	37,6
BLM	$v_{\max}$ (app)	1,75	0,15	0,04	1,02	0,55	3,83
	$K_M$ (app)	66,2	280	63,1	89,7	86,5	93,7
	$E_{\text{cat}}$ (app)	26,5	0,54	0,58	11,4	6,39	40,9
SLM	$v_{\max}$ (app)	1,98	0,13	0,05	1,32	0,58	3,81
	$K_M$ (app)	633	67,9	175	177	49,8	234
	$E_{\text{cat}}$ (app)	3,13	1,96	0,27	7,44	11,6	16,3
HLM	$v_{\max}$ (app)	1,48	0,13	0,09	0,67	1,56	5,01
	$K_M$ (app)	112	42,0	381	264	385	384
	$E_{\text{cat}}$ (app)	13,2	3,16	0,23	2,52	4,05	13,0

Inkubationsbedingungen: Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **3**: 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

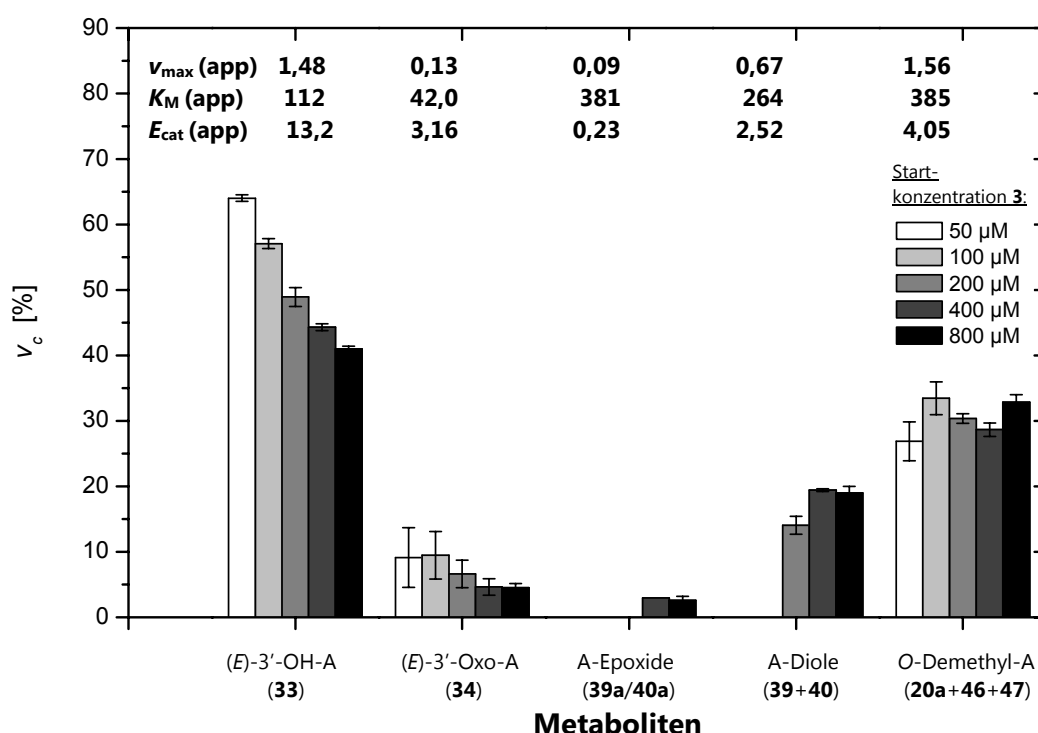
$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{\max}$  (app): maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

Einhergehend mit der vermehrten Bildung von **33** wurden auch höhere Konzentrationen des Aldehyds **34** detektiert und somit konnten für alle Inkubationen mit LM kinetische Parameter

für diese Reaktion abgeleitet werden. Das Ranking der katalytischen Gesamteffizienz des Umsatzes von **3** lautet: ARLM >> BLM  $\approx$  RLM > SLM  $\approx$  HLM. Der Vergleich der kinetischen Daten von ARLM mit RLM zeigt, dass durch die Induktion mit Aroclor 1254 die katalytischen Effizienzen der Bildung von **33** und der Diole **39** + **40** deutlich erhöht wurden. Obgleich die Bildungsgeschwindigkeiten dieser Metaboliten in RLM etwas höher waren, ist der  $K_M$ -Wert für die Bildung von **33** in RLM etwa dreimal, und der  $K_M$ -Wert der Diole in RLM etwa 20-mal größer als in ARLM. Die Bildung der O-demethylierten Verbindungen **20** und **44/45** wurde hingegen wenig beeinflusst. BLM verhalten sich wie bei den anderen Substraten ähnlich zu ARLM und weisen in der Summe eine geringere Effizienz für die meisten Reaktionen auf. In SLM ist die Bildung von **33** zwar die Reaktion mit der höchsten Reaktionsgeschwindigkeit, allerdings ist die Affinität zu dieser Reaktion relativ gering, weshalb die Bildung der Diole **39** und **40** im Falle kleiner Substratkonzentrationen zusammen mit der Bildung der O-demethylierten Verbindungen **20** und **44/45** die dominierenden Reaktionen in SLM darstellen. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen des Zeitverlaufes der Inkubationen von SLM mit **3** überein, wo die Diole zu jedem Zeitpunkt die Hauptmetaboliten stellten.



**Abbildung 109.** Abhängigkeit der Metabolitenbildungsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration: Prozentualer Beitrag der gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten bei gegebener Substratstartkonzentration  $v(c)$  der einzelnen Metaboliten an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit ( $\Sigma v(\text{alle identifizierten Metaboliten})/v(\text{Metabolit } i)$ ) der Reaktionen von HLM mit  $\alpha$ -Asaron (**3**). Oben: kinetische Parameter  $v_{max}$ ,  $K_M$  und  $E_{cat}$ . Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{max}$  (app): max. apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{cat}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{max}$  (app)/ $K_M$  (app); [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

In Abbildung 109 sind die prozentualen gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten für die identifizierten Metaboliten von **3** in HLM bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgetragen. Für die Bildung von **33** ist eine eindeutige Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration erkennbar. Während die Beteiligung der Bildung von **33** mit steigender Substratkonzentration sinkt, steigt wahrscheinlich die Bildung der Epoxide **39a/40a** und Diole **39 + 40** an.

Dieser Trend wird durch die berechneten prozentualen  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$ -Werte in Tabelle 35 bestätigt. Im Vergleich zu den anderen untersuchten LM weisen HLM über einen weiten Substratkonzentrationsbereich eine geringe Bildung der Epoxide **39a/40a** bzw. Diole **39+40** auf. So scheint in HLM bei hohen Substratkonzentrationen die Bildung der O-Demethylierten Verbindungen **20+44+45** stark an Bedeutung zu gewinnen. Im Falle geringer Substratkonzentrationen wird deren Bildung immer noch 17 % des Gesamtumsatzes ausmachen und ferner die Bildung von **34** forciert sein.

**Tabelle 35.** Prozentuale bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Lebermikrosomen.

LM	Parameter	<i>E</i> -3'-OH-A ( <b>33</b> )	<i>E</i> -3'-Oxo-A ( <b>34</b> )	A-Epoxide ( <b>39a/40a</b> )	A-Diole ( <b>39, 40</b> )	Demethyl ( <b>20, 44, 45</b> )
ARLM	$v_{\max}$ (app)	50	9	3	25	13
	$E_{\text{cat}}$ (app)	58	0	1	39	1
RLM	$v_{\max}$ (app)	66	2	2	24	6
	$E_{\text{cat}}$ (app)	73	17	1	6	2
BLM	$v_{\max}$ (app)	50	4	1	29	16
	$E_{\text{cat}}$ (app)	58	1	1	25	14
SLM	$v_{\max}$ (app)	49	3	1	32	14
	$E_{\text{cat}}$ (app)	13	8	1	30	48
HLM	$v_{\max}$ (app)	38	3	2	17	40
	$E_{\text{cat}}$ (app)	57	14	1	11	17

$v_{\max}$  (app): prozentuale maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit

$E_{\text{cat}}$  (app): prozentuale „apparente katalytische Effizienz“

Summen  $\neq$  100 % sind rundungsbedingt.

Für alle weiteren untersuchten LM ist die Bildung von **33** über einen weiten Substratkonzentrationsbereich die dominierende Reaktion. Lediglich in SLM und kleinen Substratkonzentrationen wird diese Reaktion eine untergeordnete Rolle spielen und die Bildung der Epoxide und Diole sowie der O-demethylierten Verbindungen dominierend sein, was anhand der absoluten kinetischen Daten schon ersichtlich war.



### 5.4.7.5 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\alpha$ -Asaron (**3**) in Cytochrom P450-Enzymen und deren Beteiligung in HLM

Wie bereits in Kapitel 5.4.7.3 gezeigt wurde, wiesen die untersuchten CYPs eine sehr hohe Spezifität in Hinblick auf das katalysierte Metabolitenspektrum auf. In Tabelle 36 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Supersomes<sup>TM</sup> dargestellt.

**Tabelle 36.** Bildungskinetische Parameter für die quantifizierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup>.

CYP	Parameter	E-3'-OH-A (33)	E-3'-Oxo-A (34)	A-Epoxide (39a/40a)	A-Diole (39, 40)	Demethyl (20, 44, 45)	Summe Metaboliten
CYP1A2	$k_{cat}$	42,3	13,8	nd	nd	nd	55,6
	$K_M$	166	107				154
	$E_{cat}$	255	129,3				361
CYP2A6	$k_{cat}$	nd	wd	nd	wd	wd	wd
	$K_M$						
	$E_{cat}$						
CYP2C19	$k_{cat}$	14,1	0,58	nd	nd	0,93	13,7
	$K_M$	41,2	10,00			83,2	13,6
	$E_{cat}$	342	58			11,2	1005
CYP2D6	$k_{cat}$	22,5	nd	nd	nd	nd	s.3'OH
	$K_M$	1034					
	$E_{cat}$	21,7					
CYP2E1	$k_{cat}$	3,67	nd	nd	nd	nd	s. 3'OH
	$K_M$	309					
	$E_{cat}$	11,9					
CYP3A4	$k_{cat}$	13,7	nd	1,39	15,4	3,11	31,2
	$K_M$	312		49,4	46,3	627	74,3
	$E_{cat}$	43,8		28,1	332	4,97	420

Inkubationsbedingungen: CYP-Konzentration jeweils 120 nM; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **3**: 50, 100, 200, 500, 800  $\mu$ M in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$ : (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu$ M]

$k_{cat}$ : Wechselzahl; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{nmol Cytochrom P450})^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]

$E_{cat}$ : „katalytische Effizienz“ =  $k_{cat}/K_M$ ; [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];

nd: Metabolit nicht detektierbar

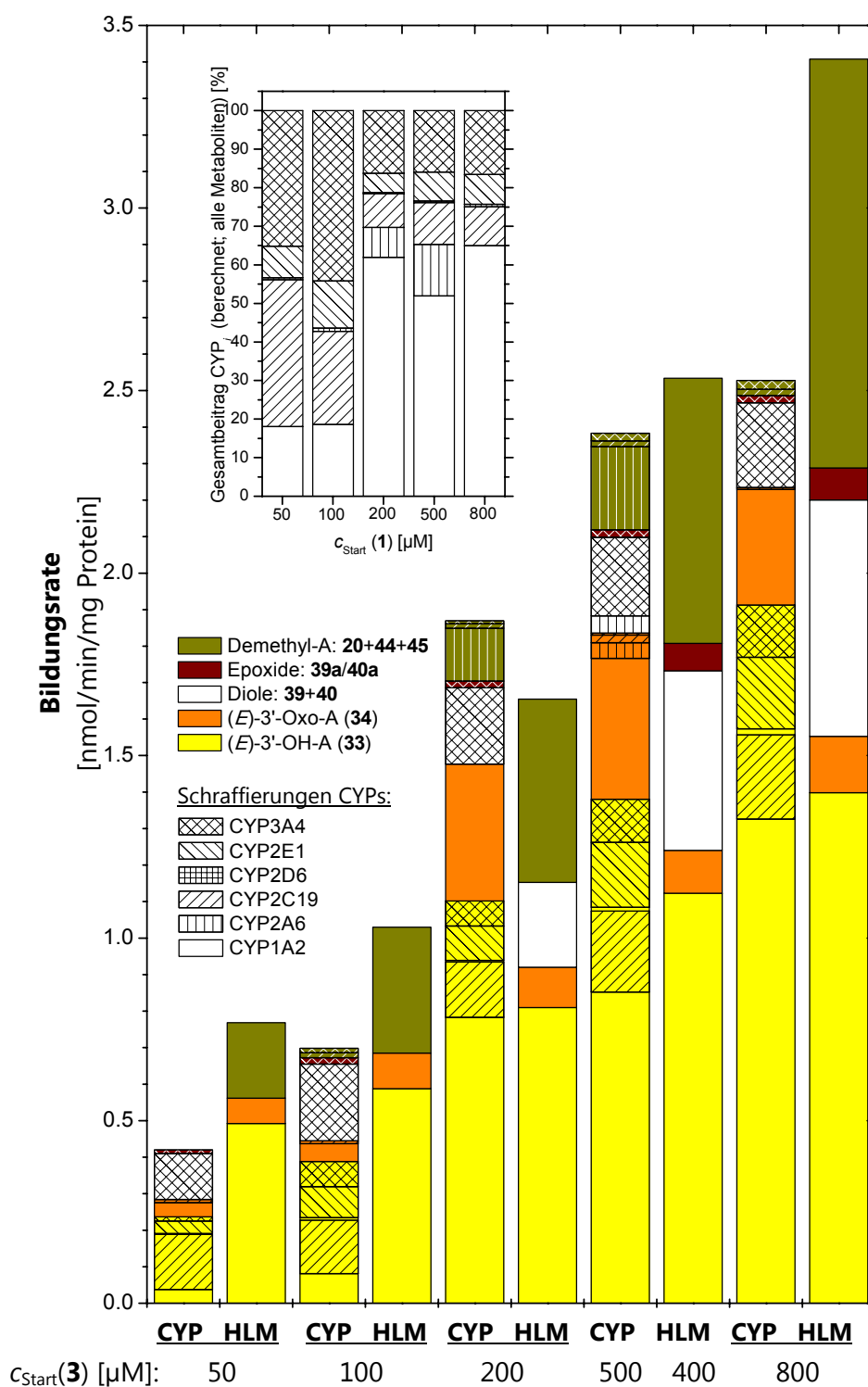
wd: zu wenige Datenpunkte (Metabolit wurde nicht über den gesamten beobachteten Konzentrationsbereich gebildet)

CYP1A2 und CYP2C19 katalysierten mit hoher Effizienz die Bildung von **33**, wobei  $v_{max}$  für CYP1A2 höher und  $K_M$  für CYP2C19 niedriger war. Somit ist CYP1A2 für diese Reaktion als *high capacity/low affinity*- und CYP2C19 als *low capacity/high affinity*-Enzym zu charakterisieren. Für die Oxidation von **33** zu **34** gilt der gleiche Zusammenhang, wobei hier CYP1A2

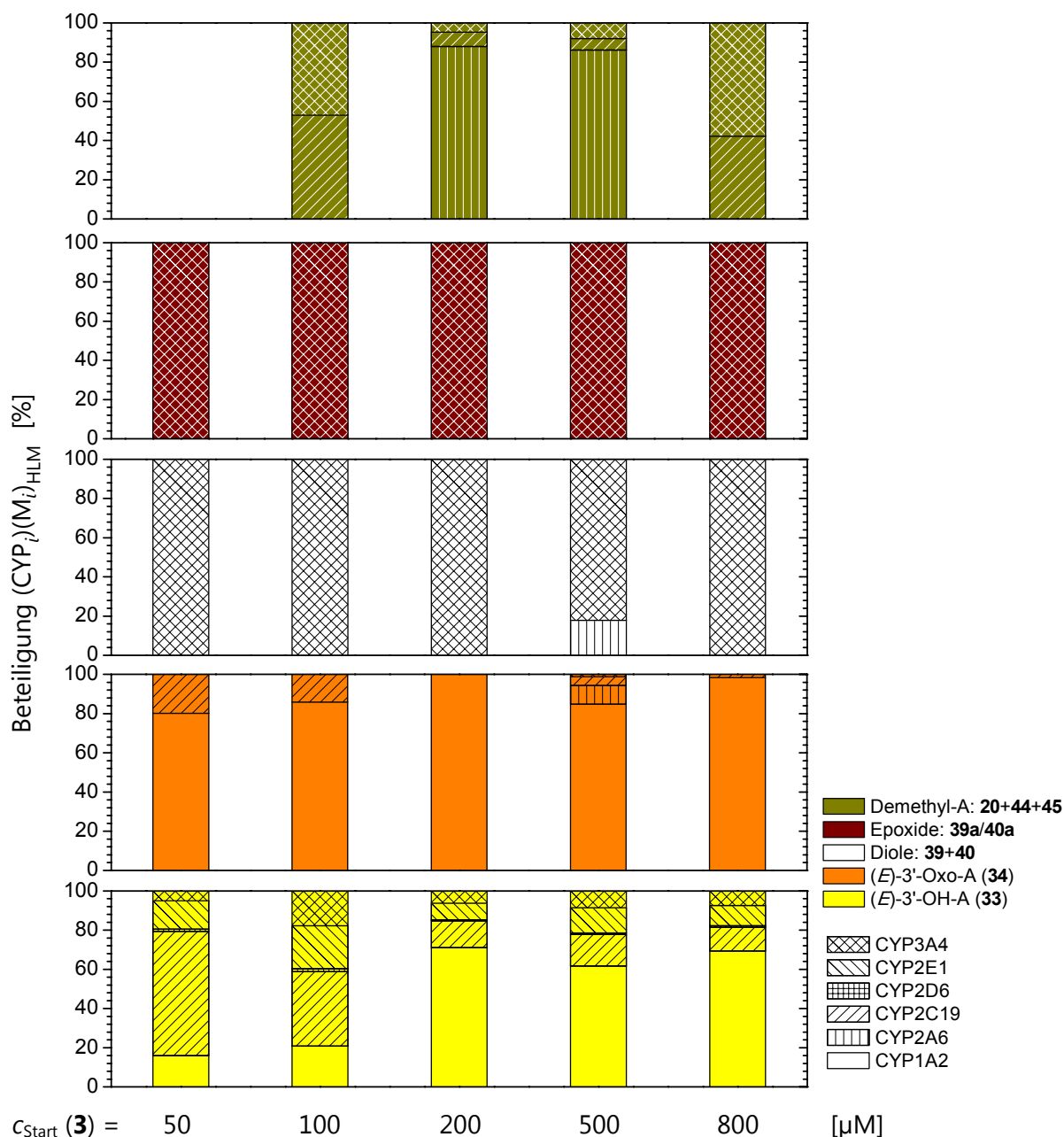
und CYP2C19 die einzigen Enzyme waren, die diese Reaktion in detektierbarem Ausmaß katalysierten. CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 katalysierten die Bildung von **33** ebenfalls, aber weniger effizient. Die Bildung der Epoxide **39a/40a** und entsprechenden Diole **39** und **40** wurde effizient und ausschließlich von CYP3A4 katalysiert. Die O-demethylierte Verbindungen **20** und **44/45** waren bei CYP2A6, CYP2C19 und CYP3A4 detektierbar, kinetische Parameter konnten jedoch nur für CYP2C19 und CYP3A4 abgeleitet werden.

Die aus den gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen CYPs berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten in HLM sind in Abbildung 110 (Seite 203) dargestellt. Das Insert dieser Abbildung zeigt, dass bei der geringsten untersuchten Substratkonzentration (50  $\mu\text{M}$ ) CYP1A2 nur mit rund 18 % an der Bildung der Metaboliten beteiligt ist. Die hauptsächlich beteiligten CYPs sind CYP3A4 und CYP2C19. Mit steigenden Substratkonzentrationen nimmt der Beitrag von CYP1A2 am Gesamtmetabolismus zu Lasten von CYP2C19 und CYP3A4 zu. Die berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten sind im gesamten Konzentrationsbereich (außer bei 200  $\mu\text{M}$ ) etwas unterprädiktiv. Wie bei  $\beta$ -Asaron (**4**) wird auch hier insbesondere die O-Demethylierung schlecht vorausgesagt, was auf die Beteiligung anderer bzw. weiterer Enzyme als die sechs untersuchten CYPs in HLM hindeutet. In HLM konnten im niedrigen Konzentrationsbereich (bis 100  $\mu\text{M}$ ) weder die Epoxide **39a/40a** noch die Diole **39** und **40** detektiert werden. Da diese Diole in den CYP3A4-exprimierenden Supersomes<sup>TM</sup> auch in geringen Substratkonzentrationsbereichen gebildet wurden, werden diese in der Berechnung vorhergesagt. Warum die Bildung der Diole in HLM bei geringen Substratkonzentrationen nicht oder langsamer als in den CYP3A4-Supersomes<sup>TM</sup> abläuft, ist unklar. Im Falle hoher Substratkonzentrationen wird die Bildungsgeschwindigkeit der Diole hingegen zu gering vorhergesagt. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen weitere Enzyme diese Reaktion katalysieren. Wie beim Metabolismus von Methyleugenol (**1**), werden auch hier die Bildungsgeschwindigkeiten des 3'-Alkohols (**33**) und des 3'-Aldehyds (**34**) zu hoch berechnet. Mögliche Gründe für diese Beobachtung sind dort (Kap. 5.4.2.4) beschrieben.

Insgesamt bildet die Berechnung die tatsächlichen gemessenen Gesamtgeschwindigkeiten und die Beiträge der einzelnen Metaboliten, mit Ausnahme der O-Demethylierung, sehr gut ab. Die berechneten prozentualen Beteiligungen der einzelnen CYPs an der Bildung der einzelnen Metaboliten ist in Abbildung 111 (Seite 204) gezeigt. Die Bildung von **33** in HLM wird bei hohen Substratkonzentrationen vorrangig von CYP1A2, im niedrigen Konzentrationsbereich vorrangig von CYP2C19 katalysiert. Die Weiteroxidation von **33** zu **34** wird im gesamten Konzentrationsbereich vor allem durch CYP1A2 katalysiert, wobei tendenziell CYP2C19 bei geringen Substratkonzentration an Bedeutung zu gewinnen scheint.



**Abbildung 110.** Vergleich der gemessenen (HLM) und der aus kinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen berechneten Bildungsrate (CYP;  $v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)$ ) der Metaboliten von  $\alpha$ -Asaron (**3**) in humanen Lebermikrosomen. Insert oben links: Berechnete prozentuale Beteiligung aller untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von **3** (Beteiligung  $(\text{CYP}_i)_{\text{HLM}}$ ). Die Berechnungen erfolgten nach denen in Kap. 5.4.1.7 aufgeführten Methoden. Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweite bzw. Standardabweichung) entfernt.



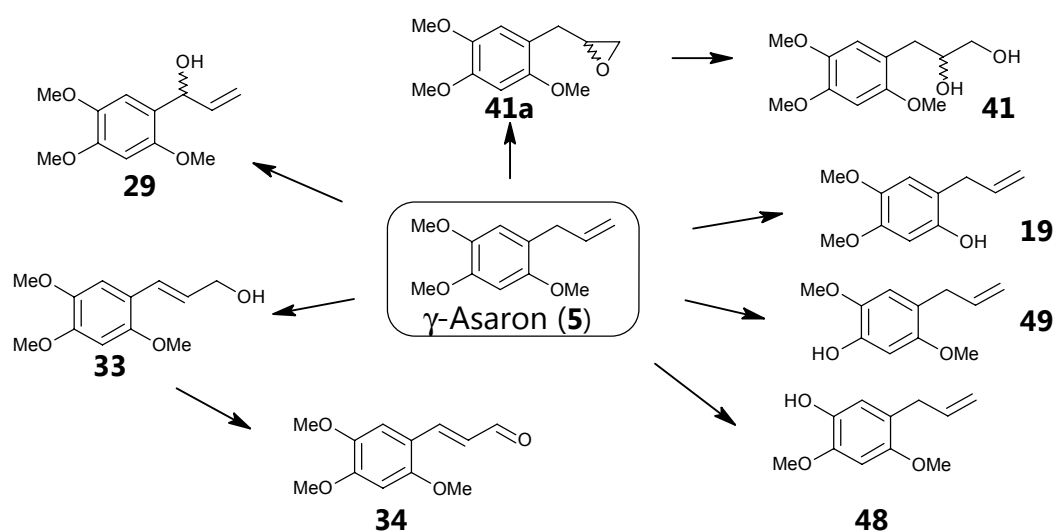
**Abbildung 111.** Berechnete, prozentuale Beteiligung humaner CYPs an der Bildung der Metaboliten von  $\alpha$ -Asaron (**3**) in HLM (berechnet nach Gleichung 9, Kap. 5.4.1.7). Zur besseren Übersicht wurden alle Spannweiten entfernt.

Die Bildung der Epoxide **39a/40a** und Diole **39** und **40** wird, wie die vorangegangenen Experimente schon zeigten, auch in HLM insbesondere im geringen Substratkonzentrationsbereich wahrscheinlich ausschließlich von CYP3A4 katalysiert. Für die O-Demethylierung ist im mittleren Konzentrationsbereich von den untersuchten CYPs hauptsächlich CYP2A6 verantwortlich, wobei, wie oben bereits erwähnt, wahrscheinlich weitere Enzyme zu deren Bildung in HLM beitragen.

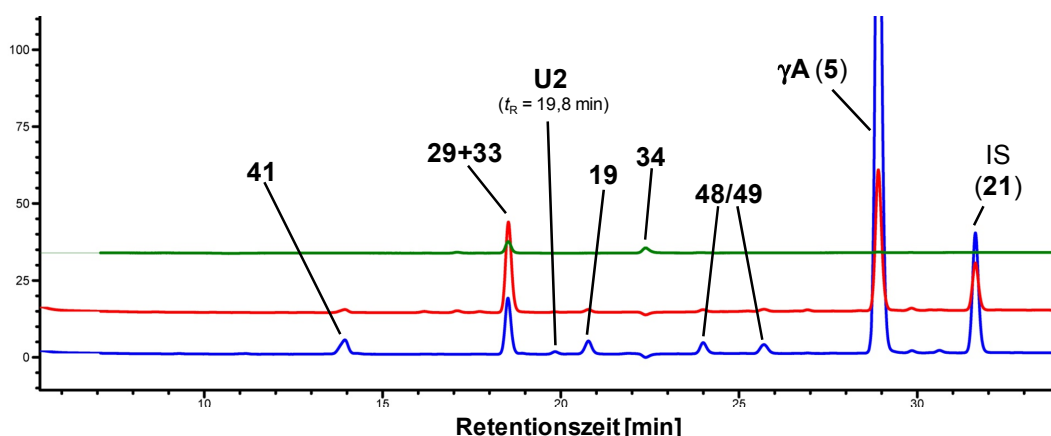
## 5.4.8 Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5)

### 5.4.8.1 Identifizierung der Phase-I-Metaboliten von $\gamma$ -Asaron (5)

Die Identifizierung der Metaboliten von  $\gamma$ -Asaron (5) erfolgte wie bei  $\alpha$ -Asaron (3) durch Analogieschlüsse und durch Vergleich der Retentionszeiten, UV-Spektren und Massensignale (LC-MS/MS), ohne dass gesonderte  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Beweise geführt wurden. Abbildung 112 zeigt eine Übersicht der identifizierten und mutmaßlich in mikrosomalen Inkubationen mit 5 gebildeten Metaboliten. Ein beispielhaftes Chromatogramm der Inkubation von 5 mit ARLM ist in Abbildung 113 dargestellt.



**Abbildung 112.** Identifizierte und mutmaßlich gebildete Metaboliten (48, 49) der Inkubationen von Lebermikrosomen mit  $\gamma$ -Asaron (5).

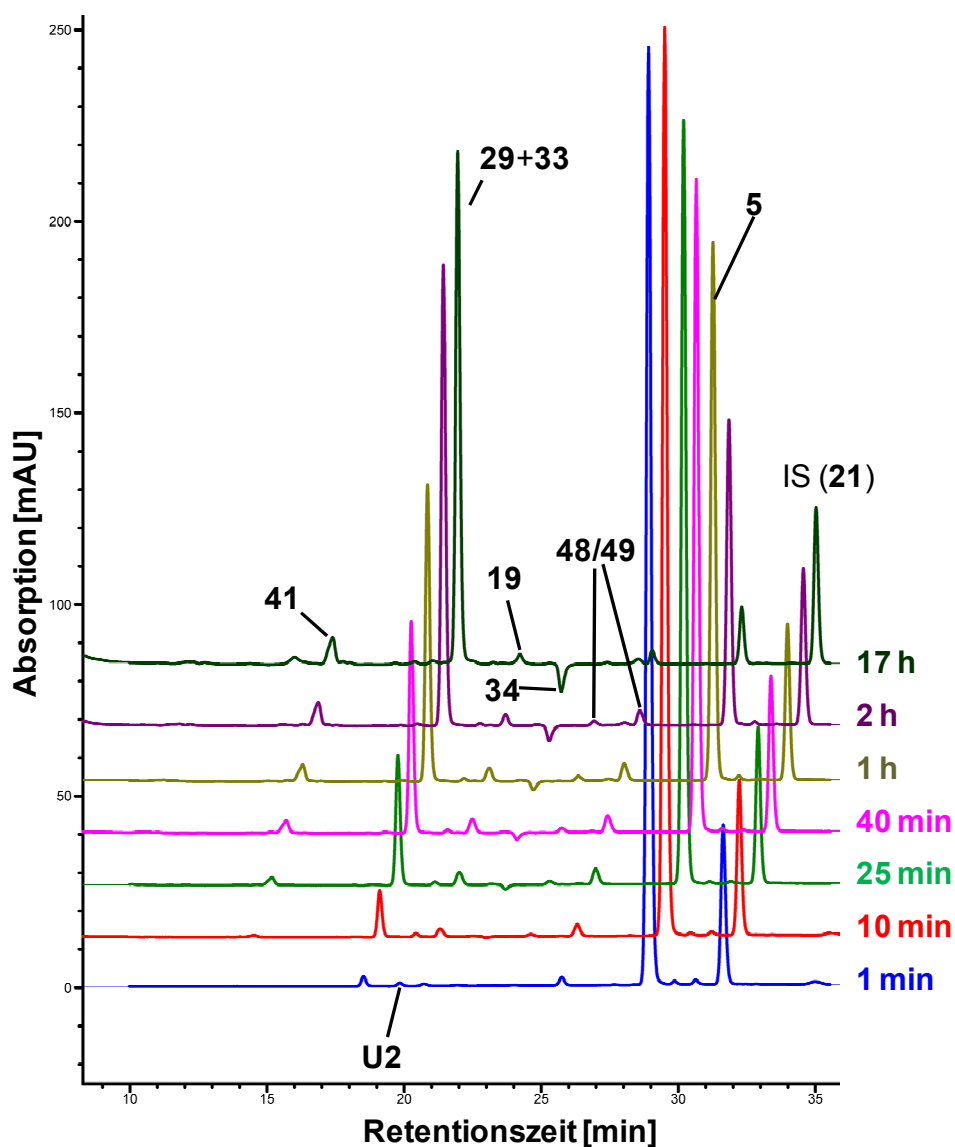


**Abbildung 113.** HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten des Inkubationsüberstandes der Reaktion von SLM mit  $\gamma$ -Asaron (5, Startkonzentration 200  $\mu\text{M}$ ; Inkubationsdauer 20 min) bei verschiedenen Messwellenlängen:  $\lambda = 280$  nm (blau), 261 nm (rot), 340 nm (grün). Referenzwellenlängen:  $\lambda = 360$ , 360 bzw. 450 nm. Konzentration des internen Standards (21) 67  $\mu\text{M}$ . Die Substanznummern sind in Abbildung 112 und in der dieser Arbeit vorangestellten Substanzübersicht erläutert.

Das Metabolitenprofil von  $\gamma$ -Asaron (**5**) ist mit dem von Methyleugenol (**1**) vergleichbar. Hauptmetabolit war in allen Inkubationen 1'-Hydroxyasaron (**29**). In geringeren Konzentrationen wurden das zu **29** isomere (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) und dessen Oxidationsprodukt 3'-Oxoasaron (**34**) detektiert. Die Unterscheidung und somit Quantifizierung der koeluerenden Verbindungen **29** und **33** gelang nach der in Kapitel 5.3.2 erläuterten Methode. Weiterhin wurde das Seitenkettendiol 2',3'-Dihydrodihydroxyasaron (**41**) detektiert. **29** und **41** sind chiral und besitzen in 1'- bzw. 2'-Position ein asymmetrisch substituiertes Kohlenstoffatom. Ob jeweils eines der beiden möglichen Enantiomere vermehrt gebildet wurde, wurde nicht untersucht. Da der Benzenring von **5**, wie im Falle von  $\alpha$ - (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**), mit drei Methoxygruppen in den Positionen 3, 4 und 6 substituiert ist, sind drei einfach *O*-demethylierte Metaboliten zu erwarten. Die Verbindung mit einer Retentionszeit von  $t_R = 20,7$  min wurde wegen der gleichen Retentionszeit und Masse sowie des identischen UV-Spektrums 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) zugeordnet. Ebenfalls ein allylisches UV-Spektrum ( $\lambda_{max} = 230, 290$  nm) besitzen die Verbindungen mit den Retentionszeiten von  $t_R = 24,0$  und  $25,6$  min, welche ein (schwaches) Massesignal von  $m/z = 195,3$  erzeugen. Daher wurden diese beiden Peaks den in Position 3 bzw. 4 demethylierten Verbindungen **48** und **49** zugeordnet. Anhand der analytischen Daten kann eine eindeutige Zuordnung, welche Verbindung welchen Peak verursacht, allerdings nicht getroffen werden. Bei einer Retentionszeit von  $t_R = 19,8$  min eluiert eine Verbindung (**U2**) mit Absorptionsbanden bei  $\lambda_{max} = 228$  und  $286$  nm, was auf eine allylische oder gesättigte Seitenkette hindeutet. Es könnte sich hierbei um  $\gamma$ -Asaronepoxid (**41a**) handeln, jedoch gelang es nicht, diese Hypothese durch massenspektrometrische Hinweise zu belegen.

#### 5.4.8.2 Zeitverlauf des Phase-I-Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (**5**) in Lebermikrosomen

Für die Untersuchung des Zeitverlaufes des Phase-I-Metabolismus von  $\gamma$ -Asaron (**5**) wurden Lebermikrosomen (LM) zusammen mit einem NADPH-generierenden System über 24 h inkubiert (vgl. Kapitel 7.2.2) und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, welche nach entsprechender Aufarbeitung HPLC-chromatographisch analysiert wurden. Abbildung 114 (Seite 207) zeigt beispielhaft die Chromatogramme aus der Inkubation von Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) mit **5**. Negativkontrollen ohne den Zusatz von NADPH sowie Inkubationen mit hitzeinaktivierten Mikrosomen lieferten keine detektierbaren Metaboliten. Die Abbildungen 115 bis 119 illustrieren die dabei erhaltenen Ergebnisse der identifizierten und quantifizierbaren Metaboliten von **5**.



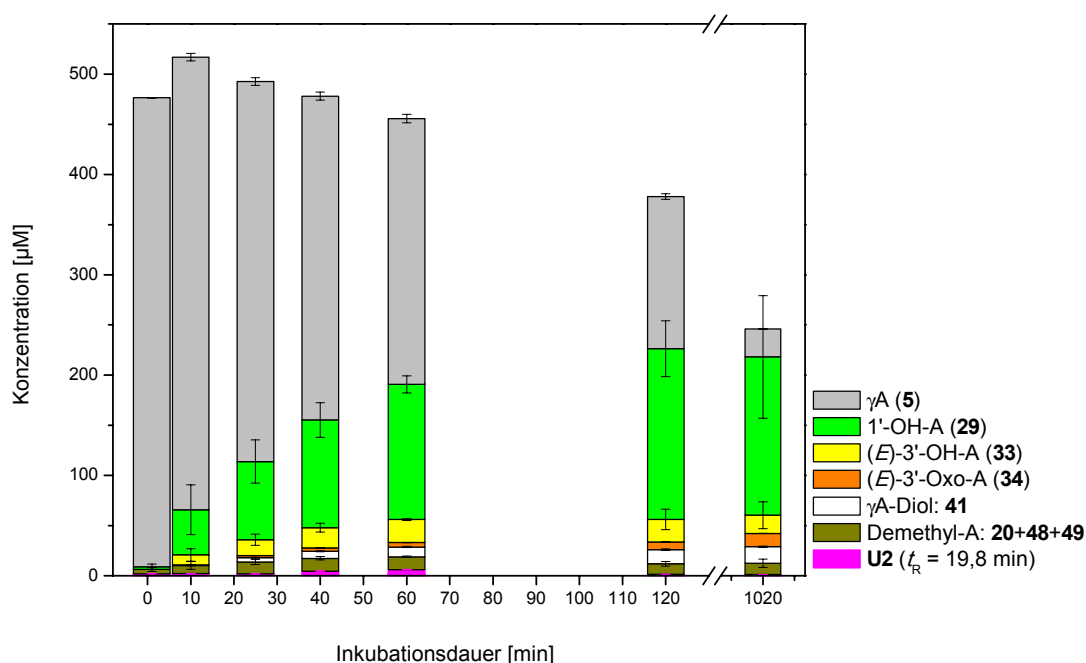
**Abbildung 114.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme und identifizierte Metaboliten zum Zeitverlauf der Inkubation von  $\gamma$ -Asaron (**5**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM). Startkonzentration von **5**: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml; Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h; Messwellenlänge  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{\text{ref}} = 450$  nm).

Aroclor 1254-induzierte Rattenlebermikrosomen (ARLM) hoben sich von allen anderen untersuchten Mikrosomenarten deutlich durch die verstärkte Bildung des Hauptmetaboliten 1'-Hydroxyasaron (**29**) ab. Die maximale Konzentration von **29** wurde nach zwei Stunden mit 34,0 % erreicht. Daneben wurde (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) mit einer maximalen Konzentration von 4,6 % nach einer Stunde detektiert. Dieses wurde effektiv, aber in geringen Konzentrationen zu (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) weiteroxidiert, war bereits ab 10 min nach Inkubationsstart detektierbar und wurde stetig gebildet, so dass nach 17 h eine maximale Konzentration von 2,6 % bestimmt wurde. Ebenfalls in geringen Konzentrationen wurden die *O*-demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** ( $c_{\text{max}} = 2,5$  % nach 40 min), Diol **41** ( $c_{\text{max}} = 3,3$  % nach 17 h) und der nicht identifizierte Metabolit **U2** ( $c_{\text{max}} \approx 0,9$  % nach 1 h) gebildet.

Rinderlebermikrosomen (**BLM**) und humane Lebermikrosomen (**HLM**) wiesen das gleiche Metabolitenspektrum auf, wobei deutlich geringere Konzentrationen von **29** detektiert wurden. **33** und **34** wurden in BLM und HLM in etwa gleichen Konzentrationen detektiert. Im Unterschied zu ARLM waren BLM und HLM aktiver in Hinblick auf die Bildung von Diol **41** und in Inkubationen von HLM mit **5** konnten rund doppelt so hohe Konzentrationen der Phenole **19 + 48/49** detektiert werden, als in ARLM oder BLM. Die geschätzte Konzentration von **U2** erreichte sowohl bei BLM als auch HLM zu keinem Zeitpunkt mehr als 0,5 %.

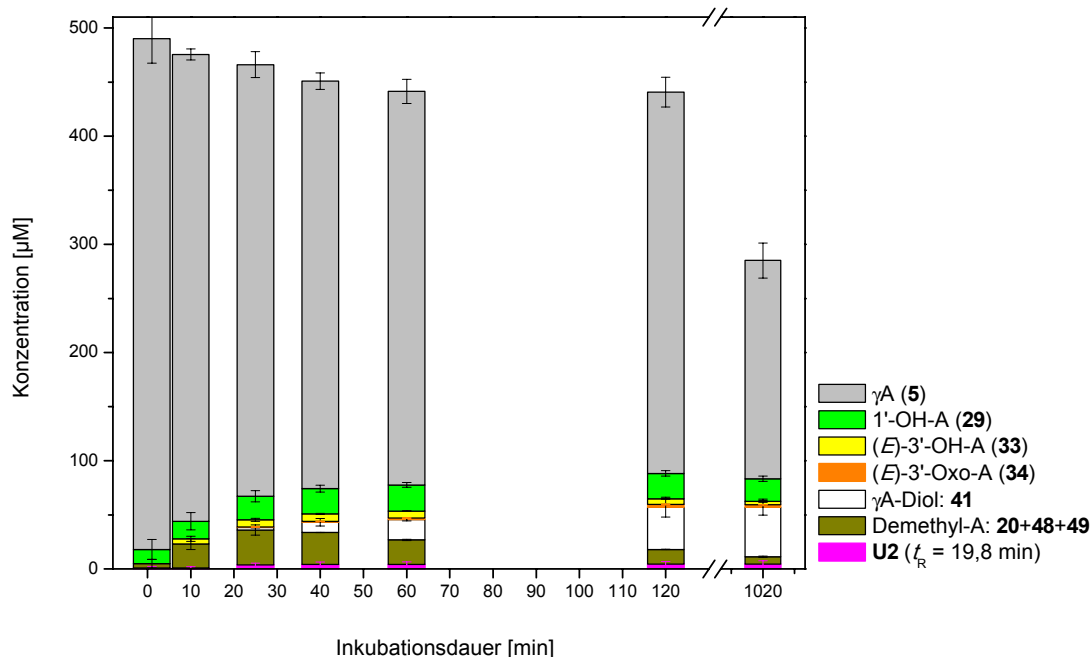
Rattenlebermikrosomen (**RLM**) bildeten mit maximal 4,8 % (nach 1 h) und 1,4 % (nach 40 min) vergleichsweise wenig **29** bzw. **33**. Die Weiteroxidation von **33** zu **34** wurde auch bei RLM beobachtet ( $c_{\max} = 0,5 \%$  nach 2 h). Die Bildung des Diols **41** lag im Bereich der von BLM und HLM, wobei die maximale Konzentration nach 17 h 9,2 % betrug. Interessanterweise wurden in Inkubationen von **5** mit RLM zu Beginn hohe Konzentrationen der *O*-demethylierten Verbindungen **19+48/49** detektiert ( $c_{\max} = 6,5 \%$  nach 25 min), die danach rasch und stetig abnahmen. Nach 17 h waren in der Summe noch 1,3 % dieser Phenole detektiert, wobei **19** ( $t_R = 20,7 \text{ min}$ ) zu allen Inkubationszeitpunkten den Hauptmetaboliten der Phenole bildete.

Hauptmetabolit in Schweinelebermikrosomen (SLM) war im Gegensatz zu den anderen untersuchten LM nicht **29**, sondern Diol **41**, welches zugleich in SLM mit der höchsten Konzentration gebildet wurde. Demgegenüber war in diesen Inkubationen nur sehr wenig **33** und **34** nicht detektiert.

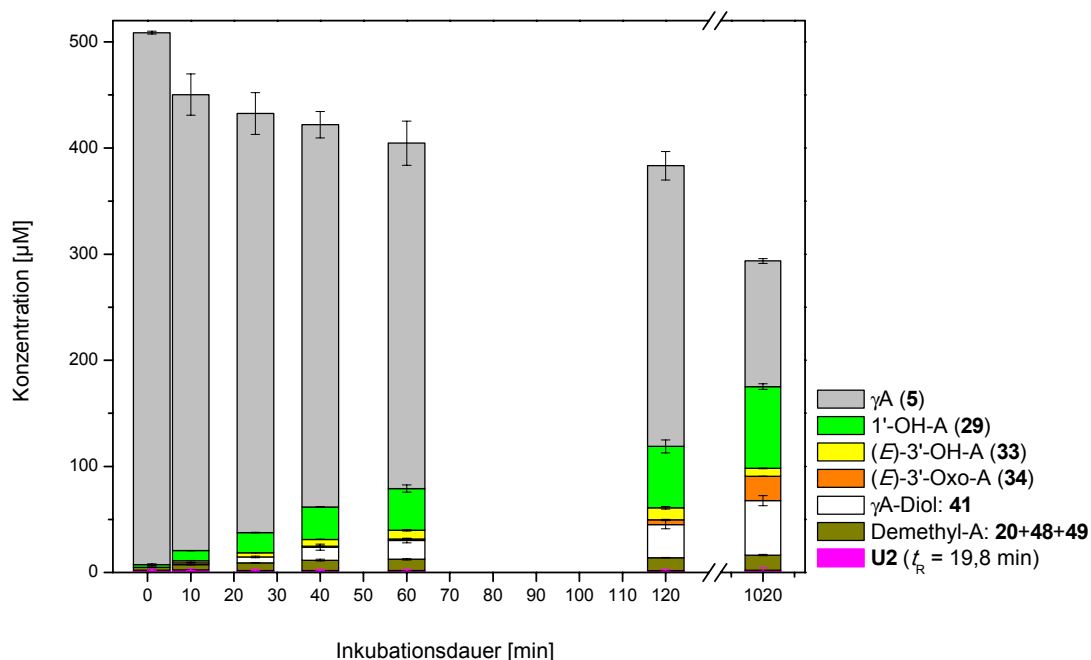


**Abbildung 115.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (**5**) mit Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (**ARLM**). Startkonzentration von **5**: 500  $\mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120 \text{ min}, 17 \text{ h}$ . Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit ARLM verschiedener Tiere.

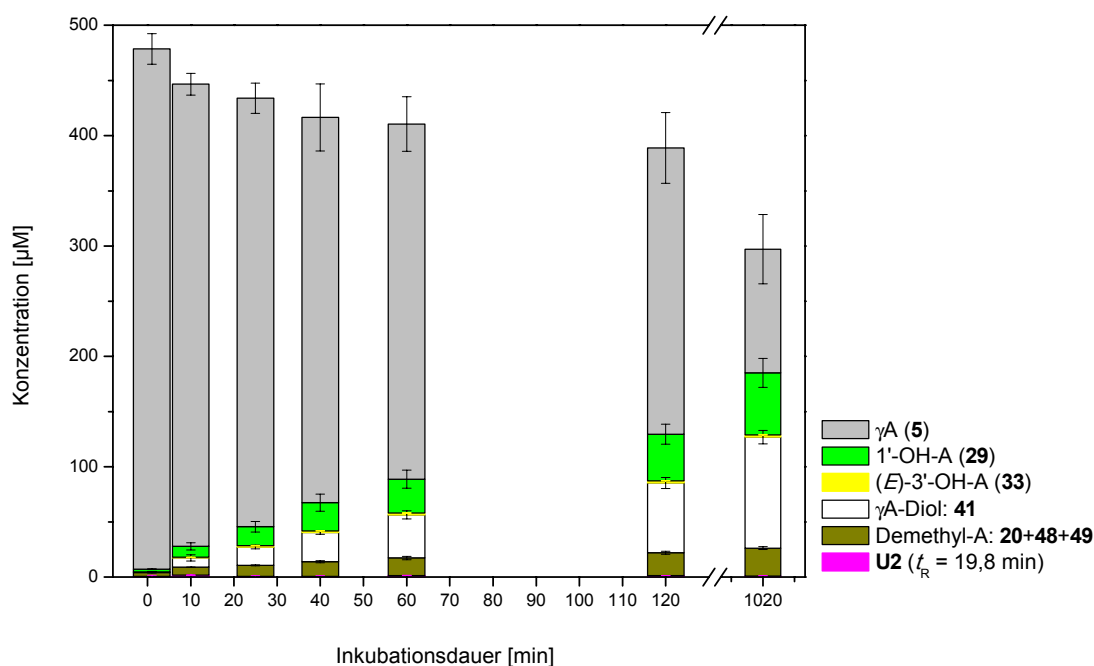




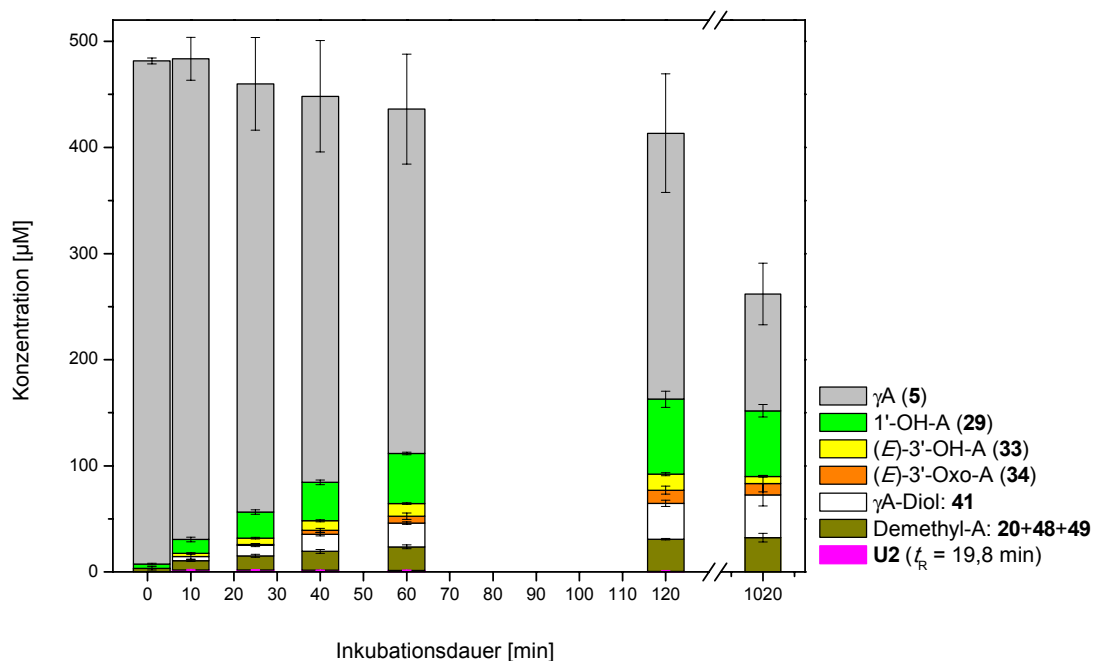
**Abbildung 116.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (5) mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM). Startkonzentration von 5: 500  $\mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit RLM verschiedener Tiere.



**Abbildung 117.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (5) mit Rinderlebermikrosomen (BLM). Startkonzentration von 5: 500  $\mu\text{M}$ , 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen mit BLM des gleichen Tieres.



**Abbildung 118.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (5) mit Schweinelebermikrosomen (SLM). Startkonzentration von 5: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit SLM des gleichen Tieres.

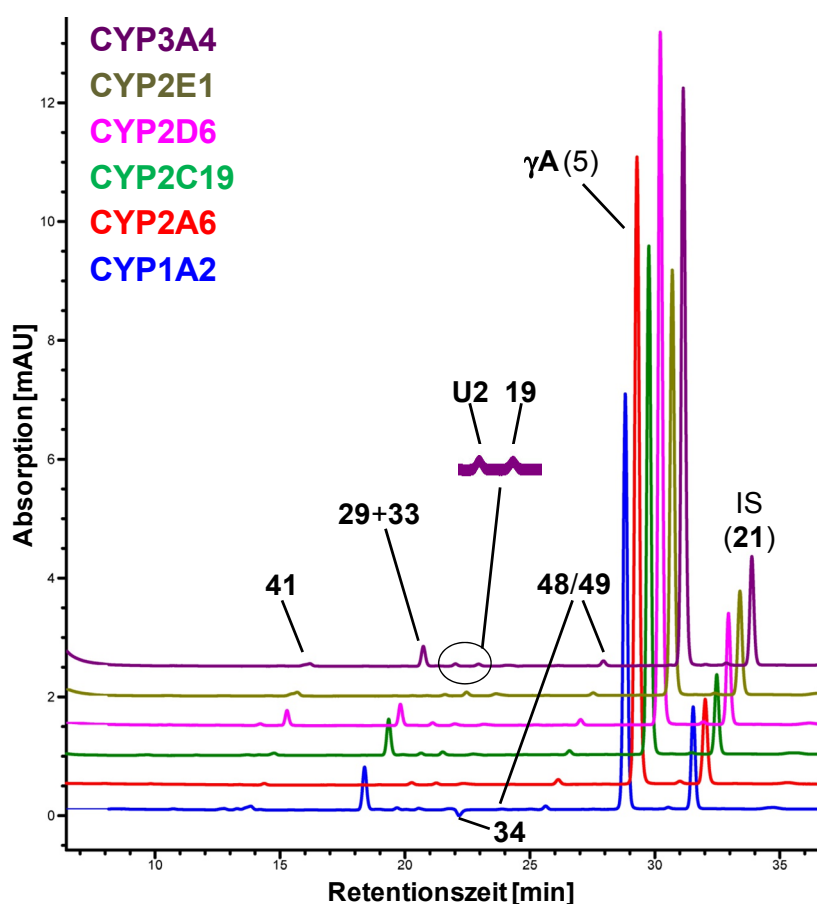


**Abbildung 119.** Zeitverlauf der Metabolitenbildung in Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (5) mit humanen Lebermikrosomen (HLM). Startkonzentration von 5: 500  $\mu$ M, 1 % MeCN; Proteingehalt 1 mg/ml, Zeitpunkte:  $t = 1, 10, 25, 40, 60, 120$  min, 17 h. Die Werte repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Inkubationen mit der gleichen Charge gepoolter HLM von 150 männlichen und weiblichen Spendern.

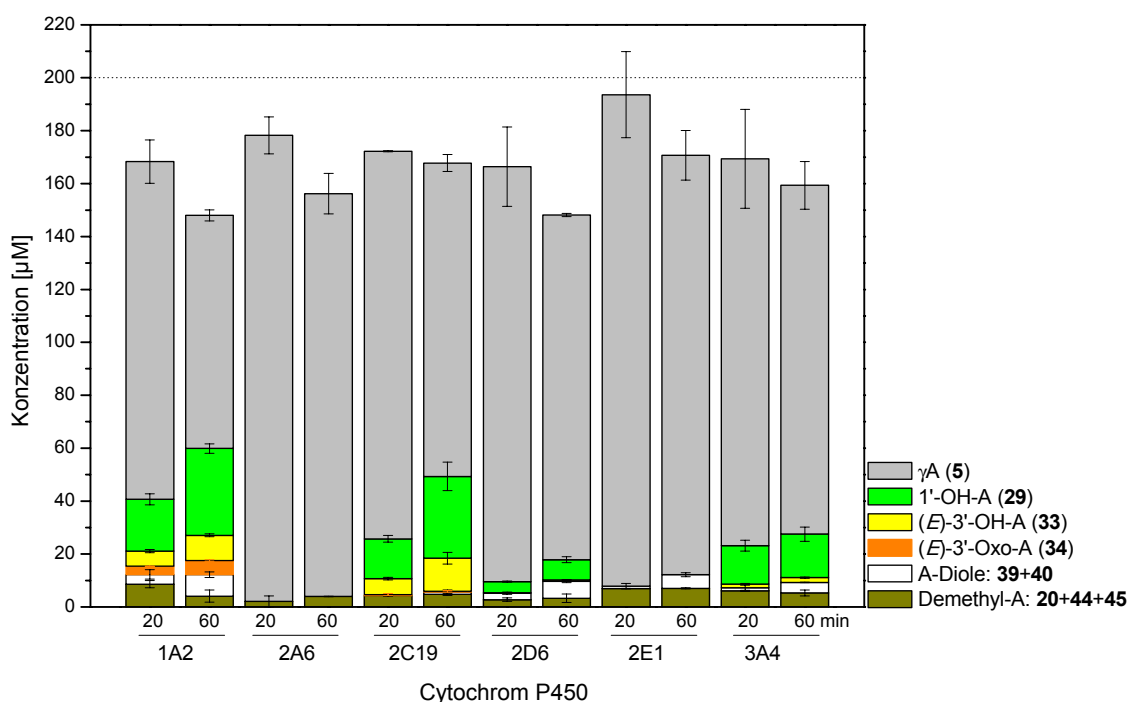
### 5.4.8.3 Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (**5**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

$\gamma$ -Asaron (**5**) war verglichen mit den vier anderen in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropenen das schlechteste Substrat für die sechs untersuchten humanen CYPs. In allen Inkubationen überstieg der Gesamtumsatz der eingesetzten Konzentration von **5** 30 % nicht. Abbildung 120 zeigt ein beispielhaftes Set von Chromatogrammen der Inkubationen der sechs Supersomes<sup>TM</sup> mit **5**. Die aus den Chromatogrammen berechneten Konzentrationen der Metaboliten dieser Umsetzungen sind in den Abbildungen 121 und 122 gezeigt.

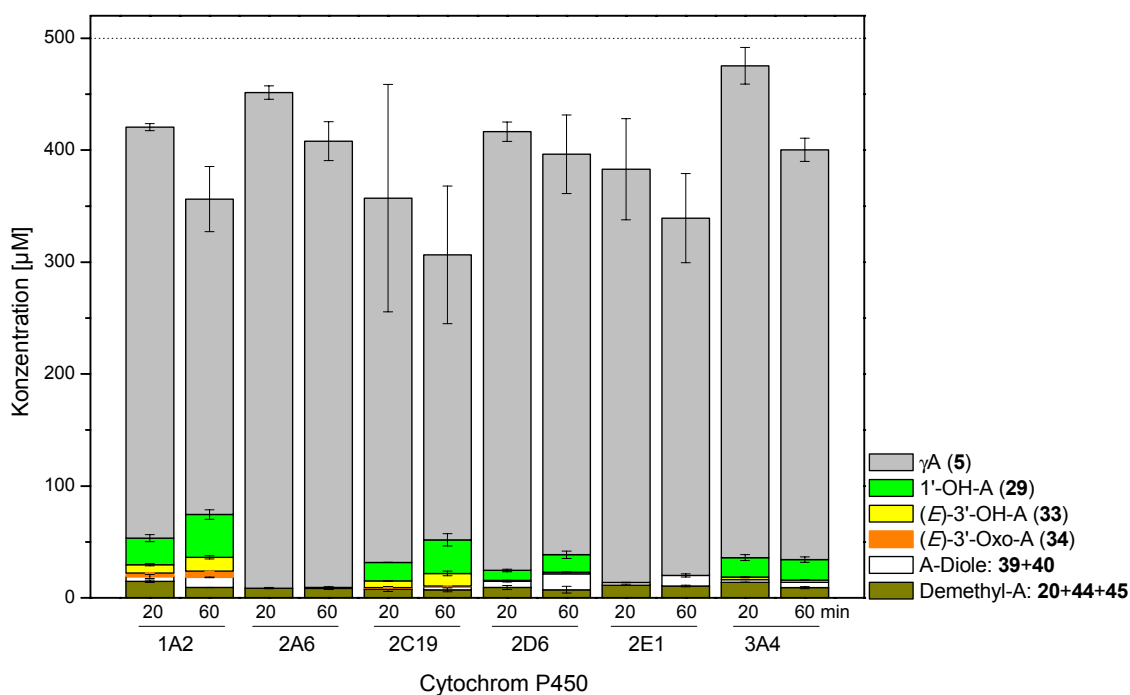
Jedes der sechs untersuchten Enzyme war in der Lage, die O-Demethylierung zu katalysieren. Dabei wurden die beiden Verbindungen **19** ( $t_R = 20,7$  min) und der Metabolit bei  $t_R = 25,6$  min (**48** oder **49**) in jeweils höheren Konzentrationen detektiert, als die ebenfalls als O-demethylierte Verbindung charakterisierte Verbindung bei  $t_R = 24,0$  min (**48** oder **49**), welche lediglich bei CYP1A2 in quantifizierbaren Konzentrationen vorlag. Ansonsten gleicht das qualitative Profil der katalysierten Reaktionen dem von Methyl Eugenol (**1**).



**Abbildung 120.** Gestaffelte HPLC-UV-Chromatogramme der Inkubation verschiedener Supersomes<sup>TM</sup> (120 nM) mit  $\gamma$ -Asaron (**5**, 500  $\mu$ M; 1 % MeCN) nach 60 min bei  $\lambda = 280$  nm ( $\lambda_{ref} = 360$  nm). Konzentration des internen Standard (**21**): 67  $\mu$ M.



**Abbildung 121.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\gamma$ -Asaron (**5**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **200  $\mu$ M 5** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.



**Abbildung 122.** Konzentrationen der Metaboliten in Inkubationen verschiedener Supersomes™ (jeweils 120 nM) mit  $\gamma$ -Asaron (**5**) nach 20 und 60 min bei einer Startkonzentration von **500  $\mu$ M 5** (1 % MeCN). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Inkubationen der gleichen Supersomes™-Charge.

CYP1A2 katalysierte die Reaktionen zu 1'-Hydroxyasaron (**29**; 16,4 %), (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**; 4,8 %), dessen Oxidation zu (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**; 2,7 %), die Bildung des Seitenketten-diols **41** (4,1 %) und schließlich die Bildung der *O*-demethylierten Metaboliten (**19** + **48/49**) zu insgesamt 2,0 %, wobei der Metabolit mit einer Retentionszeit von  $t_R = 25,6$  min den Hauptanteil der phenolischen Substanzen darstellte. CYP2A6 bildete, wie bei den Inkubationen mit anderen Substanzen, auch bei Inkubation mit **5**, die wenigsten detektierbaren Metaboliten in Hinblick auf das Metabolitenspektrum und die -konzentrationen. Lediglich die *O*-demethylierten Metaboliten konnten mit 2,0 % nach einer Stunde nachgewiesen werden. CYP2C19 bildete **29**, **33** und die demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** in vergleichbarem Umfang wie 1A2 zusammen mit einer geringen Menge Diol **41**. Eine Weiteroxidation von **33** zu **34** wurde nicht beobachtet. CYP2D6 und 3A4 zeigten ein vergleichbares Metabolitenspektrum und bildeten **29** (3,8 % und 8,2 %), Diol **41** (3,2 % und 2,0 %) sowie sehr wenig **33** (0,3 % und 0,9 %). Die Anteile der Summe der *O*-demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** betrug 1,7 % und 2,7 % für CYP2D6 bzw. CYP3A4. Die Weiteroxidation von **33** zu **34** wurde bei beiden Enzymen nicht beobachtet. Bei der Inkubation von CYP2E1 mit 200  $\mu$ M **5** konnten lediglich die demethylierten Verbindungen (3,5 %) und Diol **41** (2,6 %) nach einer Stunde Inkubationszeit detektiert werden.

#### 5.4.8.4 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (**5**) in Lebermikrosomen

Die kinetischen Daten zum Metabolismus in Lebermikrosomen (LM) mit  $\gamma$ -Asaron (**5**) sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Aus den lebermikrosomalen Inkubationen mit **5** wurden, mit Ausnahme für die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **19**, **48/49**, sehr geringe  $K_M$ -Werte bestimmt. In allen LM wurde 1'-Hydroxyasaron (**29**) mit der höchsten katalytischen Effizienz gebildet, was zeigt, dass die Bildung von **29** in allen untersuchten LM im geringen Substratkonzentrationsbereich die dominierende Reaktion darstellt. Wie auch bei der Reaktion mit Methyleugenol (**1**) wurde ein katalytischer *shift* zwischen 1'-Alkohol (**29**) und 3'-Alkohol (**33**) durch die Inkubation mit Aroclor 1254 beobachtet. In RLM wurden beide Metaboliten mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen gebildet, während in ARLM  $E_{cat}$  für die Bildung von **29** fast doppelt so groß ist und  $E_{cat}$  für die Bildung von **33** rund fünfmal geringer ist als in RLM. Die größte Reaktionsgeschwindigkeit wurde für die *O*-Demethylierung bestimmt, wobei die  $K_M$ -Werte vergleichsweise groß sind und die katalytische Effizienz dadurch gering.

**Tabelle 37.** Bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\gamma$ -Asaron (**5**) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	1'-OH-A ( <b>29</b> )	E 3'-OH-A ( <b>33</b> )	E-3'-Oxo-A ( <b>34</b> )	$\gamma$ A-Diol ( <b>41</b> )	Demethyl ( <b>19, 48, 49</b> )	Summe Metaboliten
ARLM	$v_{\max}$ (app)	2,94	0,11	0,11	0,45	3,26	6,30
	$K_M$ (app)	65,4	37,7	33,5	74,1	632	107
	$E_{\text{cat}}$ (app)	45,0	2,84	3,42	6,11	5,16	58,6
RLM	$v_{\max}$ (app)	1,17	0,35	nd	1E+04	5,58	6,55
	$K_M$ (app)	47,6	23,4		7E+05	314	148
	$E_{\text{cat}}$ (app)	24,5	15,1		18,9	17,7	44,4
BLM	$v_{\max}$ (app)	1,24	0,27	nd	0,94	3,60	4,86
	$K_M$ (app)	34,9	29,8		186	1118	211
	$E_{\text{cat}}$ (app)	35,4	9,09		5,03	3,22	23,0
SLM	$v_{\max}$ (app)	1,53	0,13	nd	1,17	1,83	3,24
	$K_M$ (app)	33,5	67,6		227	477	193
	$E_{\text{cat}}$ (app)	45,8	1,89		5,17	3,83	16,8
HLM	$v_{\max}$ (app)	1,27	0,30	nd	0,56	1,72	3,59
	$K_M$ (app)	42,3	27,3		104	277	192
	$E_{\text{cat}}$ (app)	30,1	11,1		5,35	6,22	18,7

Inkubationsbedingungen: Proteinkonzentration jeweils 1 mg/ml; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen **5**: 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{M}$  in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$  (app): (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

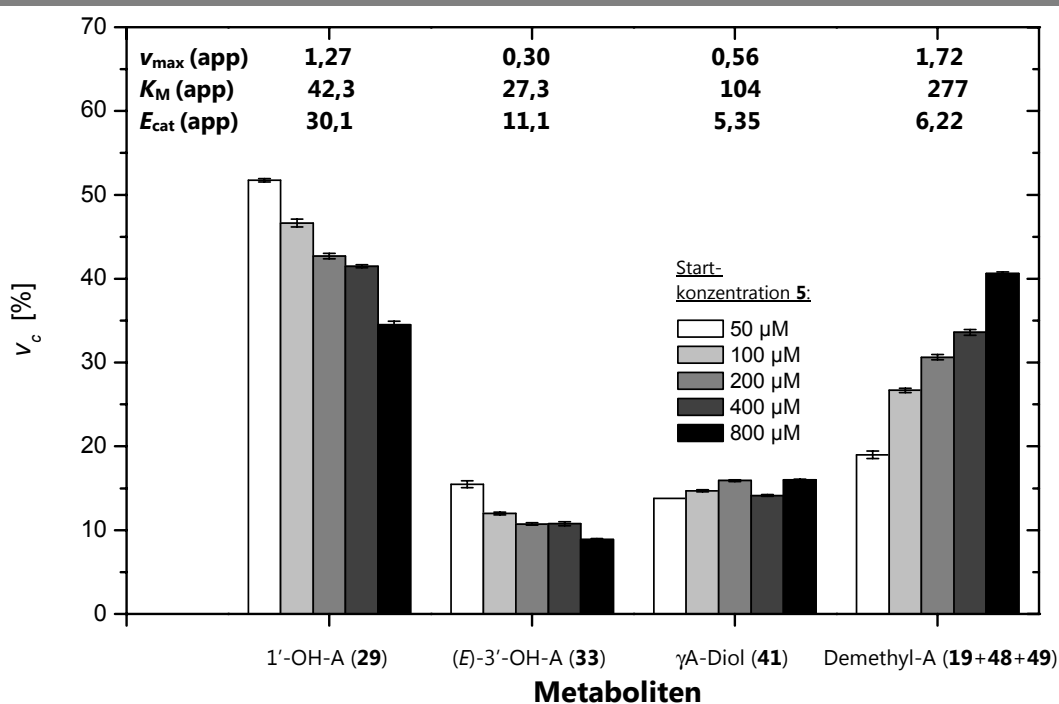
$v_{\max}$  (app): maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}$  (app): „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

nd: nicht detektierbar

Anhand der prozentualen Anteile der Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit der Substratstartkonzentration von **5** in HLM (Abbildung 123, Seite 215) erkennt man, dass die Bildung beider Seitenkettenalkohole **29** und **33** mit abnehmender Substratkonzentration zunahm. Die Bildung der O-demethylierten Verbindungen **19, 48/49** war im mittleren und hohen Substratkonzentrationsbereich sehr schnell, nahm aber mit sinkenden Substratkonzentrationen stark ab und trägt bei sehr geringen Konzentrationen mit unter 12 % nur noch wenig zum Gesamtumsatz von **5** bei. Der Anteil an der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit von Diol **41** war über den betrachteten Konzentrationsbereich mit rund 15 % konstant, wobei im Falle kleiner Substratkonzentrationen eine etwas geringere Beteiligung dieser Reaktion zu erwarten ist.

Diese Trends werden durch die berechneten prozentualen  $v_{\max}$  und  $E_{\text{cat}}$ -Werte in Tabelle 38 (Seite 215) bestätigt. In allen untersuchten LM werden **29** und die O-Demethylierten Verbindungen **19, 48/49** die Hauptmetaboliten bei kleinen Substratkonzentrationen darstellen. Mit sinkender Substratkonzentration verliert die Bildung von **19, 48/49** an Bedeutung und die Bildung von **29** überwiegt. Gleichzeitig nimmt der Beitrag der Bildung von **33** und Diol **41** zu.



**Abbildung 123.** Abhängigkeit der Metabolitenbildungsgeschwindigkeiten von der Substratkonzentration: Prozentualer Beitrag der gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten bei gegebener Substratstartkonzentration  $v(c)$  der einzelnen Metaboliten an der Gesamtumsatzgeschwindigkeit ( $\Sigma v(\text{alle identifizierten Metaboliten})/v(\text{Metabolit } i)$ ) der Reaktionen von HLM mit  $\gamma$ -Asaron (5). Oben: kinetische Parameter  $v_{\max}$ ,  $K_M$  und  $E_{\text{cat}}$ . Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten.

$K_M(\text{app})$ : (apparente) Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ]

$v_{\max}(\text{app})$ : max. apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

$E_{\text{cat}}(\text{app})$ : „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}(\text{app})/K_M(\text{app})$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

**Tabelle 38.** Prozentuale bildungskinetische Parameter für die detektierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\gamma$ -Asaron (5) mit verschiedenen Lebermikrosomen.

LM	Parameter	1'-OH-A (29)	E 3'-OH-A (33)	E-3'-Oxo-A (34)	$\gamma$ A-Diol (41)	Demethyl (19, 48, 49)
ARLM	$v_{\max}(\text{app})$	43	2	2	7	47
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	72	5	5	10	8
RLM	$v_{\max}(\text{app})$	16	5	nd	nb	79
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	32	20		25	23
BLM	$v_{\max}(\text{app})$	20	4	nd	16	60
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	67	17		10	6
SLM	$v_{\max}(\text{app})$	33	3	nd	25	39
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	81	3		9	7
HLM	$v_{\max}(\text{app})$	33	8	nd	14	45
	$E_{\text{cat}}(\text{app})$	57	21		10	12

$v_{\max}(\text{app})$ : prozentuale maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit

$E_{\text{cat}}(\text{app})$ : prozentuale „apparente katalytische Effizienz“

nd: nicht detektierbar

nb: Wert wurde bei der Berechnung (wegen nicht-realer Enzymsättigung) nicht berücksichtigt

Summen  $\neq$  100 % sind rundungsbedingt.

### 5.4.8.5 Kinetik des Phase-I-Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (5) in Cytochrom P450-Enzymen und deren Beteiligung in HLM

Auch in den Inkubationen verschiedener Supersomes<sup>TM</sup> mit  $\gamma$ -Asaron (5) war CYP1A2 das Enzym mit dem breitesten Metabolitenspektrum und der größten katalytischen Effizienz. In Tabelle 39 sind die erhaltenen (absoluten) Parameter für die verschiedenen Reaktionen von 5 mit Supersomes<sup>TM</sup> dargestellt. Die Bildung von 29 wurde unter den gegebenen Bedingungen am effizientesten von CYP3A4 katalysiert, während CYP1A2 die Bildung von 33 zwar mit höherem  $K_M$ -Wert, dafür aber sehr schnell und folglich mit höherer Effizienz als CYP3A4 katalysierte. Kinetische Parameter für die Oxidation von 33 zu 34 konnten nur für CYP1A2 abgeleitet werden. Dort wurde die Oxidation mit sehr hoher Affinität und hoher Effizienz katalysiert. Die Bildung von Diol 41 wurde am effizientesten von CYP3A4 und am schnellsten von CYP2D6 katalysiert.

**Tabelle 39.** Bildungskinetische Parameter für die quantifizierbaren Metaboliten aus der Umsetzung von  $\gamma$ -Asaron (5) mit verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup>.

CYP	Parameter	1'-OH-A (29)	E 3'-OH-A (33)	E-3'-Oxo-A (34)	$\gamma$ A-Diol (41)	Demethyl (19, 48, 49)	Summe Metaboliten
CYP1A2	$k_{cat}$	9,61	5,34	1,15	1,65	1E+14	38,3
	$K_M$	111	155	6,97	110	6E+15	297
	$E_{cat}$	86,6	34,5	165	15,0	17,6	129
CYP2A6	$k_{cat}$	nd	nd	nd	nd	79,2	nd
	$K_M$					9142	
	$E_{cat}$					8,7	
CYP2C19	$k_{cat}$	5,72	4,04	nd	wd	2E+05	16,6
	$K_M$	117	280			2E+06	224
	$E_{cat}$	48,8	14,4			105,4	74,1
CYP2D6	$k_{cat}$	5,61	8E+03	nd	21,9	4E+15	9E+15
	$K_M$	463	7E+05		2390	3E+17	4E+17
	$E_{cat}$	12,1	11,1		9,16	13,8	24,5
CYP2E1	$k_{cat}$	nd	nd	nd	0,51	7,51	3,30
	$K_M$				125	818	194
	$E_{cat}$				4,05	9,2	17,0
CYP3A4	$k_{cat}$	6,21	0,91	wd	1,28	43,3	19,4
	$K_M$	41,9	56,8		35,2	3209	183
	$E_{cat}$	148	16,0		36,3	13,5	106

Inkubationsbedingungen: CYP-Konzentration jeweils 120 nM; Inkubationsdauer 20 min bei 37 °C; Konzentrationen 5: 50, 100, 200, 500, 800  $\mu$ M in 1 % MeCN. Die jeweiligen Fits sind im Anhang abgebildet.

$K_M$ : Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu$ M]

$k_{cat}$ : Wechselzahl; [nmol Produkt  $\text{min}^{-1}$  (nmol Cytochrom P450) $^{-1}$ ] bzw. [ $\text{min}^{-1}$ ]

$E_{cat}$ : „katalytische Effizienz“ =  $k_{cat}/K_M$ ; [ $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ];

nd: Metabolit nicht detektierbar

wd: zu wenige Datenpunkte (Metabolit wurde nicht über den gesamten beobachteten Konzentrationsbereich gebildet)

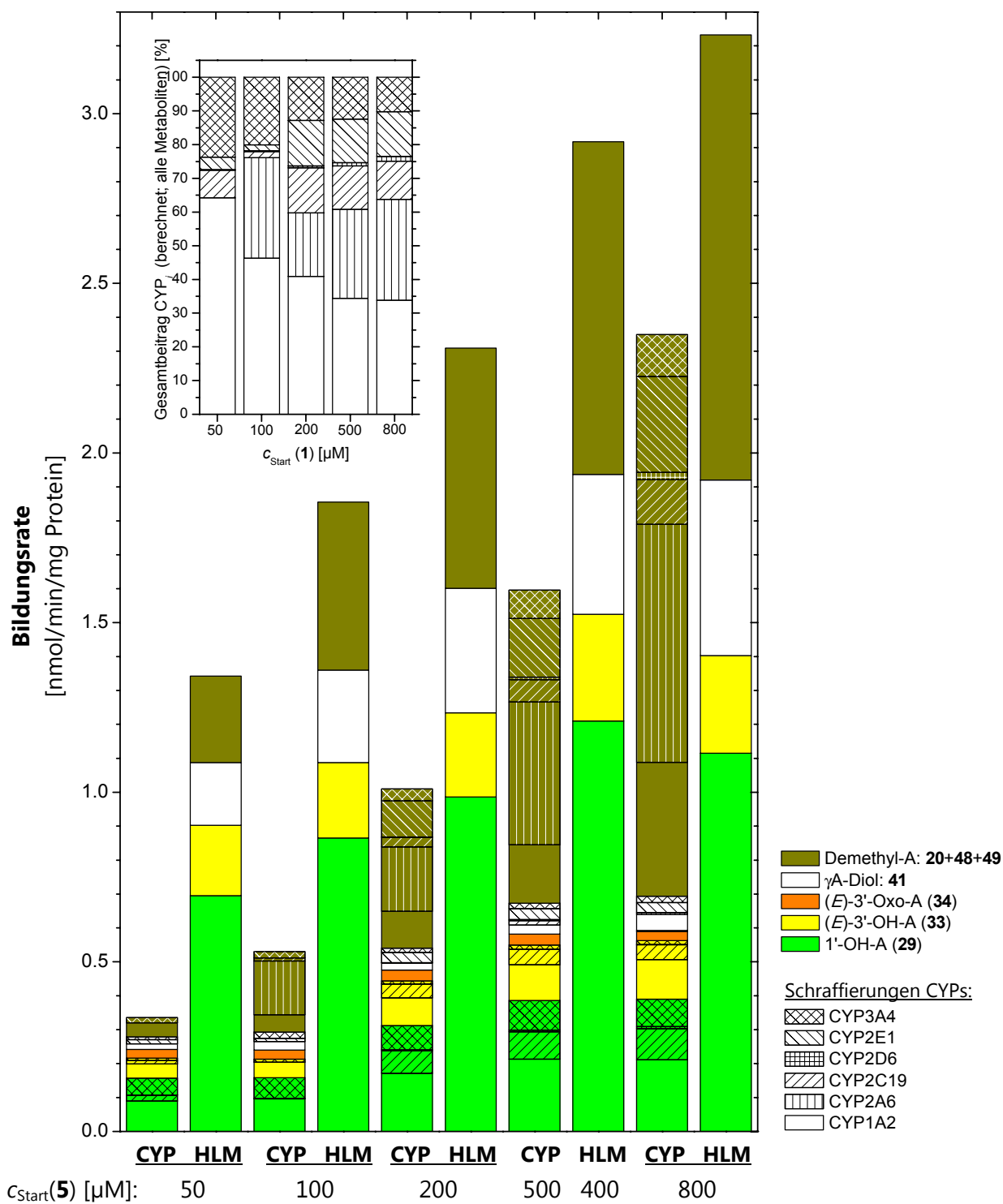


---

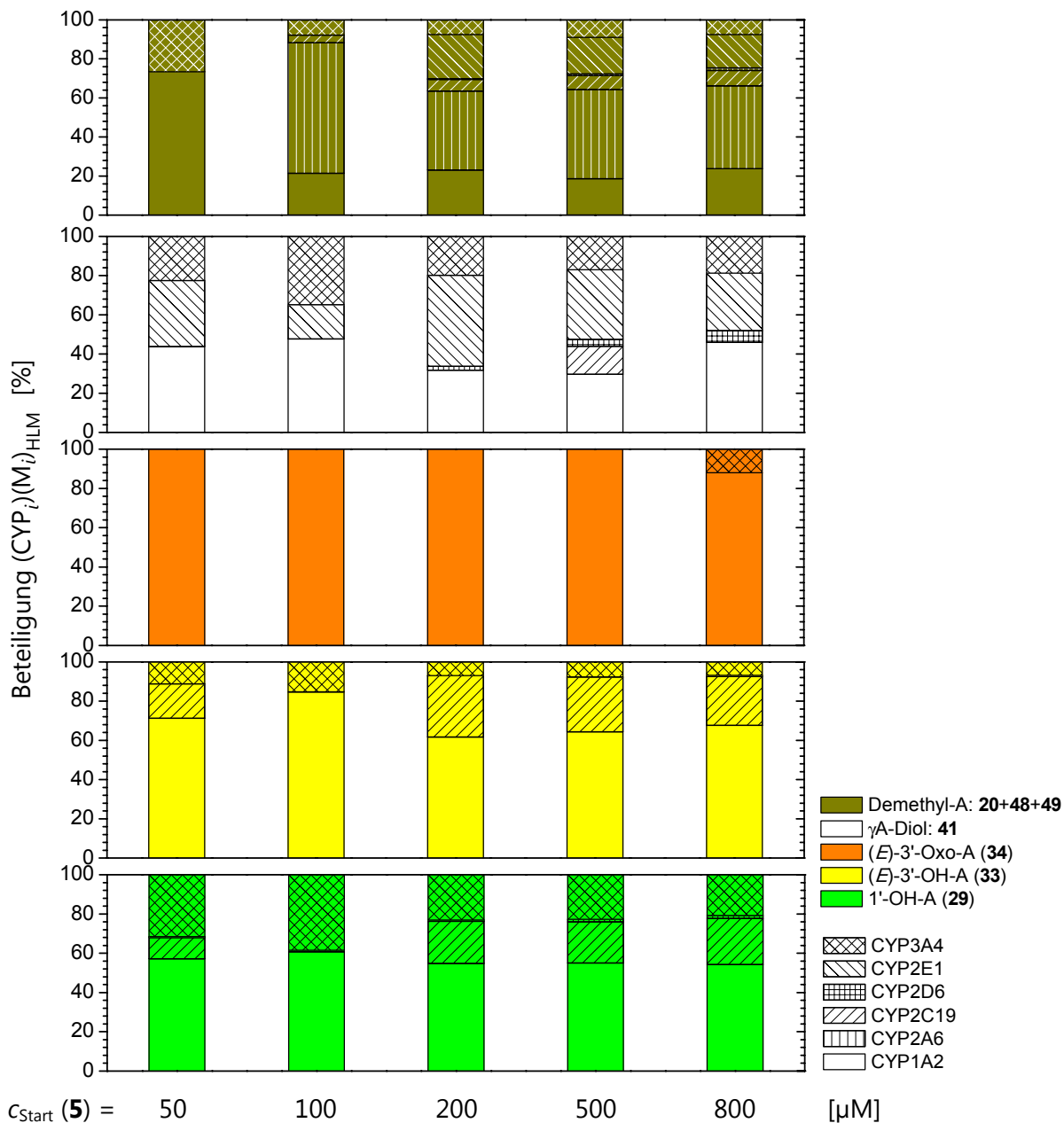
Die Bildung der O-demethylierten Verbindungen **19 + 48/49** erfolgte in allen untersuchten Supersomes<sup>TM</sup> zwar schnell, aber mit niedriger Affinität.

Der Vergleich zwischen den in HLM gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten der Bildung der einzelnen Metaboliten bei verschiedenen Substratkonzentrationen von **5** mit den aus Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten sowie die Gesamtbeteiligung der einzelnen CYPs am Gesamtumsatz von **5** sind in Abbildung 124 wiedergegeben. Insgesamt sind die berechneten Werte deutlich unterprädiktiv, was hauptsächlich in einer zu geringen Vorhersage der Bildung von Alkohol **29** und Diol **41** begründet ist. Die Bildungsgeschwindigkeiten der Verbindungen **19 + 48/49** und von **33** wurden hingegen gut vorhergesagt. In Supersomes<sup>TM</sup>, nicht jedoch in HLM wurde die Bildung von **34** beobachtet, dessen berechnete Aktivität in HLM gering war. Die Daten lassen darauf schließen, dass zur Bildung von **29** und **41** in HLM noch andere als die untersuchten CYPs beitragen. Das Insert in Abbildung 124 zeigt, dass die Beteiligung von CYP1A2 und CYP3A4 mit sinkender Konzentration von **5** steigt. Im höheren Substratkonzentrationsbereich gewinnen dafür CYP2A6, CYP2C19 und CYP2E1 an Bedeutung.

Die relative Beteiligung der verschiedenen CYPs an der Bildung der einzelnen Metaboliten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ist in Abbildung 125 (Seite 219) gezeigt. Dabei sind keine klaren Konzentrationsabhängigkeiten erkennbar. Die Bildung von **29** und **33** wird in HLM wahrscheinlich vorrangig von CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 katalysiert. Die Oxidation von **33** zu **34** kann fast ausschließlich CYP1A2 zugeschrieben werden und an der Bildung von Diol **41** sind zu etwa gleichen Teilen CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 beteiligt. An der O-demethylierung in HLM sind wahrscheinlich alle untersuchten CYPs, mit Ausnahme von CYP2D6 beteiligt, wobei CYP2A6 den Hauptbeitrag leistet.



**Abbildung 124.** Vergleich der gemessenen (HLM) und der aus kinetischen Daten der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen berechneten Bildungsrate (CYP;  $v_{\text{HLM, berechnet}}(\text{CYP}_i)(M_i)$ ) der Metaboliten von  $\gamma$ -Asaron (5) in humanen Lebermikrosomen. Insert oben links: Berechnete prozentuale Beteiligung aller untersuchten CYPs am Gesamtmetabolismus von 5 (Beteiligung (CYP)<sub>HLM</sub>). Die Berechnungen erfolgten nach denen in Kap. 5.4.1.7 aufgeführten Methoden. Zur besseren Übersicht wurden alle Fehlermarkierungen (Spannweite bzw. Standardabweichung) entfernt.



**Abbildung 125.** Berechnete, prozentuale Beteiligung humaner CYPs an der Bildung der Metaboliten von  $\gamma$ -Asaron (5) in HLM (berechnet nach Gleichung 9, Kap. 5.4.1.7). Zur besseren Übersicht wurden alle Spannweiten entfernt.



---

# 6

## Zusammenfassung und Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchten Phenylpropene (PP) Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**),  $\alpha$ -Asaron (**3**),  $\beta$ -Asaron (**4**) und  $\gamma$ -Asaron (**5**) kommen natürlich als Bestandteil diverser Kräuter, Tees und Gewürze, aber auch in Obst und Gemüse vor und sind somit Bestandteil der menschlichen Ernährung. Obgleich der direkte Einsatz von **1** und **4** als Duftstoff für Kosmetika oder als Aromastoff in Lebensmitteln in vielen Ländern verboten ist, unterliegen die natürlichen Gehalte dieser Stoffe in Pflanzen, pflanzlichen Extrakten und pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln (PFS) zumeist keiner Regulierung. Somit können im Einzelfall beträchtliche Mengen dieser Stoffe aufgenommen werden.

Methyleugenol (**1**) verursachte hepatozelluläre Adenome und Karzinome an weiblichen und männlichen Mäusen und Ratten, sowohl nach oraler, als auch intraperitonealer Gabe (Miller *et al.*, 1983; NTP, 2000). Die propenylischen PP  $\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) verursachten nach intraperitonealer Gabe hepatozelluläre Adenome und Karzinome im Tierversuch mit männlichen Mäusen. Die Vorbehandlung der Tiere mit Pentachlorphenol, einem potenten Inhibitor fremdstoffmetabolisierender Sulfotransferasen, hatte keinen Einfluss auf die Inzidenzen der Lebertumoren (Wiseman *et al.*, 1987). Nach peroraler Gabe von europäischem Kalmusöl (EOC) mit dem Trinkwasser (0,1–2,0 %) an weibliche und männliche Ratten wurden ebenfalls hepatozelluläre Adenome und Karzinome beobachtet. Die Gabe von indischem Kalmusöl (JOC) oder **4** (0,005–0,5 % im Trinkwasser) resultierte in vielfältigen Veränderungen an Leber, Niere und des Herzens sowie der Bildung von Leiomyosarkomen des Darms von männlichen und weiblichen Ratten (Taylor *et al.*, 1967; Taylor 1981). Studien zum Wirkmechanismus oder

zum Metabolismus von **3** oder **4** lagen bislang nicht vor. Die Kanzerogenität von **2** und **5** wurde bislang nicht untersucht. Während für **1** ein zu Safrol und Estragol analoger Mechanismus der Aktivierung über Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) und Sulfotransferasen (SULT) postuliert wurde, scheint die Aktivierung von **3** und **4** über einen alternativen Mechanismus zu verlaufen.

Es galt somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragen zu untersuchen: Welche hepatischen Metaboliten werden von den Substanzen **1–5** gebildet und welche davon stellen potentiell reaktive Metaboliten dar? Über welche molekularen Mechanismen werden die kanzerogenen Verbindungen **1, 3** und **4** aktiviert und welche Konsequenzen hat die im Tierversuch beobachtete Kanzerogenität von **1, 3** und **4** für den Menschen, d. h. können die identifizierten oder möglichen Aktivierungsreaktionen auch bei für den Menschen ernährungsrelevanten Konzentrationen stattfinden?

Um diese Fragen zu beantworten wurden die fünf Substanzen jeweils mit verschiedenen tierischen und humanen Lebermikrosomen inkubiert und die dabei gebildeten Metaboliten mit Hilfe chromatographischer, massenspektrometrischer und spektroskopischer Verfahren (HPLC-UV/Vis-DAD, LC-MS/MS, NMR) charakterisiert. Die identifizierten Metaboliten wurden synthetisiert um sie als Referenzsubstanzen für die Quantifizierung, zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus und für weitergehende Untersuchungen z. B. zu deren Genotoxizität und Mutagenität einzusetzen. Die Beteiligung verschiedener humaner Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) an der Metabolitenbildung wurde in Inkubationen der fünf Substanzen mit Supersomes<sup>TM</sup> untersucht. Darüberhinaus wurden apparente enzymkinetische Parameter der Metabolitenbildung in Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup> bestimmt. Durch die Kenntnis dieser Daten wird eine Extrapolation der Metabolitenbildung hin zu kleinen (und großen) Substratkonzentrationen ermöglicht. Durch Anwendung des RAF-Konzepts konnte die quantitative Beteiligung der untersuchten CYPs in humanen Lebermikrosomen (HLM) berechnet werden. Im Falle von Methyleugenol (**1**) wurde zusätzlich der Phase-II-Metabolismus in Aroclor 1254-vorbehandelten primären Rattenhepatozyten untersucht, wobei ein anderes Metabolitenspektrum, als in lebermikrosomalen Inkubationen detektiert wurde. Schließlich wurde die Bildung von DNA-Addukten nach Inkubation von **1, 2** und deren Metaboliten mit primären Rattenhepatozyten untersucht.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst, diskutiert und, wenn möglich, mit Literaturdaten verglichen.

---

## 6.1 Methyleugenol (1) und (E)-Methylisoeugenol (2)

### 6.1.1 Metabolismus von Methyleugenol (1) in Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>

#### 6.1.1.1 Identifizierung mikrosomaler Metaboliten von Methyleugenol (1)

Als Hauptmetaboliten des lebermikrosomalen Phase-I-Metabolismus von Methyleugenol (1) Inkubationen konnten (RS)-1'-Hydroxymethyleugenol (11), (E)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (12) und bei Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) zusätzlich 6-Hydroxymethyleugenol (19) identifiziert werden. In geringerem Ausmaß wurde (RS)-2',3'-Dihydroxymethyleugenol (27) nachgewiesen, dessen wahrscheinliche Vorstufe, (RS)-Methyleugenol-2',3'-epoxid (15) jedoch nur bei unbehandelten Rattenlebermikrosomen (RLM) quantifizierbar war, was vermutlich auf die effiziente Hydrolyse durch mikrosomale Epoxidhydrolasen (mEH) zurückzuführen ist. Daneben wurden in fast allen Inkubationen die O-demethylierten Metaboliten Eugenol (6) und Chavibetol (8) detektiert, wobei 6 immer in (teils deutlich) höheren Konzentrationen als 8 quantifiziert wurde. Ferner wurden die Oxidationsprodukte der Seitenkettenalkohole 11 und 12, 1'-Oxomethyleugenol (22) und 3'-Oxomethylisoeugenol (23) detektiert. Hierbei war zu verzeichnen, dass 23 bei nahezu jeder Inkubation in quantifizierbaren Mengen nachweisbar war, während 22 nur in wenigen Inkubationen überhaupt detektiert werden konnte.

#### 6.1.1.2 Zeitverläufe der Metabolitenbildung in lebermikrosomalen Inkubationen mit Methyleugenol (1)

Die Untersuchung der Zeitverläufe der Metabolitenbildung von 1 in allen untersuchten Lebermikrosomen belegte, dass die Bildungsgeschwindigkeit der detektierten Metaboliten zumindest über die ersten 30 Minuten in guter Näherung linear war. Die Gesamtwiederfindung (identifizierte Metaboliten + verbleibendes Substrat) betrug in den ersten zwei Stunden bei allen LM mindestens 80 %. Das Ranking der Umsatzgeschwindigkeiten war (bei konstanter Proteinkonzentration) in ungefährender Korrelation mit deren jeweiligen CYP-Gehalt ARLM > BLM ≈ HLM > SLM ≈ RLM. Dabei ist zu beachten, dass die Experimente zu den Zeitverläufen von 1 und (E)-Methylisoeugenol (2) wegen der geringen Löslichkeit von 1 und 2 in wässrigen Lösungen (Garner *et al.*, 1997) mit 5 % DMSO als Lösungsvermittler durchgeführt. Wegen der möglichen Inhibition verschiedener CYP-Enzyme (Busby *et al.*, 1999; Easterbrook *et al.*, 2001b) wurden alle weiteren Inkubationen mit 1 % MeCN als Lösungsvermittler durchgeführt (d. h. alle kinetischen Messungen, die Experimente mit Supersomes<sup>TM</sup> sowie alle

Inkubationen von Asaronen), was offensichtlich keine negativen Effekte auf die Löslichkeit der Substrate und gebildeten Metaboliten hatte.

### 6.1.1.3 Kinetik der Metabolitenbildung von Methyleugenol (1) in Lebermikrosomen

Die Bestimmung enzymkinetischer Parameter zeigte, dass in Rattenlebermikrosomen (RLM) über einen weiten Konzentrationsbereich drei Hauptmetaboliten gebildet werden: Die Alkohole **11** und **12** sowie Diol **27**. Die *in vivo*-Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit Aroclor 1254, resultierte in einem induktiven *shift* hin zur vermehrten Bildung von **11** und **19** und verminderten Bildung von **12** und **27** in den Inkubationen von Lebermikrosomen (LM) dieser Tiere (ARLM) mit **1**. Dabei stellt **11** im Falle geringer Substratkonzentrationen in ARLM mit 78 % den Hauptmetaboliten. Ferner wurde der Gesamtumsatz von **1** in ARLM im Vergleich zu den Inkubationen mit RLM deutlich gesteigert, was mit der potenten Induktion verschiedener CYPs durch Aroclor 1254 erklärt werden kann, wobei in männlichen SD-Ratten Aroclor 1254 (35 mg/kg KG) prozentual die Aktivität von CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 am stärksten erhöhte (Easterbrook *et al.*, 2001a).

RLM waren die einzigen untersuchten LM, in denen Epoxid **15** quantifizierbar war, wobei die detektierte Menge **15** mit steigender Substratkonzentration abnahm (Abbildung 52, Seite 128) und weshalb für diese Reaktion keine enzymkinetischen Parameter abgeleitet werden konnten. Die negative Steigung im  $v/[S]$ -Diagramm impliziert einen kleinen  $K_M$ -Wert, also eine prinzipiell hohe Affinität für diese Reaktion, könnte aber indikativ für eine Produktinhibition bzw. irreversible Inhibition (*suicide inhibition*; Hutzler und Tracy, 2002) sein, welche für Epoxide in der Literatur beschrieben ist (Li *et al.*, 2011; Blobaum, 2006; Correia und Ortiz de Montellano, 2005). Somit konkurrieren in RLM zwei potentiell detoxifizierende Metabolismuswege (**12**, **15/27**) mit der Bildung des proximalen Kanzerogens **11**. Alle weiteren in RLM beobachteten Reaktionen spielen aus kinetischer Sicht, zumindest im Falle geringer Substratkonzentrationen, eine untergeordnete Rolle. Die enzymkinetischen Parameter der Inkubationen von Rinderlebermikrosomen (BLM) mit **1** lagen zwischen den Werten von ARLM und RLM. Schweinelebermikrosomen (SLM) metabolisierten **1** innerhalb des beobachteten Substratkonzentrationsbereichs mit den geringsten Umsatzraten. Anhand der kinetischen Daten sind die Bildung von **27** und in etwas geringerem Umfang die Bildung von **11** die Hauptwege in SLM, wobei eine geringe Abhängigkeit des Metabolitenprofils von der Substratkonzentration festgestellt wurde. Die Untersuchung der Bildungskinetik zum Metabolismus von **1** in humanen Lebermikrosomen (HLM) zeigte, dass die Bildung von **27** und **11**



über einen weiten Konzentrationsbereich die Hauptreaktionswege darstellen. Bei niedrigen Substratkonzentrationen werden wahrscheinlich **27** (66 %) sowie **11** (16 %) die Hauptmetaboliten in HLM darstellen. Mit steigenden Substratkonzentrationen nimmt die Bildung von **27** ab und die Reaktionen von **1** zu **11** und **12** gewinnen an Bedeutung. Die Bildung O-demethylierter Produkte **6** und **8** finden je nach Substratkonzentration zu 7-12 % statt, während die Bildung von **19** und die Bildung von **23** keine Rolle in HLM zu spielen scheinen. Somit gibt es keine kinetischen Anhaltspunkte dafür, dass die Bildung des proximalen Kanzerogens **11** auch bei kleinen Konzentrationen von **1** im HLM ausbleibt. Die kinetischen Daten zeigen weiterhin, dass keine der untersuchten tierischen Spezies ein überzeugendes Surrogat für den Metabolismus von **1** in HLM über den gesamten Substratkonzentrationsbereich darstellt. Im Falle geringer Substratkonzentrationen ist der Metabolismus von **1** in SLM und HLM jedoch qualitativ und quantitativ sehr ähnlich.

Während der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit publizierten Al-Subeihi *et al.* kinetische Daten zur Bildung von Metaboliten von **1** in RLM (2011) und HLM (2012). Die experimentellen Bedingungen der Untersuchungen von Al-Subeihi *et al.* unterscheiden sich im Detail von denen in dieser Arbeit, sollten aber im Wesentlichen zu ähnlichen Ergebnissen führen. In Tabelle 40 sind die eigenen Daten mit denen von Al-Subeihi *et al.* gegenübergestellt. Die erhaltenen bildungskinetischen Parameter von **11**, **12** und **27** liegen in beiden Untersuchungen sowohl für RLM als auch HLM dicht beieinander. Der von Al-Subeihi *et al.* (2011) bestimmte geringe  $K_M$ -Wert und die damit verbundene hohe katalytische Effizienz  $E_{cat}$  für die Bildung von **19** in RLM konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die katalytischen Effizienzen für die Bildung von **19** in HLM stimmen jedoch in guter Näherung überein. Während die Autoren in Inkubationen mit RLM Eugenol (**6**) nicht detektierten, detektierten sie Chavibetol (**8**) als einziges O-demethyliertes Produkt. In HLM hingegen wurde von den Autoren **6** als Hauptprodukt der O-Demethylierung und **8** in geringen Konzentrationen detektiert. **8** war in den eigenen Untersuchungen für alle LM erst in den höheren Inkubationskonzentrationen oder längeren Inkubationszeiten in Konzentrationen oberhalb der Quantifizierungsgrenze detektierbar. Hauptmetabolit der O-Demethylierung war in allen Fällen **6**. Die wenigen zur Verfügung stehenden Datenpunkte zur Modellierung der Parameter von **8** erschwerten eine aussagekräftige Analyse, weshalb die Parameter aus der Summe von **8** und **6** bestimmt wurden. Auch durch Ableitung der enzymkinetischen Werte aus den Bildungsgeschwindigkeiten von **6** allein ändern sich die berechneten Parameter nicht bedeutend. Der von Al-Subeihi *et al.* (2012) bestimmte sehr geringe  $K_M$ -Wert für die Bildung von **6** in HLM, konnte nicht bestätigt werden, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion in beiden Untersuchungen vergleichbar war.

**Tabelle 40.** Literaturvergleich der apparenten kinetischen Daten der Reaktionen von Rattenlebermikrosomen (RLM) bzw. humanen Lebermikrosomen (HLM) mit Methyleugenol (**1**).

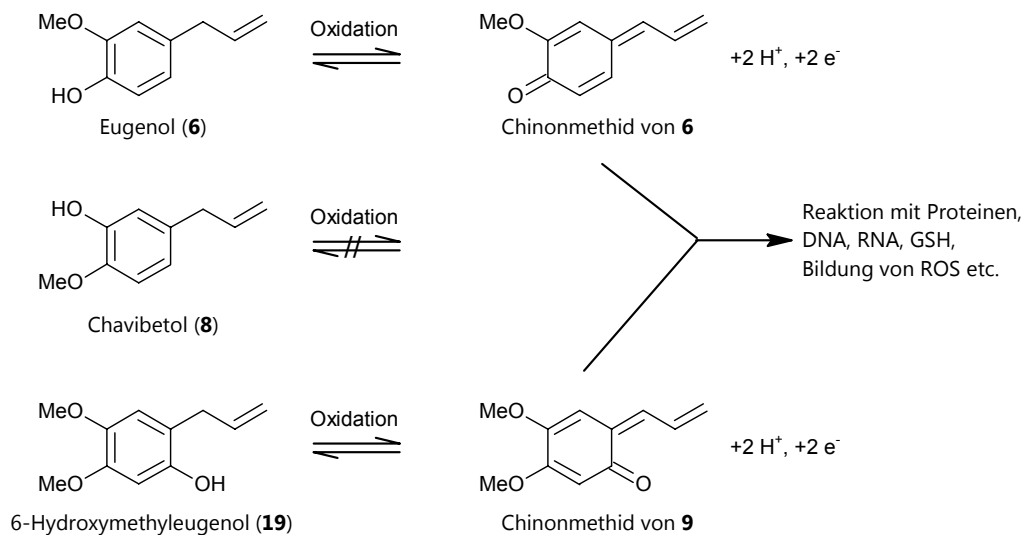
Parameter	Eigene Daten			Al-Subeihi <i>et al.</i> <sup>1</sup>		
	$v_{\max}$	$K_M$	$E_{\text{cat}}$	$v_{\max}$	$K_M$	$E_{\text{cat}}$
<b>Metabolit</b>	<b>RLM<sup>2</sup></b>					
1'-OH-ME ( <b>11</b> )	1,72	206	8,36	3,26 [3,6]	253 [181]	12,9 [19,9]
3'-OH-MIE ( <b>12</b> )	1,00	96,7	10,4	0,68 [0,75]	28 [27,7]	24,3 [27,6]
ME-Diol ( <b>27</b> )	1,75	122	14,3	1,84 [2,0]	81 [100]	22,7 [20,0]
Eugenol ( <b>6</b> ) <sup>3</sup>	0,22	308	0,71		n. a.	
Chavibetol ( <b>8</b> )		s. <b>6</b>		0,13 [0,25]	150 [361]	0,87 [0,69]
6-OH-ME ( <b>19</b> )	0,21	768	0,27	0,26 [0,28]	32 [31,2]	8,1 [9,0]
3'-Oxo-MIE ( <b>23</b> ), „M6“ <sup>5</sup>	0,39	652	0,60	0,44 [0,30]	259 [86]	1,7 [3,5]
	<b>HLM</b>					
1'-OH-ME ( <b>11</b> )	1,00	285	3,51	1,38	404 <sup>4</sup>	3,4
3'-OH-MIE ( <b>12</b> )	0,77	400	1,92	0,39	161	2,4
ME-Diol ( <b>27</b> )	0,60	41,7	14,4	0,66	23,7	27,8
Eugenol ( <b>6</b> ) <sup>3</sup>	0,31	207	1,49	0,15	13,6	11
Chavibetol ( <b>8</b> )		s. <b>6</b>		0,21	1097	0,21
6-OH-ME ( <b>19</b> )	3E+13	3E+17	0,10	0,10	415	0,24
<b>Unterschiede der Inkubationsbedingungen</b>	NADPH-generierendes System; 0,5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4); 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1% MeCN; t = 20 min; fünf Konz. zw. 50–800 µM; RLM: Wistar, m, 2 Tiere; Modell: Michaelis-Menten, Hill oder Eadie-Hofstee			3 mM NADPH, 1 mM Ascorbinsäure als Antioxidans; 0,2 mM TRIS-HCl (pH 7,4); 1% DMSO; t = 10 min; sieben Konz. zw. 5–1000 µM (RLM) bzw. 25–800 µM (HLM); RLM: SD, m, bzw. F344, m, Modell: Michaelis-Menten		

<sup>1</sup>Daten aus Al-Subeihi *et al.*, 2011 (RLM), 2012 (HLM).<sup>2</sup>Die erstgenannten Werte sind von RLM männlicher SD-Ratten, in eckigen Klammern RLM männlicher Fisher 344-Ratten.<sup>3</sup>Die eigenen Daten wurden bestimmt als Summe von Eugenol (**6**) + Chavibetol (**8**).<sup>4</sup>Jeurissen *et al.*, 2006 geben einen  $K_M$ -Wert von  $200 \pm 40 \mu\text{M}$  für diese Reaktion an.<sup>5</sup>bei dem von Al-Subeihi *et al.* (2011) nicht identifizierten Metaboliten „M6“ könnte es sich aufgrund dessen Retentionszeit um (E)3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) handeln. $K_M$ : apparente Michaelis-Menten-Konstante; [ $\mu\text{M}$ ] $v_{\max}$ : maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit; [ $\text{nmol Produkt min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ] $E_{\text{cat}}$ : „apparente katalytische Effizienz“ =  $v_{\max}/K_M$ ; [ $\mu\text{l min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$ ]

n. a.: nicht angegeben.

Die Differenzierung zwischen **6** und **8** ist von toxikologischem Interesse, da diese Metaboliten prinzipiell chemisch (über Sauerstoff bzw. Sauerstoffspezies) oder enzymatisch (über Oxidoreduktasen, z. B. Cu-Superoxiddismutase, Myeloperoxidase oder CYPs) zu Chinonmethiden oxidiert werden können, was in einer Aktivierung resultieren kann. Verbindungen mit einer zur Seitenkette *ortho*- oder *para*-ständigen Hydroxygruppe (**6** und **19**), nicht jedoch Verbindungen mit Hydroxygruppen in *meta*-Stellung (**8**) können so oxidiert werden, was Abbildung 126 verdeutlicht (vgl. Reaktion *m* in Abbildung 6, Seite 15). Diese Reaktion verläuft über Radikalzwischenstufen und somit stellen sowohl die Intermediate, als auch Chinone und Chinonmethide selbst elektrophile Zwischenstufen dar, die prinzipiell mit nukleophilen Zellbestandteilen kovalente Addukte bilden können. Dabei werden Chinonmethide hauptsächlich mit der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteinreaktivität und als Folge mit zytotoxischen und allergenen Effekten durch Haptenbildung, seltener mit der Bildung von

DNA-Addukten assoziiert (Bolton *et al.*, 2000). Die Bildung eines Chinonmethids in Inkubationen von Mikrosomen oder Leberdünnschnitten mit **6** ist aufgrund mehrerer Untersuchungen wahrscheinlich, wobei als Marker für deren Bildung zumeist das entsprechende Chinonmethid-Glutathion-Addukt herangezogen wurde (Thompson *et al.*, 1989, 1989b, 1990, 1991, 1995; Rompelberg *et al.*, 1996; Gaikwad, 2013; Melles *et al.*, 2013). Die Bildung, zumindest von **6**, wird dennoch prinzipiell als ein detoxifizierender Reaktionsweg angesehen, da **6** einer schnellen Konjugation mit Glucuronsäure unterliegt (Sutton *et al.*, 1985 und Caldwell *et al.*, 1990), **6** nicht mutagen im Ames-Test war (Delaforge *et al.*, 1977; Dorange *et al.*, 1977; Green und Savage, 1978; Swanson *et al.*, 1979; Eder *et al.*, 1980) und in F344/N-Ratten sowie B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen keine kanzerogenen Effekte beobachtet wurden (NTP, 1983).



**Abbildung 126.** Oxidation von Eugenol (**6**) und 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) zu reaktiven Chinonmethiden. Die Bildung eines Chinonmethids aus Chavibetol (**8**) kann nicht stattfinden. GSH: Glutathion; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; DNA: Desoxyribonukleinsäure; RNA: Ribonukleinsäure.

Al-Subeih *et al.* (2011) implementierten ihre in Mikrosomen gemessenen bzw. abgeleiteten enzymkinetischen Daten der Metabolitenbildung von **1** in ein PBBK-Modell (*physiologically based biokinetic*), das neben der Aufnahme des Stoffes im Gastrointestinaltrakt (1. Ordnung) auch die Kinetik und Kompartimentierung in andere Gewebe modelliert. Leber, Niere, Lunge und Fettgewebe wurden explizit modelliert, alle weiteren Kompartimente wurden in einem stark- und einem gering perfundierten Kompartiment zusammengefasst. Mit diesem PBBK-Modell wurde die Bildung der Phase-I-Metaboliten von **1** in der Ratte für verschiedene Dosen modelliert. In Tabelle 41 (Seite 228) sind die Metabolitenverteilungen (prozentualer Umsatz der Gesamtdosis von **1**) für modellierte Dosen von 0,05–300 mg/kg KG zusammengefasst. Links und rechts in dieser Tabelle sind die  $E_{\text{cat}}$  %- und  $v_{\text{max}}$  %-Werte, welche aus den eigenen kinetischen Daten der Inkubationen mit nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM)

abgeleitet wurden, angegeben (Kap. 5.4.2.4, Tabelle 23, Seite 130). Wie mehrfach gezeigt, stellt in dieser Interpretation  $E_{\text{cat}}$  % die Metabolitenverteilung im Falle geringer Substratkonzentrationen und  $v_{\text{max}}$  % die Metabolitenverteilung bei hohen bzw. gesättigten Substratkonzentrationen dar.

**Tabelle 41.** Vergleich der im PBBK-Modell von Al-Subeihi *et al.* (2011) anhand kinetischer Daten aus Inkubationen von Mikrosomen mit Methyleugenol (**1**) vorhergesagten prozentualen Verteilung der Phase-I-Metaboliten für drei modellierte Dosen zwischen 0,05–300 mg **1**/kg KG (Ratte, oral) mit den prozentualen Werten von  $E_{\text{cat}}$  und  $v_{\text{max}}$  der eigenen Messungen.

Metabolit	$E_{\text{cat}}$ %	Metabolitenverteilung [%]			$v_{\text{max}}$ %
	Eigene Werte <sup>1</sup>	im PBBK-Modell			Eigene Werte <sup>1</sup>
		(Al-Subeihi <i>et al.</i> , 2011)			
	„niedrige Substrat- konzentration bzw. Dosis“	modellierte Dosis [mg/kg KG]			„hohe Substrat- konzentration bzw. Dosis“
		0,05	10	300	
1'-OH-ME ( <b>11</b> )	24	17,6	18,6	30,8	32
3'-OH-MIE ( <b>12</b> )	30	32,9	31,3	19,8	19
3'-Oxo-MIE ( <b>23</b> ); „M6“ <sup>2</sup>	2	2,3	2,5	4,1	7
ME-Diol ( <b>27</b> ) <sup>3</sup>	41	31,0	31,8	32,8	33
6-OH-ME ( <b>19</b> )	1	11,4	11,0	7,4	4
Chavibetol ( <b>8</b> ) <sup>4</sup> bzw. Eugenol ( <b>6</b> + <b>8</b> )	2	3,4	3,5	3,5	4
Summe <sup>5</sup>	100	98,6	98,7	98,4	100

<sup>1</sup> Daten aus Tabelle 23, Seite 130.

<sup>2</sup> bei dem von Al-Subeihi *et al.* (2011) nicht identifizierten Metaboliten „M6“ könnte es sich aufgrund dessen Retentionszeit um (E)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) handeln.

<sup>3</sup> Al-Subeihi *et al.* (2011) haben ME-Diol (**27**) gemessen, bezeichneten die zugehörigen Werte aber als ME-Epoxid (**15**).

<sup>4</sup> Al-Subeihi *et al.* (2011) detektierten/quantifizierten nur **8**, nicht jedoch **6**. Die eigenen Werte stellen die Summe **6**+**8** dar.

<sup>5</sup> Im PBBK-Modell wurde der absolute Gesamtumsatz der modellierten Dosis **1** berechnet, welcher nahezu quantitativ war. Die eigenen Werten sind relative Angaben zur Metabolitenverteilung. Daher sind deren Summen per Definition 100 %.

Da die von Al-Subeihi *et al.* (2011) modellierten Dosen einen weiten Bereich umfassen, sollten die  $E_{\text{cat}}$  %-Werte und die PBBK-Daten der niedrigsten modellierten Dosis sowie die  $v_{\text{max}}$  %-Werte und die PBBK-Daten der höchsten modellierten Dosis jeweils in einer vergleichbaren Größenordnung liegen. Tatsächlich ist die Übereinstimmung der eigenen (vergleichsweise einfach berechneten) und der durch das komplexe PBBK-Modell berechneten Werte sogar ausgesprochen gut. Dieser Vergleich belegt, dass durch die eigene Methode Metabolitenkonzentrationen für niedrige und hohe Substratkonzentrationen bzw. Dosen zu extrapolieren, sinnvolle und belastbare Daten erzeugt werden können.

Die Kinetik der Bildung von **11** aus **1** wurde ebenfalls von Gardner *et al.* (1997) an RLM männlicher F344-Ratten untersucht. Hierbei wurde im  $v$  gegen  $v/[S]$ -Diagramm (Eadie-Hofstee-Plot) eine biphasische Reaktionskinetik mit einem hoch- und niedrigaffinen Bereich identifiziert. Für den hochaffinen Bereich konnten folgende bildungskinetischen Parameter

abgeleitet werden:  $v_{\max} = 1,42 \text{ nmol } \mathbf{11} \text{ min}^{-1} \text{ nmol CYP}^{-1}$  und  $K_M = 74,9$ . Bildungskinetische Parameter für den niedrigaffinen Bereich konnten nicht abgeleitet werden. Die Autoren fanden zudem eine bis zu sechsfache Steigerung der Aktivität der Bildung von **11** durch mit verschiedenen CYP-Induktoren behandelten Tieren, wobei Dexamethason, Phenobarbital und Isosafrol die stärksten Effekte zeigten. Ebenfalls konnte eine bis zu 1,7-fache dosisabhängige Erhöhung der Bildung von **11** in zuvor mit **1** behandelten Ratten beobachtet werden (Autoinduktion). Schließlich untersuchten die Autoren die Bildungsgeschwindigkeit von **11** in HLM von  $n = 13$  Spendern. Dabei wurden bei  $c(\mathbf{1}) = 200 \mu\text{M}$  Aktivitäten zwischen 0,05–1,33  $\text{nmol } \mathbf{11} \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  (MW = 0,5; Median = 0,41) ermittelt. Die interindividuellen Bildungsgeschwindigkeiten von **11** variierten folglich mit einem Faktor von rund 27 zwischen den aktivsten und am wenigsten aktiven HLM. Die absoluten Werte der Bildungsgeschwindigkeiten von **11** in RLM und HLM von Gardner *et al.* (1997) liegen im gleichen Bereich wie die Werte, die in den eigenen und den von Al-Subeihy *et al.* (2011, 2012) durchgeführten Untersuchungen mit RLM oder gepoolten HLM erhalten wurden.

#### 6.1.1.4 Metabolismus von Methyleugenol (**1**) durch humane Cytochrom P450-Enzyme

Die Untersuchung von sechs humanen CYPs zeigte, dass CYP1A2 potent die Bildung aller in Lebermikrosomen detektierten Metaboliten katalysieren kann. Obgleich Diol **27** in vergleichsweise hohen Konzentrationen detektiert wurde, waren jedoch die Konzentrationen von Epoxid **15** in den Inkubationen mit humanen CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup> gering. CYP2C19 bildete mit höchster Aktivität **12**, CYP2D6 und CYP3A4 jeweils **11** und CYP2E1 war am aktivsten in der Bildung des Epoxids **15**. CYP2A6 generierte unter den gegebenen Inkubationsbedingungen den geringsten Umsatz mit **1**. Es bildete ebenfalls **15**, jedoch in deutlich geringen Mengen als CYP2E1. CYP3A4 war das einzige der untersuchten CYPs, welches die Ringhydroxylierung von **1** zu **19** katalysierte.

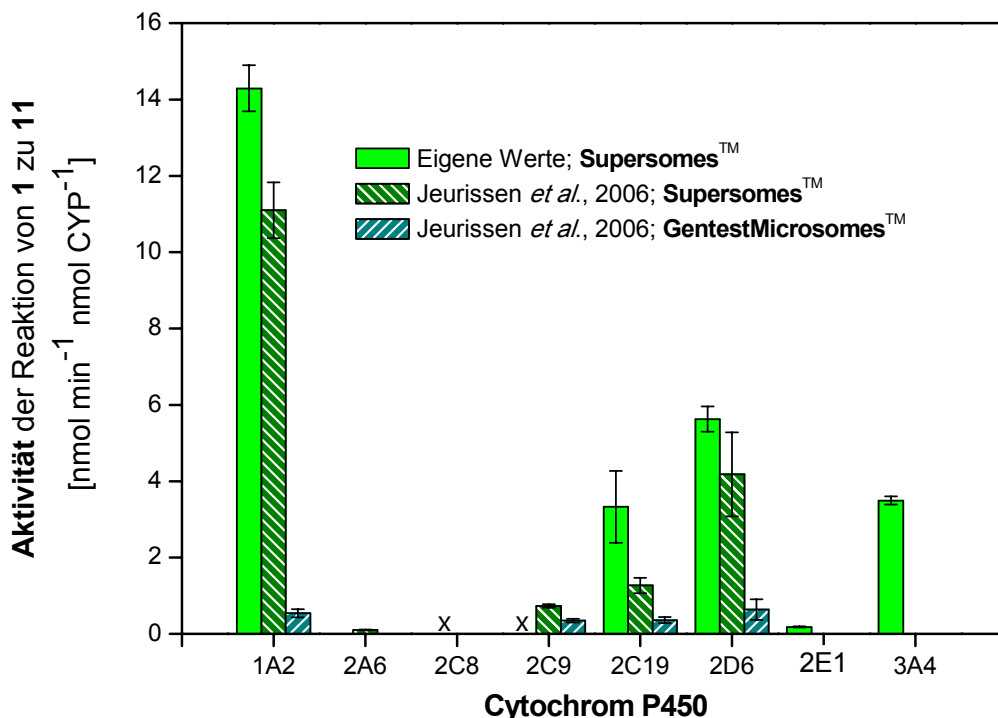
CYP2E1 katalysierte potent die Epoxidierung der Seitenkette von **1**. Nach 20 min wurden 6 % der eingesetzten Konzentration von **1** als Epoxid **15** und weitere 1,7 % als Diol **27** quantifiziert. Nach 60 min konnten sogar 7,6 % des Epoxids **15** quantifiziert werden, während die Konzentration von **27** im gleichen Zeitraum auf 7,9 % anstieg. Der Anstieg der Konzentration von **15** spricht zum einen für eine langsame Hydrolyse von **15**, sowohl chemisch als auch enzymatisch, zum anderen für eine lange Aktivität des Enzyms und gegen einen *suicide*-Mechanismus wie er im Falle der Inkubationen von RLM mit **1** vermutet wurde (vgl. Abbildung 52, S. 128). In Inkubationen mit CYP1A2 wurden hingegen bereits früh (20 min)

große Mengen **27**, aber nur wenig **15** detektiert. Nach 60 min Inkubationsdauer änderten sich die Konzentrationen von **15** und **27** in CYP1A2 nur noch geringfügig. Es stellt sich die Frage wieso in CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup> Epoxid **15** offensichtlich deutlich schneller hydrolysiert als in CYP2E1-Supersomes<sup>TM</sup>. Eine Charakteristik von EHs ist das schnelle Abfangen von Epoxiden und das langsame Freigeben als Diol (Oesch *et al.*, 2004). Da in Lebermikrosomen (mit Ausnahme von RLM) zwar Diol **27**, nicht aber Epoxid **15** detektierbar war, ist es wahrscheinlich, dass mikrosomale Insektenzell-Epoxidhydrolasen (mIEHs) in Supersomes<sup>TM</sup> (Wang *et al.*, 1993) eine geringe Aktivität aufweisen als hepatische mEHs der anderen untersuchten Spezies oder **15** ein schlechteres Substrat für mIEHs darstellt. Geht man davon aus, dass die Expression verschiedener humaner CYPs in den Supersomes<sup>TM</sup> keinen Einfluss auf die Menge bzw. Aktivität der mIEHs hat, so müsste deren Menge bzw. Aktivität grob mit dem Proteingehalt der Supersomes<sup>TM</sup> korrelieren. Die Proteingehalte der Supersomes<sup>TM</sup> sind in Tabelle 44 (S. 259) aufgeführt. Tatsächlich fällt auf, dass die Supersomes<sup>TM</sup> mit den geringsten Proteingehalten (CYP2C19 und CYP2E1) auch die geringsten Umsatzrate von **15** zu **27** aufweisen (2,8 bzw. 3,5 mg/ml), während der Proteingehalt von CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup>, welche diese Reaktion schnell katalysieren 2,4- bzw. 3-fach höher liegt. Die einzige Ausnahme bilden CYP2A6-Supersomes<sup>TM</sup>, welche den höchsten Proteingehalt (14 mg/ml) aufwiesen, in deren Inkubationsüberständen jedoch sowohl nach 20 min als auch nach 60 min Inkubationsdauer Epoxid **15**, wenn auch in geringen Konzentrationen, neben Diol **27**, nachweisbar war.

Die Bildungsaktivitäten von **11** aus **1** durch verschiedene CYP-Enzyme wurden bereits von Jeurissen *et al.* (2006) in Supersomes<sup>TM</sup> und GentestMicrosomes<sup>TM</sup> untersucht. Das experimentelle Setup dieser Untersuchung war im Wesentlichen identisch mit den Inkubationsbedingungen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Die Werte der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen können daher direkt miteinander verglichen werden. GentestMicrosomes<sup>TM</sup> weisen generell geringere CYP-Aktivitäten auf als Supersomes<sup>TM</sup> und sind daher quantitativ nicht unmittelbar mit diesen vergleichbar. In Abbildung 127 sind die Werte für die Bildung von **11** in verschiedenen Supersomes<sup>TM</sup> (aus Abbildung 50; Startkonzentration **1**: 200 µM; Inkubationsdauer 20 min), umgerechnet in Aktivitäten mit denen von Jeurissen *et al.* (2006) nebeneinander dargestellt.

Qualitativ und quantitativ sind die erhaltenen Ergebnisse der Supersomes<sup>TM</sup>-Untersuchungen ähnlich, wobei die in dieser Arbeit gemessenen Aktivitäten bei allen untersuchten CYPs etwas größer waren. Dies könnte auf die Verwendung von MeCN statt DMSO als Lösungsmittel zurückzuführen sein, welcher vom Hersteller empfohlen wird (BD Bioscience, 2009) und in den eigenen Experimenten verwendet wurde. DMSO inhibiert bei den verwendeten Konzentrationen CYP2C19 (52 %), CYP2D6 (48 %) und CYP3A4 (32 %) stärker als MeCN, nicht jedoch

CYP1A2 (Busby *et al.*, 1999). Ein bedeutender Unterschied zwischen den Untersuchungen von Jeurissen *et al.* (2006) und den gezeigten eigenen Ergebnissen besteht in der Beteiligung von CYP3A4-Supersomes™.



**Abbildung 127.** Aktivitäten der Bildung von 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) aus Methyleugenol (**1**) in verschiedenen Cytochrom P450-Enzymen exprimiert in Supersomes™ bzw. GentestMicrosomes™. Vergleich eigener Ergebnisse mit Ergebnissen aus der Literatur. Die Literaturwerte (dunkel) wurden graphisch aus den in Jeurissen *et al.* (2006) abgebildeten Diagrammen (Fig. 2 und 3) ermittelt. Die wesentlichen Reaktionsbedingungen waren identisch ( $c(\mathbf{1}) = 200 \mu\text{M}$ ,  $t = 20 \text{ min}$ ), mit folgenden Unterschieden:  $c(\text{CYP}) = 300$  (Jeurissen) bzw. 120 pmol/ml (eigene Messungen); Lösungsvermittler: 1 % DMSO (Jeurissen); 1 % MeCN (eigene Messungen). Die Verhältnisse der Enzymaktivitäten von GentestMicrosomes™ zu HLM betragen:  $\approx 0,3$  (2C8); 0,5 (1A2); 1 (2A6, 2C9, 2C19, 2E1); 3,3 (2D6); (3A4 n. a.). x = nicht untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Spannweite von  $n = 2$  unabhängigen Inkubationen (eigene Daten) bzw.  $n = 3 \pm \text{SD}$  (Jeurissen).

Während Jeurissen *et al.* (2006) keine Aktivität von CYP3A4 in Hinblick auf die Bildung von **11** nachweisen konnten, leistete CYP3A4 in dieser Arbeit neben CYP1A2, CYP2C19 und CYP2D6 einen bedeutenden Beitrag zu dieser Reaktion, was in sieben unabhängigen Inkubationen von CYP3A4-Supersomes™ mit **1** gezeigt werden konnte. Weshalb dieser Unterschied bei den beiden Untersuchungen besteht ist unklar, könnte aber auf die Inhibition durch DMSO bei den Experimenten von Jeurissen *et al.* (2006) zurückzuführen sein. Eine Kontamination der verwendeten Charge ist unwahrscheinlich, da CYP3A4-Supersomes™ insbesondere bei den Inkubationen mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und  $\alpha$ -Asaron (**3**) ein ausgeprägt spezifisches Metabolitenspektrum aufwies. Der Befund, dass CYP3A4 potent die Bildung des proxi-

malen Kanzerogens **11** katalysieren kann, ist im Hinblick auf eine Risikobewertung zunächst ein bedeutender Befund, weil CYP3A4 in allen Geweben in hohen Gehalten und mit hoher Aktivität exprimiert wird nur geringe interindividuelle Unterschiede (human, *in vivo*) aufweist (Ortiz de Montellano, 2005). In weitergehenden Berechnungen (vgl. folgendes Kapitel) konnte jedoch gezeigt werden, dass der Beitrag von CYP3A4 im Falle niedriger Konzentrationen bzw. Dosen von **1** dennoch nur eine untergeordnete Rolle für die Bildung von **11** spielt und CYP1A2 das hauptsächlich verantwortliche Enzym (der sechs untersuchten) für die Katalyse dieser Reaktion im humanen Modell darstellt.

Wie bereits erwähnt, untersuchten Gardner *et al.* (1997) die Bildung von **11** in verschiedenen RLM. Durch Inhibitions- und Induktionsversuche sollte die Beteiligung verschiedener CYPs an der Bildung von **11** bestimmt werden. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass CYP2E1 eine besondere Bedeutung zukommt und dass u. a. CYP3A und CYP1A2 nur eine untergeordnete Rolle spielen. Eigene, umfangreiche Inhibitionsexperimente zeigten, dass Ergebnisse dieses Ansatzes mit großer Vorsicht bewertet werden sollten. Die Experimente haben sehr störanfällig in Bezug auf die verwendeten Konzentrationen von Substrat und Inhibitor reagiert, waren schlecht reproduzierbar und Bias-behaftet. So wurde z. B. in vielen Inkubationen durch einen „spezifischen“ Inhibitor nicht den experimentellen Erwartungen entsprechend die Bildung eines oder mehrerer Metaboliten gehemmt, sondern häufig im Vergleich zur Negativkontrolle (ohne Inhibitor) höhere Metabolitenkonzentrationen detektiert, was mit dem Ausbleiben von sekundären Reaktionen erklärt werden könnte. Insgesamt waren die erhaltenen Daten nicht konsistent und nicht schlüssig, weshalb sie nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen wurden. Im Gegensatz dazu können Inhibitionsuntersuchungen aber bei einzelenzymatischen Untersuchungen (Supersomes<sup>TM</sup> oder aufgereinigte Enzymen) als Kontrollexperimente sinnvoll sein, um erhaltene Ergebnisse zu untermauern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Inhibitionsversuche als Kontrolle ( $n = 1$ ) durchgeführt. Aber auch hierbei war die Güte der Ergebnisse uneinheitlich, was wahrscheinlich auf die geringe Spezifität der verwendeten Inhibitoren zurückzuführen ist.  $\alpha$ -Naphthoflavon (1  $\mu\text{M}$ ) hemmte potent CYP1A2 (100 % Inhibition bei 500  $\mu\text{M}$ ; 82 % bei 200  $\mu\text{M}$  **1**) und Chinidin (5  $\mu\text{M}$ ) erwies sich als potenter Inhibitor von CYP2D6 (je 95 % Inhibition bei der Umsetzung von **1**, 500  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  nach 1 h). Da CYP2A6 **1** nur wenig umsetzte, wurde hier die Kontrollreaktion (Cumarin, 500  $\mu\text{M}$ , 20 und 60 min) mit Tranylcypromin (2  $\mu\text{M}$ ) untersucht, wobei eine 12 %ige Inhibition beobachtet wurde. Die weiteren CYPs wurden mit Cimetidin (100  $\mu\text{M}$ ; CYP2C19), Aceton (1 %; CYP2E1) bzw. Ketoconazol (2  $\mu\text{M}$ ; CYP3A4) auf ihren hemmenden Einfluss für die Reaktion mit **1** hin untersucht. Dabei konnte in keinem der Fälle eine reproduzierbare Inhibition > 3 % beobachtet werden.



### 6.1.1.5 Beteiligung humaner CYPs am Metabolismus von Methyleugenol (1) in humanen Lebermikrosomen

Durch Anwendung des RAF-Konzepts auf die in Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen gemessenen kinetischen Daten, folgt, dass CYP1A2 nahezu konzentrationsunabhängig mit rund 80 % an der Bildung von **11** in HLM beteiligt ist. Zu geringeren Anteilen sind ferner CYP2C19, CYP2E1 und CYP3A4 an dieser Reaktion beteiligt. Bei der geringsten Substratkonzentration (50 µM) beträgt die berechnete Beteiligung an der Bildung von **12** in HLM 79 % CYP1A2, 15,1 % CYP2C19 und 5,2 % CYP2E1. Bei geringeren Substratkonzentrationen verringert sich wahrscheinlich der prozentuale Beitrag von CYP1A2 an der Bildung von **12**, wohingegen CYP2C19 und CYP2E1 an Bedeutung gewinnen. Die nachfolgende Oxidation von **12** zu **23** erfolgt ebenfalls hauptsächlich durch CYP1A2 (53 % bei 50 µM). Der Rest wird von CYP2C19, CYP2E1 und CYP3A4 beigesteuert. Die Epoxidierung von **1** zu **15** katalysiert in HLM CYP2E1 und CYP2A6, wobei hier eine klare Konzentrationsabhängigkeit abzulesen ist, die einen höheren Anteil von CYP2A6 bei kleinen Substratkonzentrationen vorhersagt. Die nachfolgende Hydrolyse von **15** zu **27** wird in HLM und kleinen Substratkonzentrationen zu gleichen Teilen von CYP1A2 und CYP2E1 katalysiert, wobei diese Vorhersage natürlich nur auf Grundlage der Supersomes<sup>TM</sup>-Inkubationen erfolgt und die wahrscheinlich wesentlich bedeutendere Beteiligung hepatischer EHs außer Acht lässt. Die O-Demethylierung von **1** zu **6 + 8** wird in HLM wahrscheinlich von CYP1A2 und CYP2C19 katalysiert, wobei es unter Berücksichtigung der kinetischen Daten für diese Reaktion wahrscheinlich ist, dass CYP3A4 und CYP1A2 im Falle geringer Substratkonzentrationen hauptsächlich für diese Reaktion verantwortlich sind. Die Ringhydroxylierung von **1** zu **19** katalysiert in HLM hauptsächlich CYP3A4, bei höheren Substratkonzentrationen auch CYP1A2.

### 6.1.2 Metabolismus von Methyleugenol (1) in primären Rattenhepatozyten

Die Untersuchungen zum Phase-II-Metabolismus von **1** in Aroclor 1254-vorbehandelten Rattenhepatozyten (ApRH) zeigten, dass **11** und **19** die Hauptmetaboliten waren. Dabei lag **11** teilweise und **19** nahezu vollständig konjugiert als Glucuronid oder als Sulfat vor. Neben nicht identifizierten Metaboliten wurden ferner die O-demethylierten Verbindungen **6 + 8** (vollständig konjugiert) sowie Diol **27** (teilweise konjugiert) detektiert. Die in mikrosomalen Inkubationen nachgewiesenen Verbindungen (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**), dessen Oxidationsprodukt (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) sowie Epoxid **15** und das Isomerisierungsprodukt von **19**, 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) konnten zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Das Fehlen dieser Metaboliten kann zunächst generell auf zwei Möglichkeiten zurückzuführen sein: 1. sie wurden schlichtweg nicht oder in nicht detektierbaren Kon-

zentrationen gebildet oder 2. sie reagierten als reaktive Metaboliten schnell mit Zellbestandteilen z. B. Glutathion, Proteinen oder DNA. In mikrosomalen Inkubationen war Epoxid **15** nur mit Supersomes<sup>TM</sup> und in lebermikrosomalen Inkubationen nur mit RLM quantifizierbar.

Es ist davon auszugehen, dass die Epoxidhydrolaseaktivität in ApRH höher ist als in (Leber)-Mikrosomen, da hier, zusätzlich zu mikrosomalen Epoxidhydrolasen (mEH), auch lösliche Epoxidhydrolasen (sEH) zur EH-Aktivität beitragen können und ferner beide EHs durch Aroclor 1254 induziert werden. Deshalb ist die Abwesenheit von **15** in ApRH (als auch in ARLM im Vergleich zu RLM) nachvollziehbar. Das Fehlen von **20** ist höchstwahrscheinlich auf die im Vergleich zum mikrosomalen Zeitverlauf kürzere Inkubationsdauer zurückzuführen. Quantifizierbare Konzentrationen von **20** wurden auch in Inkubationen mit ARLM und BLM erst nach 24 h bzw. 17 h gebildet. Dass der Sekundärmetabolit **23** nicht detektierbar war, begründet sich zunächst zwanglos mit der Abwesenheit dessen Primärmetaboliten **12**. In mikrosomalen Inkubationen von RLM waren die Konzentrationen von **11** und **12** etwa gleich und machten je rund 8 % der Startkonzentration aus. In Inkubationen mit ARLM lag **12** nach einer Stunde mit 7,6 % und **11** mit 36 % der ME-Startkonzentration vor. Wie bereits diskutiert, bewirkte die Induktion mit Aroclor 1254 also in den mikrosomalen Inkubationen einen *shift* zu Gunsten der Bildung von **11** und zu Lasten von **12**. Man beobachtet ferner die Weiteroxidation von **12** zu **23**, während die Oxidation von **11** zu **22** kaum stattfand. Da die pRH in diesen Versuchen ebenfalls mit Aroclor 1254 vorbehandelt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier mehr **11** und weniger **12** gebildet wird, was jedoch nicht das vollständige Fehlen von **12** erklärt. Die Oxidation von **12** zu **23** bzw. **11** zu **22** ist in Mikrosomen wahrscheinlich hauptsächlich auf CYPs zurückzuführen, da z. B. alle bekannten Alkoholdehydrogenasen (ADH), welche diese Reaktion katalysieren können, zytosolische Enzyme sind, somit in Mikrosomen nicht vorkommen und weiterhin der benötigte Kofaktor (NAD<sup>+</sup>) nicht supplementiert wird. ApRH, haben hingegen eine hohe ADH-Aktivität. Tatsächlich konnten im Arbeitskreis durchgeführte Untersuchungen zur Oxidation von **11** und **12** durch Mikrosomen und Zytosol verschiedener Gewebe (Kercher, 2014, unveröffentlichte Ergebnisse; Cartus *et al.*, 2012) sowie durch ADHs verschiedener Spezies (Gerlach, 2014; Kercher, 2014) zeigen, dass die lebermikrosomale und ADH-katalysierte Oxidation von **12** zu **23** um einen Faktor von 10–100-fach schneller und effizienter erfolgte, als die Oxidation von **11** zu **22**. Dabei waren die Umsatzraten in mit NAD<sup>+</sup>-supplementierten Zytosolen oder ADHs jeweils um einen Faktor von bis zu 50-mal höher, als in Mikrosomen der gleichen Proteinkonzentration. Diese Ergebnisse legen eine bedeutende Beteiligung von ADHs für diese Reaktion *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* nahe. Somit wäre eine mögliche Hypothese für das Fehlen von **12** und **23** in ApRH, dass **12** zwar gebildet wurde, dieses aber ein besseres Substrat für CYPs und ADHs darstellt, als **11**. Entstandenes **23** könnte dann in ApRH z. B.

durch die Reaktion mit zellulären Nucleophilen, über GSTs oder andere Phase-II-Enzyme schnell weitermetabolisiert werden, so dass freies **12** und **23** nicht mehr detektierbar sind. Ferner stellt das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte **23** als weiches Elektrophil einen reaktiven Metaboliten dar, welcher auch spontan z. B. mit weichen Nucleophilen wie Thiolgruppen von Cysteinresten von Proteinen Michael-Addukte bilden könnte (Lopachin *et al.*, 2012). Für diese Hypothese sprechen z. B. die Ergebnisse zum Zeitverlauf der Inkubationen von HLM mit **1**, wo nach 24 h ein starker Abfall der Gesamtwiederfindung und insbesondere von **12** beobachtet wurde und gleichzeitig auch die Konzentration von **23** stark abnahm. Ein ähnliches Bild ergab sich bei RLM, bei denen ebenfalls die Gesamtwiederfindung nach 24 h sank, wobei hier die Konzentration von **12** nur wenig abnahm. Eine ausgeprägte nicht-enzymatische Reaktivität scheint jedoch, zumindest unter den Bedingungen rein mikrosomaler Inkubationen, wenig ausgeprägt zu sein, da z. B. in den Inkubationen mit CYP1A2-Supersomes<sup>TM</sup> hohe Konzentrationen **23** detektiert wurden. Proteinreaktivität kann einen Weg der Detoxifizierung darstellen, wenn die betreffenden Proteine schnell neusynthetisiert werden können, *per se* in hoher Konzentration vorliegen oder keine überlebenswichtigen Funktionen für die Zelle haben. Ist dem nicht so, kann Proteinreaktivität aber auch zur (Leber-)Toxizität beitragen. Proteinaddukte können z. B. zur Haptensierung führen oder gering konzentrierte funktionelle Proteine mit geringer Neusyntheserate betreffen (Li, 2002; Usui *et al.*, 2009). Nicht zwingend kann die Bildung von Proteinaddukten daher auch mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergehen. Die vergleichsweise geringen Zytotoxizitäten von **12** und **23** in pRH im Resazurinreduktionstest von  $EC_{50} = 1,4 \text{ mM}$  (**12**) und  $320 \text{ }\mu\text{M}$  (**23**) (s. Tabelle 29, Seite 160) unterstützen somit tendenziell die Hypothese der enzymatischen Sequestrierung von **12** über **23**. Gardner *et al.* (1996) detektierten Proteinaddukte in den Lebern von mit **1** behandelten Ratten. Die Autoren spekulierten, dass der Bildung von **11** dabei die wichtigste Rolle zukommt. Da in den eigenen Untersuchungen die Oxidation von **12** zu **23** deutlich ausgeprägter war, als die von **11** zu **22** (Cartus, 2009; Cartus *et al.*, 2012; Kercher, 2014, unveröffentlichte Ergebnisse; Gerlach, 2014) kann vermutet werden, dass **12** und **23** oder weitere reaktive Metaboliten ebenso einen Beitrag zur Proteinreaktivität leisten können, wahrscheinlich sogar zu einem bedeutend größeren Anteil als **11** und **22**. Insgesamt sind vielfältige Reaktionen denkbar, die zum biologischen Schicksal von **23** beitragen und entweder zu einer Detoxifizierung oder Aktivierung führen können. In Abbildung 128 ist eine Auswahl möglicher Reaktionswege aufgeführt. Ein Beleg, der diese Hypothese stützt ist der Befund von Groh (2014), wo gezeigt wurde, dass die Konzentration von **23** im Inkubationsüberstand von HT29-Zellen bereits nach einer Stunde stark absank und nach 24 Stunden kein **23** mehr detektierbar war, ohne dass nennenswerte Mengen bekannter Metaboliten detektierbar wurden.



andere Substrate, z. B. die weiteren Phase-I-Metaboliten oder weitere Metabolisierungsschritte (**12**, **23**, **15** und **27**, **6** und **8**). Somit wäre anzunehmen, dass in Inkubationen mit **11** als einzigem Substrat, eine bestimmte Reaktion zwar potent katalysiert würde, jedoch *in vitro*, z. B. in pRH bzw. *in vivo* nicht oder vermindert stattfindet, da die Affinität eines Enzymes zu einem anderen Substrat größer ist.

Die Autoren haben den Gesamtumsatz einer Dosis von 0,0034 mg/kg KG **1** *in vivo* in ihrem (humanen) PBBK-Modell berechnet (= 238 µg für eine 70 kg schwere Person, was der gleichen Dosis **1** in der Humanstudie von Schechter *et al.*, 2004, entspricht; PBBK = *physiologically based biokinetic*). Dabei wurde die Bildung von **11** aus **1** (aus HLM-Inkubationen) sowie Phase-II-Reaktionen (Bildung des 1'-O-Glucuronids von **11**, die Oxidation von **11** zu 1'-Oxomethyleugenol (**22**) und die Bildung des 1'-Sulfoxymethyleugenol) mit in die Berechnung einbezogen, wobei eine 100-%ige Bioverfügbarkeit von **1** vorausgesetzt wurde. Eine Weitermetabolisierung oder Ausscheidung dieser Metaboliten wurde nicht ins Modell implementiert, so dass die berechneten prozentualen Mengen der terminalen Metaboliten deren Gesamtbildung, bezogen auf die Dosis von **1**, wiedergeben.

Im Ergebnis wurden im Modell, 24 Stunden nach Gabe von **1**, sowohl **1**, als auch **11** komplett metabolisiert. Rund 7 % der Dosis von **1** wurden insgesamt zu **11** umgesetzt und dann weitermetabolisiert, wobei 0,48 % 1'-O-Glucuronid, 6,5 % **22** und 0,05 % 1'-Sulfoxymethyleugenol die Endprodukte von **11** darstellten. Die Bildung des Glucuronids und auch die Bildung von **22** wurden dabei von den Autoren als prinzipiell detoxifizierende Wege interpretiert. Mit dem gleichen Ansatz untersuchten die Autoren auch die Situation bei der Ratte. Trotz bestehender Speziesunterschiede wurde im Ergebnis für beide Spezies eine nahezu gleiche netto Aktivierung von **1** zu 1'-Sulfoxymethyleugenol berechnet und ferner eine lineare Beziehung zwischen der Dosis von **1** und der Bildung von 1'-Sulfoxymethyleugenol besteht. Es gibt also auch nach diesen Berechnungen keinen Anhaltspunkt für eine Grenz- oder Schwellendosis, unterhalb derer keine Aktivierung von **1** stattfindet. Die *virtual safe dose* (VSD) wurde zu 0,27 µg/kg KG/d bestimmt. Es ist dies diejenige Dosis, die in einem erwarteten zusätzlichen Krebsrisiko von eins zu einer Million über die gesamte Lebensspanne resultiert und mit der BMD<sub>10</sub> berechnet wurde (die BMD, *benchmark dose*, wiederum ist die berechnete Dosis, die im Tierversuch eine Erhöhung der Tumorinzidenzen um einen bestimmten Wert, hier 10 %, verglichen mit den Kontrollen bewirkt). Diese VSD entspräche somit einer Dosis von 18,9 µg **1** pro Tag für einen 70 kg schweren Erwachsenen, was wiederum ziemlich genau der Menge **1** entspricht, die in einem der Ingwerkekse aus der Humanstudie von Schechter *et al.* (2004) enthalten war. Die gleiche Dosis würde erreicht mit zwischen 3,6 g und 17,2 g der von Grosch *et al.* (2013) untersuchten in Deutschland gehandelten Basilikumzubereitungen (Pesto).

### 6.1.3 Metabolismus von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) in Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>

In den verschiedenen lebermikrosomalen Inkubationen mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) war stets (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**) der Hauptmetabolit. Daneben wurden als Minor-metaboliten (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) sowie die *O*-demethylierten Verbindungen Isoeugenol (**7**) und Isochavibetol (**9**) detektiert. Ebenfalls in geringen Konzentrationen wurden die beiden Seitenkettendiole **14a** (*threo*) und **14b** (*erythro*) nachgewiesen, wobei das durchschnittliche Verhältnis von **14a:14b** in allen Inkubationen 4:1 betrug. Hinweise auf detektierbare Mengen der korrespondierenden Epoxide **14c** gab es nicht. Eine weitere Hauptreaktion in ARLM stellte die Bildung von 6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) dar, welches im Zeitverlauf der Inkubation von ARLM mit **2** bereits nach 10 min in hoher Konzentration vorlag. Nach einer Stunde Inkubationsdauer wurde zusätzlich die Bildung von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) beobachtet.

Da die Bildung von **19** mit der Abnahme der Konzentration von **20** einherging, war eine Isomerisierungsreaktion von **20** zu **19** plausibel, wenngleich ungewöhnlich, da von einer Isomerisierung von Propenyl- zu Allylseitenkette bislang noch nicht berichtet wurde. Um dies näher zu untersuchen wurde **20** mit verschiedenen Lebermikrosomen inkubiert und es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion tatsächlich stattfindet. Prinzipiell besteht bei Bildung von allylischem **19** aus **2** die Möglichkeit, dass hier in geringer Konzentration ebenfalls reaktive 1'-Hydroxyderivate gebildet werden könnten, die durch Sulfotransferasen über den klassischen Weg allylischer PP wie Safrol oder Estragol aktiviert werden könnten. Diese Möglichkeit wurde bei der Untersuchung der Bildung von DNA-Addukten überprüft (vgl. Kapitel 6.1.4).

Die kinetischen Daten zeigten, dass die Bildung von **12** in allen untersuchten LM bei geringen Substratkonzentrationen die dominierende Reaktion ist, während mit steigender Substratkonzentration die Bildung der Dirole **14a** + **14b** zunimmt. Die Bildung der ringhydroxylierten Verbindungen **20** und **19** spielt nur in ARLM eine bedeutende Rolle. In HLM nimmt mit sinkender Substratkonzentration die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **7** und **9** zu.

An der Bildung der jeweiligen Metaboliten von **2** in HLM sind bei geringen Substratkonzentrationen verschiedene CYPs beteiligt. **12** wird hauptsächlich durch CYP2C19 und CYP2E1 gebildet, während dessen Oxidation zu **23** hauptsächlich durch CYP1A2 und CYP2C19 katalysiert wird. Die Bildung der Dirole **14a** + **14b** kann hauptsächlich CYP2E1 und CYP1A2, die *O*-Demethylierung CYP2A6 zugeschrieben werden. Erst bei hohen Konzentrationen gewinnt CYP1A2 für die letztgenannte Bildung der Phenole **7** und **9** an Bedeutung. **19** und **20** werden

bei geringen Substratkonzentrationen in HLM wahrscheinlich nicht gebildet, bei hohen Substratkonzentrationen sind CYP1A2 und CYP3A4 für deren Bildung verantwortlich. Interessant ist, dass bei CYP1A2 im Gegensatz zu lebermikrosomalen Inkubationen eine Spezifität bei der Bildung der Seitenkettendirole **14a** und **14b** beobachtet wurde. Während bei Inkubationen von **3** und **4** mit Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup> die beiden möglichen Diastereomerenpaare der Dirole (**39** und **40**) stets in einem fast konstanten Verhältnis von ca. 1:4 *erythro:threo* gebildet wurden, bildete CYP1A2 ausschließlich das *threo*-Isomer **14a**. Die Gründe hierfür sind unklar.

#### 6.1.4 Bildung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten durch Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) und deren Metaboliten

Schließlich wurde in Experimenten mit primären Rattenhepatozyten (pRH) die Bildung von DNA-Addukten nach Inkubation mit Methyleugenol (**1**), (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) oder deren Metaboliten untersucht. 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**) und **1** bildeten dabei mit Abstand die meisten DNA-Addukte, wobei eine deutlich höhere Reaktivität am Stickstoff in Position 2 von 2'-Desoxyguanosin (dG) im Vergleich zum Stickstoff in Position 6 von 2'-Desoxyadenosin (dA) beobachtet wurde. DNA-Addukte wurden auch nach Inkubation mit (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**) und (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**) detektiert, wobei die Adduktmengen, insbesondere in Hinblick auf die hohen Inkubationskonzentrationen, in beiden Fällen gering waren. Die anderen getesteten Metaboliten 6-Hydroxymethyleugenol (**19**), 1'-Oxomethyleugenol (**22**), Epoxid **15** sowie **2** bildeten keine DNA-Addukte. Das Verhältnis von dA- zu dG-Addukten betrug durchschnittlich ungefähr 1:50, sofern beide Addukte quantifizierbar waren. Ähnliche Verhältnisse wurden auch in anderen Untersuchungen z. B. bei der Inkubation von **1** und **11** in *Salmonella typhimurium* Strang TA100-hSULT1A1\*Y (welche die humane Sulfotransferase 1A1\*Y exprimieren; Herrmann *et al.*, 2012) sowie *in vivo* in humanen (Herrmann *et al.*, 2013) bzw. murinen (Herrmann *et al.*, 2014) Leberproben beobachtet. Die Ergebnisse in Hinblick auf die DNA-Reaktivität von **1** und **11** in pRH konnten in der Zwischenzeit auch *in vivo* bestätigt werden. So detektierten Herrmann *et al.* (2014) bei der Gabe einer Dosis von 280 µmol/kg Körpergewicht **1** (oral) oder **11** (*i. p.*) 735 *N*<sup>2</sup>-MIE-dG-Addukte pro 10<sup>8</sup> Nukleoside (dN) bzw. 1490 *N*<sup>2</sup>-MIE-dG-Addukte pro 10<sup>8</sup> dN nach sechs Stunden in den Lebern von Mäusen (FVB/N). In einem transgenen Konstrukt mit humaner Sulfotransferase 1A1/2 wurden im gleichen Stamm und bei der gleichen Dosis 4.500 bzw. 13.300 Addukte (pro 10<sup>8</sup> dN) nachgewiesen.

Luo und Guenther (1996) zeigten, dass die Reaktion von allylischen 2',3'-Epoxiden (von Allylbenzol, Safrol und Estragol) mit isolierter DNA *in vitro* zur Bildung von DNA-Addukten mit allen vier DNA-Basen führte, wobei auch dort der Anteil der dG-Addukte am höchsten war. Die Zugabe von Epoxidhydrolasen konnte die Bildung von DNA-Addukten potent verhindern. An isoliert perfundierten Rattenlebern, die *ex vivo* mit diesen Seitenkettenepoxiden perfundiert wurden, konnten jedoch weder DNA-Addukte, noch eine Erhöhung der Marker für akute Lebertoxizität (ALAT-Aktivität im Perfundat) detektiert werden (Luo und Guenther, 1995). Die Autoren konnten ferner zeigen, dass die Detoxifizierung der Epoxide zu etwa gleichen Teilen über Glutathion-S-Transferasen (GST) und Epoxidhydrolasen (EH) erfolgte (Luo und Guenther, 1994). Daher ist es nachvollziehbar, dass auch **15** in einem EH-exprimierenden Zellsystem wie pRH keine DNA-Addukte bildet. Es muss jedoch beachtet werden, dass sowohl in den eigenen Untersuchungen mit pRH, als auch in den Untersuchungen von Luo und Guenther (1995), die reaktiven Metaboliten nicht *in situ* in den Zellen gebildet werden, sondern dem Zellkulturmedium bzw. der Perfusionslösung zugegeben wurden, was natürlich nicht gleichbedeutend mit der Aufnahme in die Zellen ist. Auch wenn **15** somit keine DNA-Addukte bildete, zeigten Groh *et al.* (2012), dass sowohl Epoxid **15** als auch Aldehyd **23** konzentrationsabhängig (10 bzw. 25–100 µM) DNA-Strangbrüche (Comet-Assay) nach 24 h in V79-Zellen induzierten. Diese Zellen (Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters) besitzen zwar eine basale Epoxidhydrolaseaktivität (Bellucci *et al.*, 1984), jedoch ist diese im Vergleich zu anderen Zellsystemen gering (Herrero *et al.*, 1997). Ferner erhöhte **15** (100 µM) die Mikrokernrate und die Mutationsfrequenz im HPRT-Assay in V79-Zellen (Groh *et al.*, 2012). Gegen eine gentoxische Wirkung von **1** durch Bildung von DNA-Addukten mit **15** sprechen auch die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Glatt (Nuthetal) erhaltenen Ergebnisse mit *SULT1a1-knockout*-Mäusen (Herrmann *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass diese Tiere potent in der Lage sind **15** zu bilden und zwar im gleichen Ausmaß wie der Wildtyp. Nach Behandlung mit **1** in der höchsten untersuchten Dosis (280 µmol/kg KG, oral) konnten im Wildtyp 735 ± 342 dG-Addukte pro 10<sup>8</sup> dN detektiert werden, während in den Lebern der *knockout* Tiere nur 23 ± 2 dG-Addukte pro 10<sup>8</sup> dN (= 3 %) detektierbar waren. Somit ist **15** zwar potentiell als DNA-reaktiv zu bewerten, wird aber wahrscheinlich *in vivo* effizient durch die schnelle Hydrolyse durch EHs und/oder schnelle Reaktion mit GSTs detoxifiziert.

Die prinzipielle Fähigkeit von **12** und **23** zur Bildung von DNA-Addukten wurde in den eigenen Experimenten mit pRH gezeigt. Herrmann *et al.* (2012) zeigten, dass **12** im Ames-Test an verschiedenen humane Sulfotransferase exprimierenden *Salmonella typhimurium* Stämmen eine Mutagenität vergleichbar oder höher zu **11** aufwies. Überdies bildete **12** in



diesen Experimenten gleich viele bzw. sogar mehr DNA-Addukte als **11**. Ähnlich Ergebnisse erhielten Boberg *et al.* (1986), die eine ähnliche DNA-Reaktivität von 1'-Sulfoxysafrol und 3'-Sulfoxyisofafrol und eine vergleichbare Rate für die Sulfonierung von 1'-Hydroxysafrol und 3'-Hydroxyisofafrol *in vitro* beobachteten. Vor diesem Hintergrund ist die geringe Menge detektierter DNA-Addukte nach Inkubation von pRH mit **12** erstaunlich. Da beide Metaboliten in Aroclor 1254-vorbehandelten pRH (ApRH) nach Inkubation mit **1** nicht detektierbar waren, muss diese prinzipielle Fähigkeit von **12** und **23** DNA-Addukte zu bilden, kritisch betrachtet werden. Auf mögliche Gründe für das Fehlen von **12** und **23** in Inkubationen von ApRH mit **1**, und somit wahrscheinlich auch in Inkubationen mit **2**, wurde bereits in Kapitel 6.1.2 eingegangen. So wird **12** möglicherweise *in vivo* schnell zu **23** oder weiteren Zimtsäurederivaten oxidiert (Solheim und Scheline, 1976; vgl. Boberg *et al.*, 1986), was wahrscheinlich auf mikrosomale Enzyme und vor allem ADHs und ALDHs zurückzuführen ist. Die Zimtsäurederivate sind *per se* weniger reaktiv und auch die potentielle Vorstufe **23**, könnte direkt, z. B. über GSTs sequestriert werden. Diese Hypothese würde die hohe Aktivität von **12** im Ames-Test erklären, da diesem Testsystem der von ADHs benötigte Kofaktor NAD<sup>+</sup> nicht supplementiert wird und **12** für bakterielle ADHs möglicherweise ein schlechtes Substrat darstellt. Dies könnte so zu falsch positiven Ergebnissen im Ames-Test führen. Ferner würde diese Hypothese das Fehlen von **12** und **23** in Inkubationen von ApRH mit **1** und die geringen Mengen an DNA-Addukten in diesen Inkubationen erklären.

Diese Ergebnisse konnten zwischenzeitlich auch *in vivo* bestätigt werden. Herrmann *et al.* (2014) detektierten nach Gabe von **12** (je 280 µmol/kg KG, *i. p.*) nach sechs Stunden lediglich 17 dG-Addukte (pro 10<sup>8</sup> dN). Dies sind 730-fach bzw. 200-fach geringere Mengen als nach Gabe der äquivalenten Dosis **11** bzw. **1** im gleichen Versuch detektiert werden konnten. Auch **2** (280 µmol/kg KG, oral) bildete nach sechs Stunden in Mäusen nur 30 Addukte mit dG und 0,7 mit dA pro 10<sup>8</sup> Nucleoside. Diese Adduktlevel entsprechen der 413-fach bzw. 125-fach geringeren Menge, die nach Gabe von **11** bzw. **1** bei der gleichen Dosis erhalten wurden. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung damit, dass **2** allgemein als nicht-gentoxisch betrachtet wird (Hasheminejad und Caldwell, 1994).

Es bleibt die Frage, wieso bei der Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit **12** nur nach zwei, nicht aber nach zwölf Stunden DNA-Addukte nachweisbar waren. Eine Erklärung ist, dass die gebildeten, wenigen Addukte repariert wurden, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ding *et al.* (2011) steht, die eine verminderte Expression einer Reihe von an der DNA-Reparatur beteiligten Genen nach oraler Gabe von **1** *in vivo* (F344-Ratte, m) nachwiesen (vgl. Kap. 3.4.1.5). **23** induzierte konzentrationsabhängig (25–100 µM) DNA-Strangbrüche (Comet-Assay), erhöhte signifikant die Mutationsfrequenz (ab 50 µM) in V79-Zellen im HPRT-Assay jeweils nach 24 h, nicht jedoch nach 1 h (Groh *et al.*, 2012). Weiterhin hemmte

**23** in HT29-Zellen (humane Kolonkarzinomzelllinie) signifikant die Aktivität der Histondeacetylase 1 (HDAC1), erhöhte die Expression von  $\gamma$ H2AX (100  $\mu$ M) und erwies sich bereits ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M als katalytischer Inhibitor humaner Topoisomerase I (Groh *et al.*, 2013; Groh, 2014). Die erhöhte  $\gamma$ H2AX-Expression ist ein Beleg dafür, dass zumindest ein Teil der im Comet-Assay beobachteten DNA-Strangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche darstellen. Weiterhin konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass **23** (100  $\mu$ M; HT29) die ATM/ATR-Signalkaskade (ATM: *ataxia telangiectasia mutated protein*; ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) aktiviert. Während eine Erhöhung der Phosphorylierungsstatus von ATM und ATR nach zweistündiger Inkubation, nicht jedoch nach 24 h Inkubationsdauer beobachtet wurde, waren spätere Zielenzyme innerhalb dieses Signalweges, wie p53 oder CHK1 auch nach 24 h aktiviert (Groh, 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass **23** ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M zu einem Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase führte (Rudakovski, 2013). Herrmann *et al.* (2014) untersuchten den Zeitverlauf der DNA-Adduktlevel nach oraler Gabe von **1** und intraperitonealer Gabe von **11** (jeweils 280  $\mu$ mol/kg KG) im Zeitraum zwischen 0,75–24 Stunden (0,75; 1,5; 3; 6; 12; 24 h) an männlichen Mäusen. Dabei wurden die höchsten Adduktlevel nach sechs (**1**; 5.120 dG-Addukte/10<sup>8</sup> dN) bzw. drei Stunden (**11**; 9.130 dG-Addukte/10<sup>8</sup> dN) erreicht und fielen nach 24 Stunden lediglich auf 96 % bzw. 88 % des Maximalwertes ab. Auch wenn somit DNA-Reparatur *in vivo* in den untersuchten Zeitintervallen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, könnte der Beitrag der DNA-Reparatur bei den geringen Adduktleveln, die bei der Inkubation von **12** mit prH detektiert wurden, ausgeprägter sein. Somit könnte die DNA-Schadensantwort, die Einleitung von Reparaturprozessen oder die Einleitung der Apoptose, zumindest im Falle weniger DNA-Addukte, eine mögliche Erklärung dafür darstellen, dass in den Inkubationen von **12** mit prH nur nach zwei, nicht aber nach zwölf Stunden DNA-Addukte nachweisbar waren. Aufgrund des experimentellen Vorgehens, bei dem vor der Zellernte der Zellrasen gewaschen wird, wurden tote Zellen und damit die evtl. gebildeten DNA-Addukte entfernt und sind somit nicht mehr detektierbar.

Neue Brisanz erfährt das Thema durch die Untersuchungen von Herrmann *et al.*, (2013). Die Autoren untersuchten 30 humane Leberbiopsieproben und wiesen in 29 Methyleugenol-DNA-Addukte nach. Der Median bzw. Maximalwert der detektierten Addukte lag bei 13 bzw. 37 pro 10<sup>8</sup> dN. Diese Adduktlevel liegen nahe an denen, die man für bekannte Hepatokarzinogene im Bereich des TD<sub>50</sub> beobachtet (TD<sub>50</sub>: die Dosis, bei welcher die Lebertumorinzidenz in einer Langzeit-Nagetierstudie 50 % beträgt. Auerbach *et al.*, 2010, berechneten den TD<sub>50</sub> für **1** bei der Ratte zu 21,1 mg/kg KG/d). Somit sind sowohl die Anzahl der positiven Proben als auch die individuelle Menge der DNA-Addukte erstaunlich hoch.

Die bislang vorgestellten Studien wurden jeweils mit Reinsubstanzen durchgeführt. Es muss natürlich beachtet werden, dass phenylpropenreiche Lebensmittel in einer komplexen Matrix vorkommen und andere in Lebensmitteln enthaltene Stoffe durchaus einen synergistischen oder protektiven Effekt ausüben können. In der Arbeitsgruppe von Prof. Rietjens, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Nevadensin, ein in Basilikum vorkommendes Flavonoid, ein nicht-kompetitiver Hemmstoff von Sulfotransferasen ist und potent die Bildung von DNA-Addukten mit Estragol bzw. Methyleugenol (**1**) inhibieren kann (Al-Subeihi *et al.*, 2013; Alhusainy *et al.*, 2010, 2012, 2013). Die Autoren ließen diesen inhibitorischen Faktor in ihr für **1** und weitere Phenylpropene (PP) entwickeltes PBBK-Modell einfließen und konnten zeigen, dass die berechneten MOE-Werte (*margin of exposure*) bei einer Koadministration von **1** mit Nevadensin deutlich ansteigen. Für weibliche Ratten ergaben sich folgende MOE-Werte 3500–5300 (nur **1**) bzw. 11.000–18.000 (**1** + Nevadensin) und für männliche Ratten 1100–2400 (nur **1**) bzw. 9200–10.000 (**1** + Nevadensin). Dieser Befund lässt zunächst auf ein vermindertes Risiko schließen. Aber auch dies ist ein binäres System und spiegelt nicht die tatsächlichen Verhältnisse komplexer Lebensmittel *in vivo* wieder. Es ist ungewiss, welche Effekte die unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten und die unterschiedlichen Resorptionsorte der „protektiven“ als auch der Protoxine sowie deren Phase-II-Metabolismus oder der Metabolismus der mikrobiellen Darmflora auf die Gesamtaktivierung von **1** oder Estragol haben.

### 6.1.5 Schlussfolgerungen Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**)

Abschließend lassen die gewonnenen Daten den Schluss zu, dass das genotoxische, proximale Kanzerogen von Methyleugenol (**1**), 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**), in allen untersuchten Lebermikrosomen (LM), also auch in humanen LM (HLM) und in (Aroclor 1254-vorbehandelten) primären Rattenhepatozyten gebildet wird. Die kinetischen Daten aus Inkubationen von LM tierischen und humanen Ursprungs sowie Supersomes<sup>TM</sup> mit **1** belegen ferner, dass die Bildung von **11** auch im Falle geringer, humanrelevanter Konzentrationen von **1** stattfinden kann und diese Reaktion in HLM zum überwiegenden Teil durch CYP1A2 und nur zu geringen Anteilen von CYP2C19, CYP2E1 und CYP3A4 katalysiert wird. Da die Sulfonierung über SULT generell als *high affinity, low capacity*-Enzym gilt, gibt es deshalb keinen Grund anzunehmen, dass die ultimale Aktivierung von **1** auch bei geringen Substratkonzentrationen ausbleibt, was auch in anderen Studien die Schlussfolgerung war (Al-Subeihi *et al.*, 2012). Da die CYP1A2-Aktivität *in vivo* zu einem großen Teil durch die Exposition mit Xenobiotika bestimmt wird, z. B. durch verschiedene Lebensmittelbestandteile, die Belastung mit PCBs oder Dioxinen oder durch den Konsum von Tabakrauch, scheinen diese Ernährungs- und Lebens-

gewohnheiten hingegen eine wichtige Rolle für die Aktivierung von **1** *in vivo* zu spielen.

Im Falle von (*E*)-Methylisoeugenol (**2**) könnte die hohe katalytische Effizienz der Reaktion von **2** zu **12** und weiter zu **23** und dessen potente Sequestrierung für die fehlenden oder geringen genotoxischen Effekte, die von **2** selbst oder dessen Metaboliten bekannt sind, verantwortlich sein, obgleich **12** prinzipiell ein ebenso gutes Substrat für SULTs darstellt wie **11**.

## 6.2 Metabolismus von Asaron-Isomeren in Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>

### 6.2.1 Identifizierung mikrosomaler Asaron-Metaboliten

#### 6.2.1.1 $\beta$ -Asaron (**4**)

Zur Identifizierung der Hauptmetaboliten von  $\beta$ -Asaron (**4**) wurde der Inkubationsüberstand der Inkubation von **4** mit ARLM mit Hilfe der präparativen HPLC getrennt und von den erhaltenen Fraktionen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren gemessen. Als Hauptmetaboliten von **4** konnten so <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch die Diole **39** (*threo*) und **40** (*erythro*) identifiziert werden, welche in allen Inkubationen in einem ungefähren Verhältnis von 4:1 gebildet wurden. Zu geringeren Anteilen wurde das Gemisch der Seitenkettenalkohole **38**, **29** sowie **33** identifiziert, welche bei  $t_R \approx 18,5$  min koeluierten. Deren relative Konzentrationen wurden <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch zu 70 % **38**, 18 % **29** und 12 % **33** bestimmt. Eine exakte Quantifizierung des ternären Gemisches in weiteren Inkubationen gelang aufgrund fehlender selektiver Absorptionswellenlängen der drei Verbindungen zueinander nicht (vgl. Kap. 5.3.2), weshalb die Quantifizierung des Gemisches mit einem kombinierten Extinktionsfaktor, der das o. a. Verhältnis berücksichtigt, vorgenommen wurde. Als Minormetaboliten konnte **34** zweifelsfrei nachgewiesen werden. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch konnte in geringeren Konzentrationen eine weitere Aldehydspezies detektiert werden, welche wahrscheinlich **38a** darstellt. Da alle drei Seitenkettenalkohole gebildet wurden, wurde zusätzlich das Ausmaß der mikrosomalen Oxidation der Seitenkettenalkohole untersucht, welches in folgender Reihenfolge zunahm: **29**  $\ll$  **38** < **33**. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Methyleugenol (**1**) und (*E*)-Methylisoeugenol (**2**), wonach der primäre Alkohol in 3'-Position (**12**) ebenfalls in weit höherem Ausmaß oxidiert wurde, als der sekundäre 1'-Alkohol **11**. Hier konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der *trans*-konfigurierte Alkohol **33** ein besseres Substrat für die mikrosomale Oxidation darstellt als der *cis*-konfigurierte Alkohol **38**.

Es gelang die Verbindungen **29**, **33**, **34**, **38**, **39** und **40** zu synthetisieren, so dass deren Identität durch Vergleich der physiko-chemischen Eigenschaften ( $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, UV/Vis-Spektrum, Massesignal, und Retentionszeit) weiter untermauert werden konnte. Weiterhin wurden im Inkubationsüberstand der Reaktion von ARLM mit **4**  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch zwei phenolische Verbindungen ( $\delta_{\text{OH}} = 8,98$  bzw.  $9,09$  ppm) mit jeweils zwei aromatischen Protonen ( $\delta_{\text{ArH}} = 6,74$  und  $6,37$  bzw.  $6,77$  und  $6,46$  ppm) detektiert, die Retentionszeiten von  $t_{\text{R}} = 23,1$  bzw.  $24,8$  min aufwiesen. Die Kopplungskonstanten der vermutlich zu diesen Signalen gehörenden H1'- und H2'-Protonen betragen  $^3J = 11,3$  bzw.  $11,1$  Hz, was für eine *cis*-konfigurierte Seitenkette spricht. Da diese Peaks ein propenylisches UV-Spektrum aufwiesen, wurden sie den *O*-demethylierten Verbindungen **46** und **47** zugeordnet, wobei eine explizite Zuordnung nicht mit Sicherheit getroffen werden konnte. Im Falle der Paare Eugenol (**6**) und Chavibetol (**8**) bzw. Isoeugenol (**7**) und Isochavibetol (**9**) eluiert die an Position 3 *O*-demethylierte Verbindung jeweils um rund  $\Delta t_{\text{R}} = 0,5$  min früher, weshalb die früher eluierende Verbindung mit  $t_{\text{R}} = 23,1$  min **47** und die später eluierende Verbindung mit  $t_{\text{R}} = 24,8$  min **48** darstellen könnte. Ohne  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Beweis wurde die Verbindung mit  $t_{\text{R}} = 20,7$  min der Verbindung **20a** zugeordnet. Im Vergleich zu **47** und **48** würde man für diese, an Position 6 *O*-demethylierte Verbindung, ein stärker entschirmtes phenolisches Proton mit einer chemischen Verschiebung im Bereich von  $\delta = 11\text{--}12$  ppm erwarten, weshalb es sich hierbei nach dem Ausschlussprinzip somit höchstwahrscheinlich nicht um **47** oder **48**, sondern um das *cis*-konfigurierte **20a** handelt. Die frühe Retentionszeit stützt diese Vermutung. Zum Vergleich: die ebenfalls an Position 6-*O*-demethylierten Verbindungen (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) und 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) eluieren mit einer Retentionszeit von  $t_{\text{R}} = 21,7$  min bzw.  $20,4$  min. Auch der Vergleich von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit  $\beta$ -Asaron (**4**) zeigt, dass die *cis*-konfigurierte Verbindung **4** um  $\Delta t_{\text{R}} = 1,4$  min früher eluiert als die *trans*-konfigurierte Verbindung **3**. Die Verbindungen **20** und das mutmaßliche **20a** weisen einen Retentionszeitunterschied von  $\Delta t_{\text{R}} = 1,0$  min auf, was als weiteres Indiz die Identität von **20a** bestärkt.

Der Peak bei  $t_{\text{R}} \approx 18,2$  min wurde ohne  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Beweis den Epoxiden **39a/40a** zugeordnet. Neben den physiko-chemischen Hinweisen gab es experimentelle und phänomenologische Indizien, die die Bildung der Epoxide unterstützen. Im Falle der Inkubationen von  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Supersomes<sup>TM</sup> bildete CYP3A4 als einziges untersuchtes CYP die Diole **39** und **40**. Gleichzeitig war CYP3A4 das einzige CYP, in dessen Inkubationsüberstand ebenfalls der Peak bei  $t_{\text{R}} = 18,2$  min nachgewiesen wurde. Weiterhin korrelierten die Flächen dieses Peaks in allen mikrosomalen Inkubationen, sowohl mit **3**, als auch mit **4**, jeweils mit der Summe der Konzentrationen der gebildeten Diole **39** und **40**, wobei die Konzentration des mutmaßlichen Epoxidpeaks unter basischen Bedingungen unter Zunahme der

Diol-Konzentrationen abnahm. In der Zwischenzeit (März 2014) gelang die Synthese der beiden Asaron-Epoxide **39a** und **40a** (Simone Stegmüller, unveröffentlichte Ergebnisse) nach der Methode von Kim *et al.*, (1999). Der Vergleich der physiko-chemischen Daten der synthetisierten Referenzverbindungen mit denen der mikrosomal gebildeten Verbindungen bei  $t_R = 18,2$  min bestätigten, dass es sich bei diesen Verbindungen tatsächlich um die vermuteten Epoxide handelt. Ob in den mikrosomalen Inkubationen mit **3** oder **4** jeweils Epoxid **39a**, **40a** oder beide gebildet wurden, konnte jedoch nicht geklärt werden. Eine Unterscheidung wäre NMR-spektroskopisch möglich, wobei dies, wahrscheinlich aufgrund der aufwändigen Aufarbeitungsschritte, nicht gelang. Bei einer *syn*-Epoxidierung würde man bei  $\beta$ -Asaron (**4**) als Substrat das (*Z*)-Epoxid **40a** erwarten. Tatsächlich gibt es viele Beispiele CYP-vermittelter mikrosomaler Epoxidierungen, die unter Retention der Konfiguration, also *syn*-selektiv ablaufen (Sono *et al.*, 1996). Dieser Befund legt einen konzertierten Reaktionsmechanismus der *O*-Insertion nahe. Allerdings gibt es auch Gegenbeispiele mit teilweiser oder quantitativer Inversion (Chiappe *et al.*, 2001), so dass heute ein mehrstufiger Mechanismus über radikalische Zwischenstufen allgemein akzeptiert ist. Dabei bildet sich intermediär an der Stelle der früheren Doppelbindung in der Seitenkette eine Einfachbindung. Die Selektivität, welches Isomer sich vorrangig bildet, wird dann durch die Halbwertszeit des Intermediates und der Rotationsbarriere um die neugeschaffene Einfachbindung der Radikalpezies bestimmt (Chiappe *et al.*, 1998). Somit wäre also auch denkbar, dass neben den beiden (*Z*)-Epoxid-Enantiomeren **40a** die (*E*)-konfigurierten enantiomeren Epoxide **39a** aus **4** gebildet werden. Unabhängig davon welches Epoxid bzw. welche Epoxide gebildet werden, liefern sowohl die chemische, als auch die enzymatische Hydrolyse von Epoxiden mit zwei Stereozentren oft ein Gemisch der vier verschiedenen möglichen enantiomeren Diastereomerenpaare (Chiappe *et al.*, 2000), so dass auch bei einer *syn*-selektiven Epoxidierung in diesem Falle alle vier Isomere gebildet werden können. Überdies gibt es Beispiele in denen die spontane Hydrolyse von *cis*- bzw. *trans*-Epoxid die beiden Diastereomere in einem festen Verhältnis liefert. Mohan *et al.* (2000) untersuchten die Hydrolyse (*E*)- und (*Z*)-Anethol-Epoxid und detektierten als Hydrolyseprodukte in beiden Fällen die *erythro*- und *threo*-Diole in einem konstanten Verhältnis von 1:4 (*erythro:threo*), also im gleichen Verhältnis wie auch die Diole **39** (*threo*) und **40** (*erythro*) in den Inkubationen von **4** oder **3**, oder die Diole **14a** (*threo*) und **14b** (*erythro*) in den Inkubationen mit (*E*)-Methylisoeugenol (**2**), detektiert wurden. Da, abgesehen von der chemischen Verschiebung, keine physiko-chemischen Unterschiede der Epoxide **39a** und **40a** resultierend aus Inkubationen mit **3** oder **4** festgestellt wurden, konnte somit nicht bestimmt werden, in welchem Schritt (Epoxidierung oder Hydrolyse) die stereoselektive Information in die Diole eingeführt wurde, bzw. ob die CYP-vermittelte Epoxidierung *syn*-selektiv verlief. Die Tatsache, dass selbst nach 17 Stunden Inkubationsdauer von  $\beta$ -

Asaron (**4**) mit verschiedenen Mikrosomen der Epoxidpeak immer noch in hohen Konzentrationen detektierbar war und auch die Nachbehandlung des Inkubationsüberstandes mit Natronlauge (Abbildung 84) den Epoxidpeak nicht vollständig verschwinden ließ, also keine vollständige Hydrolyse stattfand, lässt den Schluss zu, dass die gebildeten Epoxide eine relativ geringe chemische Reaktivität aufweisen und gleichzeitig schlechte Substrate für die mEHs darstellen. Im Gegensatz hierzu wurde das terminale, chemisch recht hydrolysestabile, ME-Epoxid (**15**) selbst in sehr hohen Inkubationskonzentrationen, enzymatisch binnen weniger Minuten quantitativ durch ARLM zum Diol **27** hydrolysiert. Es gibt viele Beispiele diverser Epoxide, die keine oder schlechte Substrate für mikrosomale und/oder zytosolische Epoxidhydrolasen darstellen (Chiappe *et al.*, 2000; Mumby und Hammock, 1979). Ein bekanntes, toxikologisch relevantes Beispiel ist *anti*-Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid. Eventuell ist die geringe Reaktivität von **39a** und **40a** auf eine intramolekulare Stabilisierung dieser Asaronepoxide, z. B. über eine Wechselwirkung zwischen einem Proton der Methoxygruppe in *ortho*-Position (Position 6) und dem Epoxidsauerstoff, zurückzuführen. Schließlich bildete **4** einen bislang nicht identifizierten Metaboliten **U1** bei einer Retentionszeit von  $t_R \approx 19,2$  min, der auch in Inkubationen mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) detektierbar war.

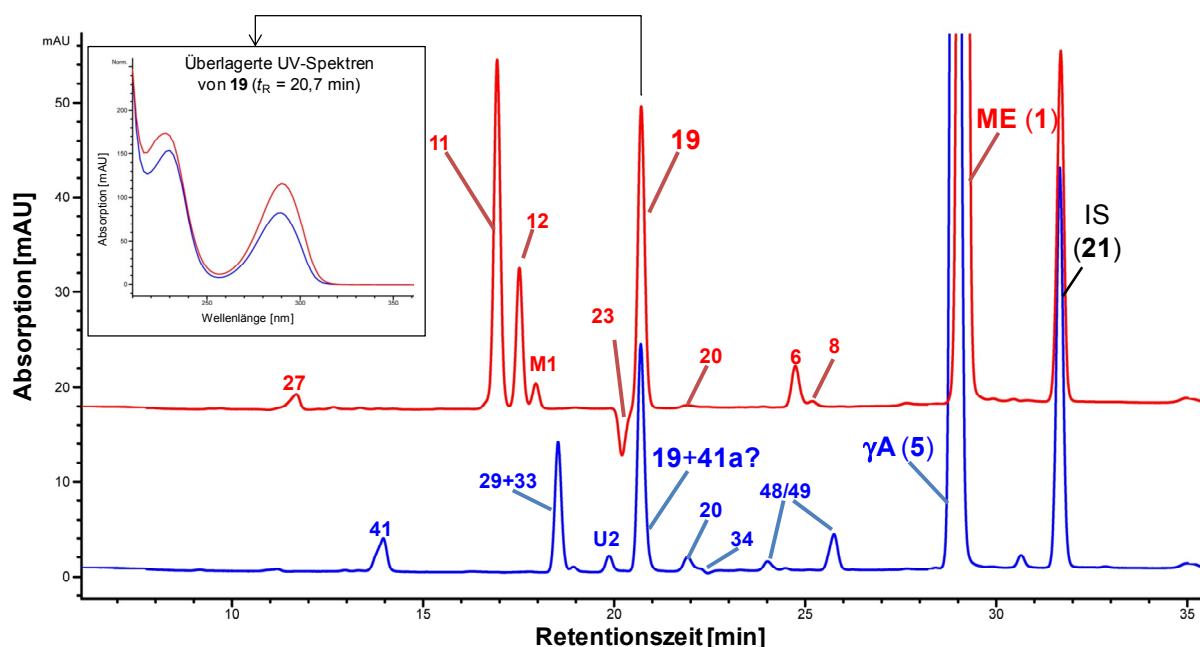
#### 6.2.1.2 $\alpha$ -Asaron (**3**)

Als Hauptmetaboliten von  $\alpha$ -Asaron (**3**) konnten ebenfalls die Diole **39** (*threo*) und **40** (*erythro*), die Epoxide **39a/40a**, Seitenkettenalkohol **33** und Aldehyd **34** identifiziert werden. Der Peak mit einer Retentionszeit von  $t_R = 21,7$  min wurde (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**) zugeordnet. Zwei weitere Peaks mit Retentionszeiten von  $t_R = 24,9$  und  $26,4$  min wurden ohne explizite Zuordnung als die *O*-demethylierten Verbindungen **44** und **45** charakterisiert.

#### 6.2.1.3 $\gamma$ -Asaron (**5**)

Die Hauptmetaboliten von  $\gamma$ -Asaron (**5**) in mikrosomalen Inkubationen stellen die mit  $t_R = 18,5$  min koeluiierenden Seitenkettenalkohole **29** und **33**, deren separate Quantifizierung durch Ausnutzung des isosbestischen Punktes des Gemisches nach der Methode in Kap. 5.3.2 gelang. Weitere Metaboliten waren das Seitenkettendiol **41**, Aldehyd **34**. Der Peak mit einer Retentionszeit von  $t_R = 20,7$  min wurde der *O*-demethylierten Verbindung 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) zugeordnet. Für die genannten Metaboliten konnten Referenzsubstanzen synthetisiert werden, deren physiko-chemischen Daten übereinstimmen. Zwei weitere Verbindungen mit Retentionszeiten von  $t_R = 24,0$  und  $25,6$  min wurden als die *O*-demethylierten Verbindungen **48** bzw. **49** charakterisiert. Physiko-chemische Hinweise auf die Bildung von  $\gamma$ -Asaronepoxid (**41a**) gab es zunächst nicht. Anhand der Zeitverläufe der Metabolitenbildung in Inkubationen von RLM mit **5** (Abbildung 116, Seite 209) könnte man annehmen, dass es

sich bei dem als **19** charakterisierten Peak tatsächlich um  $\gamma$ -Asaronepoxid (**41a**) oder um ein koelulierendes Gemisch von **19** und **41a** handelt, da die Gesamtkonzentration dieses Peaks erst stark ansteigt und dann zugunsten des Diols **41** abfällt. Dafür spricht, dass RLM auch bei der anderen untersuchten Verbindung mit allylischer Seitenkette, Methyleugenol (**1**), die einzigen Mikrosomen waren, bei denen das entsprechende Epoxid (**15**) detektierbar war. Die massenspektroskopische Untersuchung dieses Peaks beschränkte sich auf die Inkubationsüberstände der Reaktionen von ARLM sowie HLM mit **5**, weshalb die Charakterisierung dieses Peaks in RLM, bzw. eine Unterscheidung zwischen **19** und **41a** nicht getroffen werden konnte. Für die etwaige Bildung von **41a** in ARLM bzw. HLM gab es jedoch keine massenspektrometrischen Hinweise. Die Retentionszeit von  $t_R = 20,7$  min ist mit der Struktur von **41a** vereinbar: Der Vergleich der Unterschiede der Retentionszeiten verschiedener allylischer Verbindungen, die sich nur durch das Vorhandensein der Methoxyfunktion in Position 6 unterscheiden und in einem ähnlichen Retentionsbereich eluieren (**11** und **29**; **22** und **30**; **12** und **33**; **23** und **34**), zeigt, dass die Verbindungen mit drei Methoxyfunktionen (in Position 3, 4, und 6) zwischen  $\Delta t_R = 0,8$ – $2,6$  min später eluieren als die Verbindungen mit nur zwei Methoxyfunktionen in den Positionen 3 und 4. Methyleugenol-2',3'-epoxid (**15**) eluiert bei  $t_R = 18,8$  min. Somit wäre für **41a** eine Retentionszeit im Bereich von  $t_R = 19,6$  und  $21,4$  min wahrscheinlich. In Abbildung 129 sind die HPLC-UV-Chromatogramme der Überstände der Inkubationen von RLM mit **5** sowie ARLM mit Methyleugenol (**1**) überlagert dargestellt.



**Abbildung 129.** Überlagerte HPLC-UV-Chromatogramme der Überstände der Inkubationen von nicht-induzierten Rattenlebermikrosomen (RLM) mit  $\gamma$ -Asaron (**5**) (blau) sowie Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM) mit Methyleugenol (**1**) (rot). Inkubationszeitpunkt je 20 min; Substratstartkonzentration je  $800 \mu\text{M}$ . Das Insert oben links zeigt die überlagerten UV-Spektren beider Inkubationen (gleiches Farbschema) bei einer Retentionszeit von je  $20,7$  min.



Das Insert oben links zeigt die überlagerten UV-Spektren beider Inkubationen bei einer Retentionszeit von je  $t_R = 20,7$  min. Der Peak mit der Retentionszeit von  $t_R = 20,7$  min in der Inkubation von ARLM mit **1** konnte zweifelsfrei  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch 6-Hydroxymethyleugenol (**19**) zugeordnet werden. Wie zu erkennen ist unterscheiden sich die beiden Peaks weder in ihrer Retentionszeit, noch den von den Verbindungen erzeugten UV/Vis-Spektren. Allerdings ist die Kongruenz der UV/Vis-Spektren in diesem Fall unspezifisch und weder ein Indiz für, noch gegen die gleichzeitige Bildung von **19** bzw. **41a** in der Inkubation von RLM mit **5**, da für beide Verbindungen ein ähnliches UV/Vis-Spektrum zu erwarten ist (vgl. Kap. 5.3.1). Abschließend ist es phänomenologisch sehr wahrscheinlich, dass der Peak mit  $t_R = 20,7$  min in den mikrosomalen Inkubationen mit **5**, zumindest aber in den Inkubationen von RLM mit **5**, tatsächlich ein Gemisch der koeluerierenden Verbindungen **19** und **41a** darstellt, auch wenn es hierfür keine weiteren Hinweise gibt.

## 6.2.2 Metabolismus von $\beta$ -Asaron (**4**) und $\alpha$ -Asaron (**3**) durch Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>

Die zeitabhängige Verfolgung der Metabolitenbildung nach Inkubation verschiedener Lebermikrosomen (LM) mit **4** zeigte nur geringe qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen LM. Quantitativ war der Umsatz von **4** zu detektierbaren Metaboliten, wie auch bei den Inkubationen mit **1** und **2**, in ARLM am aktivsten, während RLM die geringsten Metabolitenkonzentrationen generierten. BLM, HLM und SLM lagen in der Reihenfolge dazwischen. Vergleicht man ARLM mit RLM, so bewirkte die Induktion mit Aroclor 1254 bei längeren Inkubationszeiten eine Steigerung der Umsatzrate insbesondere zu Gunsten der Diole **39** und **40**. Die detektierten Mengen bzw. Konzentrationen der Epoxide **39a/40a** bei den Inkubationen von LM mit **4** waren im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Substanzen (**1**, **2** und **5**) und insbesondere im Vergleich zu Inkubationen mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) mit Abstand am höchsten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten diesen Befund zu erklären. Zum einen könnte in den Inkubationen mit **4** bevorzugt das *cis*-konfigurierte Epoxid **40a** und bei **3** bevorzugt das *trans*-Isomer **39a** gebildet worden sein. Wie bereits erwähnt, ist es denkbar, dass **40a** ein schlechteres Substrat für die mEH darstellt bzw. chemisch hydrolysestabiler ist als **39a**. Auch in der Literatur gibt es mehrere Beispiele dafür, dass *cis*-Epoxide chemisch weniger reaktiv bzw. enzymatisch hydrolysestabiler sind als *trans*-Epoxide (Mohan *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2005; Pinot *et al.*, 1997), wohingegen der umgekehrte Fall selten zu sein scheint (Watabe *et al.*, 1971). Zum anderen könnte aufgrund der vermehrten Bildung der Epoxide in Inkubationen mit **4** eine schnellere Sättigung der mEH erreicht werden, als in Inkubationen mit **3**. In Tabelle 42 sind die kinetischen Parameter für

die Bildung der Epoxide **39a/40a** sowie Diole **39** und **40** in Inkubationen von ARLM, RLM und HLM mit **3** bzw. **4** zusammengefasst. In Inkubationen von ARLM mit **4** war die maximale Bildungsgeschwindigkeit der Epoxide rund 8,5-mal und die der Diole rund 2,5-mal größer als in Inkubationen mit **3**. Die Michaelis-Menten-Konstante für die Bildung der Epoxide unterscheidet sich in beiden Fällen nur wenig, war jedoch für die Bildung der Diole im Falle von **3** rund halb so groß wie bei **4**. Dies könnte man somit als eine höhere Affinität zu dieser Reaktion bzw. zu den Epoxiden bei Inkubationen mit **3** interpretieren. In der Summe war die katalytische Effizienz für die Bildung der Diole für **3** und **4** fast gleich, während die katalytische Effizienz für die Bildung der Epoxide im Falle von **4** rund zehnmal größer ist. Diese kinetischen Daten legen den Schluss nahe, dass der Gesamtumsatz zum Diol und somit auch die postulierte Gesamtbildung zu den entsprechenden Epoxiden bei geringen Substratkonzentrationen ungefähr gleich ist, das von **3** gebildete Epoxid aber ein besseres Substrat für mikrosomale EHs darstellt als das von **4** gebildete Epoxid. Mechanistisch weißt dieser Befund darauf hin, dass in den Inkubationen von **4** tatsächlich das *cis*-konfigurierte Epoxid **40a** und in Inkubationen mit **3** das *trans*-konfigurierte Epoxid **39a** gebildet wurde.

**Tabelle 42.** Bildungskinetische Parameter der Epoxide **39a/40a** und Diole **39+40** bei der Inkubation von Aroclor 1254-induzierten Rattenlebermikrosomen (ARLM), Rattenlebermikrosomen (RLM) und humanen Lebermikrosomen (HLM) mit  $\alpha$ -Asaron (**3**) bzw.  $\beta$ -Asaron (**4**).

Substrat	Epoxide 39a/40a		Diole 39+40	
	3	4	3	4
<b>ARLM</b>				
$v_{\max}(\text{app})^1$	0,11	0,93	0,96	2,37
$K_M(\text{app})^2$	87,8	74,5	23,4	48,5
$E_{\text{cat}}(\text{app})^3$	1,29	12,4	41,2	48,9
<b>RLM</b>				
$v_{\max}(\text{app})^1$	0,09	1,61	1,27	4,13
$K_M(\text{app})^2$	288	210	408	163
$E_{\text{cat}}(\text{app})^3$	0,32	7,65	3,12	25,3
<b>HLM</b>				
$v_{\max}(\text{app})^1$	0,09	1,13	0,67	2,61
$K_M(\text{app})^2$	381	473	264	389
$E_{\text{cat}}(\text{app})^3$	0,23	2,39	2,52	6,71

<sup>1</sup> [nmol Produkt min<sup>-1</sup> (mg mikrosomales Protein)<sup>-1</sup>]; <sup>2</sup> [ $\mu$ M]; <sup>3</sup> [ $\mu$ l min<sup>-1</sup> (mg mikrosomales Protein)<sup>-1</sup>]

Aus den kinetischen Daten von RLM und HLM kann man im Prinzip die gleichen Schlussfolgerungen ziehen, jedoch wird der Gesamtumsatz zu Epoxiden und Diolen bei geringen Substratkonzentrationen im Falle von **4** in RLM rund achtmal- und in HLM rund 2,6-mal so hoch sein, wie in Inkubationen von **3**.

In HLM konnte keine Abhängigkeit der relativen Bildungsgeschwindigkeiten einzelner Metaboliten am Gesamtmetabolismus von der Substratkonzentration von **4** beobachtet werden. Es ist somit anzunehmen, dass über einen weiten Substratkonzentrationsbereich eine ähnliche Metabolitenverteilung vorherrscht. In HLM waren diese rund 50 % der Diole **39** + **40**, 20 % „freie“ Epoxide **39a/40a**, 20 % der Seitenkettenalkohole **29**, **33** und **38**, wobei **38** wahrscheinlich den Großteil ausmacht und 10 % *O*-demethylierter Metaboliten **20a/46/47**. Die mikrosomale Oxidation der Seitenkettenalkohole findet in HLM höchstwahrscheinlich nur in einem sehr geringen Umfang statt. In den Inkubationen von **4** mit den sechs untersuchten Supersomes<sup>TM</sup> lassen sich keine substanziellen Unterschiede bezüglich der Metabolitenprofile einzelner humaner CYPs verzeichnen. D. h. jedes der untersuchten CYPs war qualitativ in der Lage alle auch in LM beobachteten Reaktionen zu katalysieren. Quantitativ katalysierten CYP1A2, CYP3A4 und CYP2C19 ungefähr gleich potent die Bildung der Diole **39** und **40**, der Epoxide **39a/40a** sowie die Bildung der Seitenkettenalkohole **38/33/29**, während CYP2D6, CYP2E1 und CYP2A6 insbesondere bei kleinen Substratkonzentrationen deutlich weniger aktiv waren. Die Berechnung der Beiträge einzelner CYPs in HLM zeigte, dass bei geringen Substratkonzentrationen CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 hauptsächlich am Metabolismus von **4** beteiligt sind, wobei mit steigender Substratkonzentration die Beteiligung von CYP1A2 ab- und die von CYP3A4 zunimmt. Bei hohen Substratkonzentrationen scheint auch CYP2A6 an Bedeutung zu gewinnen.

Hauptmetaboliten von  $\alpha$ -Asaron (**3**) waren (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**) und die beiden Diole **39** und **40**, wobei **33** außer bei Schweinelebermikrosomen (SLM) in den höchsten Konzentrationen detektierbar war. Daneben wurden insbesondere nach längeren Inkubationszeiten und im Gegensatz zu den Inkubationen mit **4** teilweise sehr hohe Anteile (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) gebildet. Als Minormetaboliten wurden die *O*-demethylierten Verbindungen **20** und **44/45** detektiert. Die Epoxide **39a/40a** konnten im Vergleich zu den Inkubationen mit  $\beta$ -Asaron (**4**) jeweils nur in geringen Mengen detektiert werden. Im Gegensatz zu **4** konnte aus den Daten zur Bildungskinetik der Metaboliten von **3** eine klare Abhängigkeit von der Substratkonzentration abgeleitet werden. In HLM dominiert bei geringen Substratkonzentrationen die Bildung von **33**. Mit steigender Substratkonzentration nimmt die Bildung von **33** und **34** zugunsten der Bildung der Epoxide **39a/40a**, Diole **39** und **40** sowie der *O*-demethylierten Verbindungen **20** und **44/45** ab. Die Untersuchung des Metabolismus von **3** durch verschiedene Supersomes<sup>TM</sup> zeigte eine ausgesprochen hohe Selektivität der CYPs für die Bildung bestimmter Metaboliten. CYP1A2 war am umsatzstärksten und generierte aus **3** nur zwei Metaboliten; **33** und **34**. CYP3A4 war das einzige der untersuchten CYPs, welches im Stande war die Bildung der beiden Diole **39** + **40** und in geringerem Umfang die Bildung der

Epoxide **39a/40a** zu katalysieren. CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 katalysierten hauptsächlich die Bildung von **33**, während CYP2A6 in geringem Ausmaß die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **20**, **44** und **45** katalysierte. In HLM wird die Bildung von **33** bei geringen Substratkonzentrationen wahrscheinlich hauptsächlich von CYP219 katalysiert, wobei mit steigender Substratkonzentration der Beitrag von CYP1A2 zunimmt. Im Gegensatz dazu wird die Weiteroxidation von **33** zu **34** auch bei kleinen Substratkonzentrationen hauptsächlich durch CYP1A2 katalysiert. In Hinblick auf die Gesamtmetabolisierung sinkt mit steigender Substratkonzentration die Beteiligung von CYP2C19 und -3A4 und der Anteil von CYP1A2 nimmt zu.

Die bildungskinetischen Parameter der Metaboliten von **4** in LM und Supersomes<sup>TM</sup> zeigen, dass **4**, unter gleichen Inkubationsbedingungen, im Vergleich zu den anderen vier untersuchten Verbindungen am potentesten metabolisiert wurde, was in den höheren Bildungsgeschwindigkeiten und kleineren  $K_M$ -Werten der Hauptmetaboliten zum Ausdruck kommt.

### 6.2.3 Metabolismus von $\gamma$ -Asaron (**5**) durch Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>

$\gamma$ -Asaron (**5**) wurde im Vergleich zu  $\alpha$ - (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) in Lebermikrosomen (LM) unter gleichen Inkubationsbedingungen in geringerem Umfang metabolisiert. Als Hauptmetaboliten wurden in allen lebermikrosomalen Inkubationen **29** und Seitenkettendiol **41** detektiert. In ARLM, BLM und HLM überwiegte dabei die Konzentration von **29**, während bei den Inkubationen von **5** mit RLM und SLM die Bildung des Seitenkettendiols **41** dominierte. In geringerem Umfang wurde die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** und von Aldehyd **34** beobachtet, wobei **34** nicht in den Inkubationen mit SLM nachweisbar war. Im direkten Vergleich der lebermikrosomalen Inkubationen von  $\gamma$ -Asaron (**5**) und denen mit Methyleugenol (**1**), wurden bei **5** geringe Konzentrationen des 3'-Alkohols (**33**) detektiert. Einhergehend damit wurde ebenfalls eine geringere Bildung des korrespondierenden Aldehyds (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**) festgestellt. Auch im Falle von **5** wurde anhand der kinetischen Daten eine Abhängigkeit der Metabolitenverteilung von der Substratkonzentration beobachtet. So wurden in HLM die beiden Seitenkettenalkohole **29** und **33** bei geringen Substratkonzentrationen vermehrt gebildet, während die Bildung der *O*-demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** mit steigender Substratkonzentration zunahm. In Zahlen zeigen die bildungskinetischen Daten, dass in HLM wahrscheinlich bei geringen Substratkonzentrationen die Bildung von **29** (57 %) und **33** (21 %) dominiert, während die Bildung von Diol **41** (10 %) und der *O*-demethylierten Verbindungen **19** + **48/49** (zusammen 12 %) eine eher unterge-

ordnete Rolle zu spielen scheint. Die mikrosomale Bildung von **34** findet bei geringen Substratkonzentrationen wahrscheinlich nicht, oder in einem sehr geringen Umfang statt. An der Bildung von **29** und **33** sind in HLM wahrscheinlich hauptsächlich CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 beteiligt. Die Reaktion von **33** zu Aldehyd **34** wird, sollte diese Reaktion stattfinden, in HLM wahrscheinlich zum Großteil von CYP1A2 katalysiert. Für die Bildung von Diol **41** zeichnen CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 verantwortlich, während die O-Demethylierung von allen untersuchten CYPs, aber vorrangig von CYP2A6 katalysiert wird. Die geringe Prädiktion der Bildung von **29** und **41** im RAF-Modell lässt darauf schließen, dass diese Reaktionen in HLM von weiteren als den sechs untersuchten CYPs katalysiert werden. Wie bereits in Kap. 6.2.1.3 (Seite 247) angesprochen wurde, muss beachtet werden, dass es sich bei dem als **19** charakterisierten Peak eventuell um eine Koelution von **19** und Epoxid **41a** handelt.

#### 6.2.4 Schlussfolgerungen zum Metabolismus von Asaron-Isomeren

$\alpha$ -Asaron (**3**) und  $\beta$ -Asaron (**4**) bildeten Lebertumoren nach einmaliger und wiederholter intraperitonealer Gabe im Tierversuch bei männlichen Mäusen, wobei die Gabe von Pentachlorphenol keinen Einfluss auf die Inzidenzen der Hepatome hatte (Wiseman *et al.*, 1987). Die veröffentlichten Ergebnisse im Ames-Test sind uneinheitlich. Jedoch gibt es Berichte über mutagene Effekte von **3** und **4** in *Salmonella typhimurium* Stamm TA 100 nur bei metabolischer Aktivierung. Im Arbeitskreis Schrenk wurden alle drei Asaron-Isomere im Standard-Ames-Test und im Ames-Fluktuationstest untersucht. Dabei wurden mutagene Effekte für **3** und **4** an *S. typhimurium* TA 100 nur mit metabolischer Aktivierung detektiert.  $\gamma$ -Asaron (**5**) zeigte keine mutagenen Effekte (Kerstin Berg, unveröffentlichte Ergebnisse; Wahl, 2014). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Koinkubation primärer Rattenhepatozyten (pRH) mit **3** und Cimetidin, einem unspezifischen CYP-Inhibitor, die Rate der unplanmäßigen DNA-Synthese (UDS) signifikant reduzierte (Hasheminejad und Caldwell, 1994). Die Autoren zeigten ebenfalls, dass der Metabolismus von **3** in pRH konzentrationsabhängig durch Cimetidin inhibiert wurde (gemessen wurde die verbleibende Menge bzw. Konzentration **3**) und die UDS-Rate antiproportional mit dem Ausmaß dieser metabolischen Inhibition korrelierte. Der Befund, dass der Inhibitor fremdstoffmetabolisierender Sulfotransferasen (SULT), Pentachlorphenol (PCP), im Gegensatz zu Behandlungen mit Safrol oder Estragol, *in vivo* keinen Einfluss auf die Lebertumorinzidenzen hatte, legt den Schluss nahe, dass die Asarone **3** und **4** nicht über fremdstoffmetabolisierende SULT aktiviert werden. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass **3** und **4** nur mit metabolischer Aktivierung mutagen im Ames-Test waren und CYP-Inhibition die UDS-Rate von **3** verringerte, dass 1. der hepatische Metabo-

lismus für die Aktivierung der Substanzen verantwortlich ist und 2. die für die Aktivierung notwendigen Enzyme im S9-Mix und in pRH enthalten sind bzw. exprimiert werden. Das wiederum bedeutet, dass auch in lebermikrosomalen Inkubationen die Bildung des (oder der) für die gentoxischen Effekte verantwortlichen Metaboliten zu erwarten ist. Das heißt jedoch nicht zwangsläufig, dass diese proximalen oder ultimalen Metaboliten auch detektierbar sein müssen, da es sich z. B. um sehr reaktive Metaboliten handeln könnte, die sich durch eine schnelle Weiterreaktion, z. B. zu hydrophilen Metaboliten, einer Detektion entziehen.

Obgleich alle drei Asaron-Seitenkettenalkohole (**29**, **33**, **38**) mikrosomale Metaboliten von **3**, **4** oder **5** sind, scheinen diese nicht über einen SULT-vermittelten Weg aktiviert zu werden, zumindest nicht über fremdstoffmetabolisierende SULT, für die PCP einen Hemmstoff darstellt. Um dies weitergehend zu überprüfen wurde in einer Diplomarbeit (Bischoff, 2013) die Mutagenität der drei Asaron-Seitenkettenalkohole **29**, **33**, **38** im Fluktuations-Ames-Test in verschiedenen humane SULT-exprimierenden *S. typhimurium*-Stämmen (TA 100-hSULT1A1 und TA 100-hSULT1C1) und den Standardstämmen TA 97a, TA 98, TA 100 und TA 012 untersucht. Dabei wurden in keinem Fall mutagene Effekte beobachtet. Somit gibt es keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung fremdstoffmetabolisierender SULT bei der Aktivierung von Asaron-Seitenkettenalkoholen. Eine Beteiligung membrangebundener, „nicht-fremdstoffmetabolisierender“ SULT ist unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für  $\beta$ -Asaron (**4**) war der Epoxid-Diol-Weg die Hauptmetabolisierungsrouten. Die bildungskinetischen Parameter weisen darauf hin, dass 68–84 % der Konzentration von **4** in den untersuchten LM sowohl bei geringen, als auch hohen Substratkonzentrationen zu den Epoxiden **39a/40a** und Diolen **39 + 40** umgesetzt werden. Die einzige Ausnahme stellen SLM dar, wo bei geringen Substratkonzentrationen die O-Demethylierung überwiegt und nur 32 % der Konzentration von **4** über den Epoxid-Diol-Weg metabolisiert werden.

Im Gegensatz dazu war der dominierende Reaktionsweg von  $\alpha$ -Asaron (**3**) in allen untersuchten LM die Bildung des Seitenkettenalkohols **33** und dessen mikrosomale Oxidation zu **34**. Zwischen 41–90 % der Konzentration von **3** werden anhand der bildungskinetischen Parameter wahrscheinlich in den verschiedenen LM über diesen Weg metabolisiert. Eine Ausnahme sind auch in diesem Fall SLM, für die in geringen Substratkonzentrationen die O-Demethylierung überwiegt und nur 21 % der Konzentration von **3** über den Seitenkettenalkohol **33** metabolisiert werden. Dennoch ist der Epoxid-Diol-Weg auch für **3** ein bedeutender Reaktionsweg: Je nach Substratkonzentration von **3** werden 26–40 % in ARLM, BLM und SLM über diesen Weg metabolisiert. In RLM sind es 7–26 % und in HLM 12–19 %.

Geht man somit von einem gentoxischen Mechanismus der Kanzerogenese von **3** und **4** *in vivo* aus, ist es anhand der vorliegenden Daten zum mikrosomalen Metabolismus der Asaron-Isomere **3** und **4** wahrscheinlich, dass die Epoxide **39a/40a** – im Gegensatz zu den Seitenkettenalkoholen **29**, **33** und **38** – als ultimale Kanzerogene haupt- oder mitverantwortlich für die Aktivierung von **3** bzw. **4** sind. Epoxide stellen reaktive, elektrophile Metaboliten dar. Werden sie nicht schnell genug durch Epoxidhydrolasen abgefangen oder durch spontane Hydrolyse deaktiviert, können sie mit Zellbestandteilen, z. B. Proteinen, RNA oder DNA Addukte bilden. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[*a*]pyren, Aflatoxine, Styrol oder Acrylamid sind nur einige toxikologisch bedeutsame Beispiele für Verbindungen, die im Zuge des Fremdstoffmetabolismus durch CYP-katalysierte Epoxidierung zu ultimalen Kanzerogenen (*anti*-Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-oxid; Aflatoxin B<sub>1</sub>-8,9-epoxid; Styrol-oxid; Glycidamid) umgewandelt werden (vgl. z. B. Benford *et al.*, 2010; Moudgil *et al.*, 2013; Carlson, 2008; Klaunig, 2008).

Für diese Hypothese spricht, dass *trans*-Asaronepoxid (**39a**) direkt (ohne Zusatz von S9-Mix) mutagen im Standard-Ames-Test an den Stämmen TA 98, TA 100 und TA 1535 war und Hepatome *in vivo* (Mäuse; m; 0,125; 0,25 und 0,5 µmol/g KG; *i. p.*) erzeugte (Kim *et al.*, 1999). In der höchsten Dosisgruppe wurden bei 50 % der Tiere durchschnittlich 1,0 ± 1,5 Hepatome detektiert, wobei die Überlebensrate nur noch 33 % betrug, was zudem eine hohe akute Toxizität belegt. Die Autoren testeten ebenfalls *trans*-Anethol-Epoxid und beobachteten hierfür eine deutlich geringere Mutagenität im Ames-Test als für **39a**. *trans*-Anethol selbst war unter identischen Bedingungen nicht hepatokanzerogen, jedoch wurden auch in mit *trans*-Anethol-Epoxid behandelten Tieren Hepatome, allerdings in einem geringeren Ausmaß, detektiert (29 %; 0,3 ± 0,5 Hepatome/Tier; 100 % Überlebensrate). Da die Halbwertszeit von *trans*-Anethol-Epoxid ungefähr doppelt so hoch war, wie die von **39a**, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass *trans*-Anethol-Epoxid ein besseres Substrat für EHs ist als **39a** oder über andere Wege enzymatisch schneller detoxifiziert wurde.

In den chronischen Fütterungsstudien an Ratten (m und f, vgl. Kap. 3.3.3, Seite 49) mit **4**, indischem Kalmusöl (JOC, bestehend aus 76 % **4**, 3 % **3**) oder europäischem Kalmusöl (EOC, Zusammensetzung unbekannt, wahrscheinlich aber geringe Konzentrationen **3** und **4** als in JOC) konnten lediglich im Falle von EOC hepatozelluläre Karzinome und Adenome befundet werden, wengleich auch die Behandlung mit **4** und JOC re- und degenerative Leberveränderungen und -schäden verursachte (Taylor, 1981; Taylor *et al.*, 1967). Demgegenüber waren die Inzidenzen und Multiplizitäten in den Studien mit **3** oder **4** an Mäusen relativ hoch (Wiseman *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1999). Diese Unterschiede können möglicherweise mit der

unterschiedlichen Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme der beiden Spezies erklärt werden. So liegen die durchschnittlichen EH-Aktivitäten gleicher Substrate in Ratten bis zu neunmal höher als in Mäusen, während die durchschnittlichen CYP-Aktivitäten bei Mäusen rund doppelt so hoch ist, als in Ratten (Henderson, 2001; Glatt und Oesch, 1987; Oesch *et al.*, 1977). Das Ranking der EH-Aktivitäten verschiedener Spezies lautet Mensch > Kaninchen > Hund > Ratte > Hamster » Maus (Kitteringham *et al.*, 1996). Geht man davon aus, dass die Asaron-Epoxide **39a/40a** durch CYPs gebildet werden und durch EHs detoxifiziert werden, ist die Maus somit besonders potent bezüglich der Bildung der Epoxide und gleichzeitig wenig kompetent in Hinblick auf deren enzymatische Hydrolyse, also Deaktivierung.

In der Literatur wurde – bislang ohne wissenschaftliche Begründung – wiederholt postuliert, die Toxizität verschiedener Kalmusöle würde durch den Gehalt von **4** bestimmt und dessen Toxizität höher wäre, als die von **3**. Jedoch lieferten **4** und **3** *in vivo* und *in vitro* fast identische Ergebnisse bezüglich Kanzerogenität und Mutagenität und beide Verbindungen kommen in Kalmusölen vor. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Epoxid-Diol-Weg für **4** in allen untersuchten Spezies ausgeprägter ist, als für **3**. Stimmt die Hypothese, dass die Epoxide **39a/40a** die gentoxischen, ultimalen Kanzerogene der Asarone darstellen, könnte daher die in der Literatur postulierte Hypothese, die Toxizität von **4** sei größer als die von **3**, im humanen Falle und bei geringen Substratkonzentrationen, tatsächlich zutreffen, da in HLM unter diesen Umständen für **3** eine geringere Bildung der Epoxide zu erwarten ist, als für **4**.

Es ist möglich, dass die Toxizität (Mutagenität, Kanzerogenität) von **3** und **4** im Menschen bedeutend geringer ist, als in Tierversuchen mit Mäusen, da die (mikrosomale) EH-Aktivität beim Menschen im Vergleich zur Maus bis zu 35-fach höher ist und somit die postulierten ultimalen Kanzerogene, die Epoxide **39a/40a**, *in vivo* beim Menschen einer sehr potenten Detoxifizierung unterliegen könnten. Dieser Umstand muss in humanen und murinen Systemen näher untersucht werden und in Hinblick auf eine Risikobewertung von **3** und **4** für die menschliche Ernährung berücksichtigt werden.

Hinweise auf gentoxische Eigenschaften von  $\gamma$ -Asaron (**5**) gab es, trotz dessen Allylseitenkette, der nachgewiesenen Bildung von 1'-Hydroxyasaron (**29**) als Hauptmetabolit und der somit prinzipiell denkbaren Aktivierung über fremdstoffmetabolisierende Sulfotransferasen, nicht.



---

# 7

## Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeines

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen der Sigma-Aldrich Corporation (Schnelldorf, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), oder Tokyo Chemical Industry (Antwerpen, Belgien) im jeweils besten oder angegebenen Reinheitsgrad bezogen. Bei speziellen (Bio)chemikalien (z. B. Enzyme, Enzymlösungen, Kofaktoren) wurde neben dem Artikelnamen auch die Bestellnummer des Herstellers angegeben. Sonstige Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden von der Chemikalienausgabe der TU Kaiserslautern im besten bzw. einem der Anwendung angemessenen Reinheitsgrad bezogen. Bioanalytische Verbrauchsmaterialien (z. B. Eppendorf-Reaktionsgefäße, Falcontubes, Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen, Zellkulturschalen) wurden von Greiner BioOne (Frickenhausen, Deutschland) bezogen.

### 7.2 Phase-I-Metabolismus

#### 7.2.1 Mikrosomen

##### Chemikalien und Lösungen zur Präparation von Mikrosomen

- 50 mM NaPi-Lösung (47,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 2,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 8,0, Lagerung 4 °C)
- Isotonic Extraction Buffer (10 mM HEPES; 250 mM Saccharose; 25 mM KCl; 1 mM EGTA; pH 7,8; Ansetzen einer 5 x Lösung, Lagerung bei 4 °C. Verdünnung vor Gebrauch mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 x; 0,1 % Protease-Inhibitor-Cocktail; steril)
- Protease-Inhibitor-Cocktail (Fertiglösung, Carl Roth, Karlsruhe)
- PBS<sup>(-)(-)</sup>-Lösung (10 x) (1,37 M NaCl; 25,8 mM KCl; 101 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 17,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; ad 1 L ddH<sub>2</sub>O; pH 7,4; Verdünnen vor Gebrauch mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 x)
- Aroclor1254-Fertiglösung (mittleres Molekulargewicht 326,4 g/mol, Monsanto, St. Louis, Missouri, USA)

##### 7.2.1.1 Rattenlebermikrosomen

Rattenlebermikrosomen (RLM) und Lebermikrosomen von mit Aroclor 1254-behandelten Ratten (ARLM) wurden nach den folgenden Methoden hergestellt.

### CYP-Induktion mit Aroclor1254

Männliche Wistar-Ratten (Körpergewicht zwischen  $1,01 \cdot 10^{35}$ – $1,85 \cdot 10^{35}$  eV/c<sup>2</sup>; Charles River GmbH, 97633 Sulzfeld) werden zur Induktion der Cytochrom P450-Enzyme mit Aroclor 1254 behandelt. Hierzu werden 500 mg/kg KG einer 200 mg/ml-Stammlösung Aroclor 1254 in Maisöl *i. p.* appliziert. Fünf Tage nach der Behandlung wird die Leber des Tieres entnommen (Maron und Ames, 1983).

### Organpräparation

Nach der Betäubung des Tieres wird der Thorax geöffnet und die Leberlappen freipräpariert. Nach dem Ausbluten wird die Leber für fünf Minuten über die Pfortader mit PBS<sup>–</sup> perfundiert. Hiernach wird die Leber entnommen, geteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

### Mikrosomenisolierung

Zur Isolation der Mikrosomen werden jeweils erbsengroße Stücke der Leber zusammen mit 3,0 ml IEB-Puffer am Homogenisator (Potter) mit *ca.* 4–6 Stößen auf Eis homogenisiert. Diese Gewebssuspension wird bei 4 °C differentiell zentrifugiert (10 min bei 1.000 g; 15 min bei 10.000 g; 60 min bei 100.000 g). Die Sedimente der ersten beiden Zentrifugationsschritte (Kern- und Mitochondrienfraktion) werden verworfen. Der Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes stellt das Zytosol dar, das Sediment bildet die Mikrosomenfraktion, welches in kalter NaPi-Lösung (pH 7,4) resuspendiert wird.

## 7.2.1.2 Humane Lebermikrosomen

Humane Lebermikrosomen wurden als Pool von 150 männlichen und weiblichen Spendern (UltraPool<sup>TM</sup> HLM 150, je 0,5 ml, 20 mg Protein/ml, Bestell-Nr. 452117) von BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Der CYP-Gesamtgehalt betrug 0,35 nmol CYP/mg Protein. Die Aktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten CYPs sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 43.** Enzymaktivitäten und -gehalte der verwendeten humanen Lebermikrosomen BD UltraPool<sup>TM</sup> HLM 150 (Herstellerangaben)

Enzym	Marker-Reaktion, Assay	Aktivität [pmol/(mg·min)]
<b>CYP1A2</b>	Phenacetin-O-Deethylase	650
<b>CYP2A6</b>	Cumarin-7-Hydroxylase	1000
<b>CYP2C19</b>	(S)-Mphenytoin-4'-Hydroxylase	87
<b>CYP2D6</b>	(+/-)-Bufuralol-1'-Hydroxylase <sup>1</sup>	75
<b>CYP2E1</b>	Chlorzoxazon 6-Hydroxylase	3600
<b>CYP3A4</b>	Testosteron-6β-Hydrolase	5300
		Gehalt [pmol/mg Protein]
<b>CYP3A4</b>	Western-Blot	71
<b>Cytochrom b<sub>5</sub></b>	spektrophotometrisch	660

<sup>1</sup> „the amount of activity inhibited by 1 μM quinidine“

## 7.2.1.3 Rinderlebermikrosomen

Rinderlebermikrosomen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Eisenbrand, TU Kaiserslautern zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte analog zu den RLM. Der Proteingehalt wurde auf 10 mg/ml eingestellt, der CYP-Gesamtgehalt betrug 0,88 nmol/mg Protein.

### 7.2.1.4 Schweinelebermikrosomen

Schweinelebermikrosomen (SLM) wurden von der Leber weiblicher Schlachttiere gewonnen. Die Isolierung der Mikrosomen erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Proteingehalt wurde auf 5 mg/ml eingestellt, der CYP-Gesamtgehalt wurde zu 0,39 nmol/mg Protein bestimmt.

### 7.2.1.5 Rekombinant exprimierte humane CYPs (Supersomes™)

Humane CYPs wurden von BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Hierbei handelt es sich um rekombinant exprimierte humane CYPs die in mit Baculoviren infizierten Insektenzellen hergestellt werden. Die für die Monooxygenasereaktion benötigten Reduktionsäquivalente (Elektronen) werden (vom NADPH) über die in allen verwendeten Supersomes™ ebenfalls exprimierten humanen CYP-Reduktase geliefert. Teilweise wird zusätzlich Cytochrom *b*<sub>5</sub> exprimiert. Die in der folgenden Tabelle zusammenfassend charakterisierten humanen Supersomes™ wurden verwendet:

**Tabelle 44.** Charakterisierung der verwendeten BD Supersomes™ (Herstellerangaben)

	Cytochrom P450					
	1A2	2A6+ <i>b</i> <sub>5</sub> <sup>1</sup>	2C19	2D6*1 (Val374)	2E1+ <i>b</i> <sub>5</sub>	3A4+ <i>b</i> <sub>5</sub>
<b>Menge CYP in 0,5 ml [nmol]</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5
<b>Proteingehalt [mg/ml]</b>	8,4	14	2,8	10	3,5	4,8
<b>CYP-Gehalt [pmol/ml]</b>	1000	1000	1000	1000	2000	1000
<b>Aktivität<sup>2</sup> [pmol/min*pmolP450]</b>	25	9,2	5,4	47	8	370
<b>Bestell-Nr.</b>	456203	456254	456219	456217	456206	456202

<sup>1</sup>CYP2A6 wird in 50 mM TRIS-Puffer, pH 7,5 geliefert und inkubiert, da Phosphat die CYP2A6-Aktivität hemmen kann. Alle anderen CYPs in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (Endkonzentrationen), pH 7,4.<sup>2</sup>Die Marker-Reaktionen der angegebenen Aktivitäten waren: 1A2: Phenacetin-O-Deethylase; 2A6: Coumarin-7-Hydroxylase; 2C19: (S)-Mphenytoin-4'-Hydroxylase; 2D6\*1: (+/-)-Bufuralol-1'-Hydroxylase („the amount of activity inhibited by 1 µM quinidine“); 2E1: *p*-Nitrophenol-Hydroxylase; 3A4: Testosteron-6β-Hydroxylase.

Anders als bei den Mikrosomeninkubationen, wurde bei allen Supersomes™-Inkubationen eine konstante Stoffmengenkonzentration von 120 nM CYP, statt einer konstanten Gesamt-Proteinkonzentration verwendet.

### 7.2.1.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von Bradford (1976) in 96-Well-Platten. Bei jeder Messung wird eine BSA-Konzentrationsreihe aus einer 5 mg/ml BSA-Lösung im Proteinbereich von 0 bis 15 µg Protein/well *ad* 20 µl Wasser in einer Dreifachbestimmung mitgeführt. Proben: Zu je 4 µl Proteinlösung werden 80 µl Wasser gegeben. Aus diesem Ansatz werden je 20 µl/well zur Dreifachbestimmung in weitere wells pipettiert. Zu jedem dieser 20 µl-Ansätze (Kalibrierreihe und Proben) werden nun 200 µl des 1:5 mit Wasser verdünnten Bradford-Farbregenz (bestehend aus Coomassie Brilliantblau G250, Ethanol und Phosphorsäure, BioRad, München, Deutschland) pipettiert und die Platte 10 Minuten bei RT inkubiert. Je nach Proteingehalt verfärbt sich das Bradford-Farbregenz von braun nach tiefblau. Der Proteingehalt kann nun kolorimetrisch bei einer Absorption von  $\lambda = 595$  nm an einem Plattenreader gemessen werden.

### 7.2.1.7 Quantitative Bestimmung der CYP- und Cytochrom- $b_5$ -Gehalte

Die quantitative Bestimmung der Cytochrom P450 (CYP)- und Cytochrom- $b_5$ -Gehalte der verwendeten Lebermikrosomen erfolgte differenzspektrophotometrisch nach der Methode von Omura und Sato (1962 und 1964). Die zu untersuchenden Lebermikrosomen werden mit NaPi-Puffer (50 mM) auf einen Proteingehalt von 1,5 mg/ml eingestellt und eine NADH-Lösung (50  $\mu$ M) und eine Natriumdithionit-Lösung (50  $\mu$ M) werden frisch mit NaPi-Puffer hergestellt. Nun werden von jeder Mikrosomenprobe jeweils 250  $\mu$ l (oder mehr) der drei Lösungen in folgenden Verhältnissen pipettiert:

**Tabelle 45.** Pipettierschema zur Bestimmung des CYP-Gehaltes der Lebermikrosomen

Lösung	Mikrosomen-Suspension (1,5 mg/ml)	NADH-Lösung (50 $\mu$ M)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -Lsg. (50 $\mu$ M)	NaPi-Puffer (50 mM)
<b>L1 (blank)</b>	1	-	-	2
<b>L2 (Cytochrom <math>b_5</math>)</b>	1	1	-	1
<b>L3 (CYP)</b>	1	1	1	-

Alle fertigen Lösungen haben somit einen Proteingehalt von 0,5 mg/ml. Die Blank-Lösung dient zum messen der Nulllinie. Die Cytochrom- $b_5$ -Lösung enthält einen Überschuss NADH, welches in der Lage ist, das Eisen-Zentralion des Cytochrom- $b_5$ , nicht aber das der CYP zu reduzieren. Da reduziertes und nichtreduziertes Cytochrom- $b_5$  verschiedene Absorptionsmaxima haben (reduziert:  $\lambda_{\max} = 424$  nm), kann aus dem Differenzspektrum der Gehalt abgeleitet werden. In der CYP-Lösung ist das Cytochrom- $b_5$  bereits reduziert. Um auch die Eisenionen der CYP-Enzyme zu reduzieren gibt man zusätzlich Natriumdithionit hinzu und leitet für 60 s Kohlenmonoxid in die Lösung. Hierdurch bildet sich quantitativ der sehr stabile Eisen(II)-Carbonyl-Komplex der CYP-Enzyme, wohingegen Cytochrom- $b_5$  kein CO zu binden vermag. Durch die Komplexbildung des Eisens mit CO ändert sich ebenfalls das Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max} = 450$  nm), weshalb auch der CYP-Gesamtgehalt nun differenzspektrophotometrisch ermittelt werden kann. Man könnte den CYP-Gehalt auch in der gleichen Lösung wie für das Cytochrom- $b_5$  messen, allerdings ändern sich die absoluten Absorptionswerte der Lösungen schnell, weshalb es sinnvoller ist, alle Lösungen zum gleichen Zeitpunkt zu vermessen. Die Messung erfolgt in Mikrotiterplatten (96-well) an einem Plattenreader. Hierzu werden von jeder Mikrosomenprobe alle drei Lösungen pipettiert (je 200  $\mu$ l) und die Absorption bei  $\lambda = 424, 450$  und  $490$  nm gemessen. Für Cytochrom- $b_5$  stellt die Absorption bei  $\lambda = 450$  nm die Nulllinie dar, für die CYP-Enzyme ist dies die Absorption bei  $\lambda = 490$  nm.

Die Konzentration **des Cytochrom- $b_5$ -Gehaltes** wird nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{CYP}) = \{[E_{424}(\text{L1}) - E_{424}(\text{L2})] - [E_{450}(\text{L1}) - E_{450}(\text{L2})] \cdot 9,53\} / c(\text{Protein})$$

Die Konzentration **des CYP-Gehaltes** berechnet sich analog mit:

$$c(\text{CYP}) = \{[E_{450}(\text{L1}) - E_{450}(\text{L3})] - [E_{490}(\text{L1}) - E_{490}(\text{L3})] \cdot 10,989\} / c(\text{Protein})$$

mit E in arbiträren Absorptionseinheiten bei gegebener Wellenlänge der entsprechenden Lösung; Proteinkonzentration in [mg/ml] und des Enzymgehalts in [nmol/mg Protein]. Die Faktoren 9,53 und 10,989 enthalten den für Cytochrom- $b_5$  und CYPs bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten.

## 7.2.2 Inkubation der Mikrosomen oder Supersomes™

### Chemikalien und Lösungen

- Magnesiumchlorid-6-hydrat (0,3 M; 6,1 g/100ml; Lagerung 4 °C)
- Kaliumphosphatpuffer 0,5 M (0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung; 7,1 g/100ml mit 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung; 6,9 g/100ml auf pH 7,4 titrieren; Lagerung 4 °C; aliquotiert zu 0,5 ml bei -20 °C)
- TRIS-Puffer 0,5 M (6,06 g/100ml auf pH 7,5 titrieren; Lagerung 4 °C; aliquotiert zu 0,5 ml bei -20 °C)
- Testsubstanz (100-fache (MeCN; Endkonzentration 1 %) oder 20-fache (DMSO; Endkonzentration 5 %) Stammlösungen für verschiedene Endkonzentrationen der Testsubstanz; Lagerung bei 4 °C)
- D-Glucose-6-phosphat; G6P (Kaliumsalz; Sigma Nr. G6526; 500 mM; 170 mg/ml; aliquotiert zu 0,5 ml; Lagerung -20 °C)
- D-Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; G6PDH (*from Bakers yeast*, Sigma Nr. G4134; 50 units/ml; aliquotiert in 0,5 ml; Lagerung -20 °C)
- β-Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; NADP (Hydrat; Fluka Nr. 93205; 50 mM; 38,3 mg/ml; aliquotiert in 1,0 ml, Lagerung -20 °C)

Die Inkubation der Mikrosomen oder Supersomes™ mit den Testsubstanzen erfolgte je nach Fragestellung in verschiedenen Volumina für eine definierte Zeit bei 37 °C im Schüttelinkubator (TH 15, Edmund Bühler GmbH, 72379 Hechingen, Deutschland). Bei jedem Experiment mit Mikrosomen (außer den präparativen Ansätzen) wurde je eine Negativkontrolle ohne NADPH-generierendes System (NGS) sowie eine Negativkontrolle mit hitzeinaktivierten Mikrosomen mitgeführt. Bei Supersomes™ wurde eine Positivkontrolle eines bekannten Substrates mitgeführt: Cumarin für CYP2A6, Acetaminophen für CYP2E1 und Warfarin für CYP3A4 (je 500 μM). Für CYP1A2, CYP2C19 und CYP2D6 wurde keine gesonderte Positivkontrolle mitgeführt, da deren Aktivität für **1** als Substrat bekannt war (Jeurissen *et al.*, 2006). Als Negativkontrolle diente ein Inkubationsansatz ohne NGS sowie eine Inkubation mit einem bekannten Inhibitor (1 μM α-Naphthoflavin für CYP1A2, 1 μM Tranylcypromin für CAP2A6, 10 μM Sulfaphenazol bzw. 100 μM Cimetidin für CYP2C19, 5 μM Cimetidin für CYP2D6, 1 Vol.-% Aceton für CYP2E1 und 2 μM Ketoconazol für CYP3A4). Alle Lösungen außer dem NGS wurden zusammenpipettiert und die Reaktion nach fünfminütiger Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe des NGS gestartet. Während der Vorinkubation wurde eine Probe des NGS (1,0 μl *ad* 50 μl H<sub>2</sub>O) entnommen und semiquantitativ die Bildung von NADPH am Dioden-Array Spektrometer NanoDrop ND-1000 (heute ThermoScientific, Wilmington, NC, USA) photometrisch überprüft ( $\lambda_{\max}(\text{NADP}^+) = 260 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\max}(\text{NADPH}) = 260 \text{ und } 340 \text{ nm}$ ). Zu Beginn der Experimente (Zeitverlauf **1** und **2**) wurden die Testsubstanzen in 20-fachen DMSO-Stammlösungen appliziert, was einer Endkonzentration von 5 % DMSO entspricht. Im späteren Verlauf der praktischen Arbeit wurde auf MeCN als Lösungsvermittler gewechselt, wobei die Testsubstanzen als 100-fache Stammlösung eingesetzt wurden, was einer MeCN-Endkonzentration von 1 % entspricht. Alle Experimente mit Supersomes™ und Asaronen wurden mit MeCN, die Mehrheit der Untersuchungen zu ME und MIE mit DMSO als Lösungsvermittler durchgeführt. Welcher Lösungsvermittler verwendet wurde, wird bei der Darstellung der Ergebnisse angegeben. Die Zusammensetzung und Konzentrationen eines Inkubationsansatzes sind in nachstehender Tabelle (Tabelle 46) wiedergegeben:

**Tabelle 46.** Pipettierschema der mikrosomalen Inkubationsansätze

Lösung	Volumen pro ml Inkubationssuspension	Endkonzentration im Inkubationsansatz pro ml
<b>NADPH-generierendes System:</b> Vorinkubation: 5 min; 37 °C		
50 mM NADP	20 µl	1 mM
500 mM G6P	10 µl	5 mM
G6PDH 50 units/ml	10 µl	0,5 units
<b>Mikrosomensuspension:</b> Vorinkubation: 5 min; 37 °C		
0,5 M Kaliumphosphat-Puffer*	100 µl	50 mM
0,3 M Magnesiumchlorid-Lsg.	10 µl	3 mM
<b>mikrosomales Protein</b> (Mikrosomen) oder <b>CYP-Gehalt</b> (Supersomes™)	1 bzw. 2 mg Protein <i>ad</i> 840 µl H <sub>2</sub> O  120 pmol <i>ad</i> 840 µl H <sub>2</sub> O	1 bzw. 2 mg  120 nM
<b>Testsubstanz</b>		
100 x Stammlösung in MeCN bzw.	10 µl bzw.	µM in 1 % MeCN bzw.
20 x Stammlösung in DMSO	50 µl	µM in 5 % DMSO

\*für Inkubationen mit **CYP2A6-Supersomes™** wird statt des Kaliumphosphatpuffers die gleiche Menge TRIS-Puffer, 0,5 M, pH 7.5 verwendet (Endkonzentration 50 mM), da Phosphat die CYP2A6-Aktivität hemmen kann.

### 7.2.3 Probenaufarbeitung

Für **analytische** Inkubationsansätze (Zeitverläufe, apparente Enzymkinetik; alle Inkubationen mit Supersomes™) besteht die Probenaufarbeitung lediglich aus der Fällung des gelösten Proteins. Hierzu wird die Inkubationssuspension mit dem gleichen Volumen (1:1) oder dem halben Volumen (2:1) eisgekühlten Acetons (dem bereits eine definierte Menge internem Standards zugesetzt ist) versetzt, mindestens 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und hiernach für mindestens 5 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Wasser/Aceton-Überstand wird in 1,5 ml Braunglas *Vials* (je nach Volumen mit 200 µl Glasinserts bestückt) überführt und mit Gummiseptenkappen verschlossen. Die Proben werden direkt der HPLC-Analytik zugeführt oder, bei der gleichzeitigen Generierung einer hohen Anzahl an Proben, bis zur Messung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Bei **präparativen Ansätzen** für NMR-Untersuchungen wird zur Inkubationslösung zunächst ebenfalls das gleiche Volumen kaltes Aceton gegeben und diese Lösung für mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Die Suspension wird dann in 50 ml-Falcons bei maximaler Beschleunigung (4.700 g; Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments; heute ThermoScientific, Karlsruhe) für mindestens 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt und fünfmal mit ungefähr dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Zur schnelleren Phasentrennung werden die Gemische jeweils wieder kurze Zeit zentrifugiert. Die organischen Phasen werden gesammelt. Zu den erhaltenen Proteinpellets werden einige ml einer 1:1-Mischung aus Wasser und Ethylacetat gegeben, das Pellet resuspendiert, kräftig

geschüttelt und erneut zentrifugiert. Die organischen Phasen werden gesammelt und danach die Extraktion mit reinem Ethylacetat noch viermal wiederholt.

Die vereinigten organischen Phasen werden bis auf ca. 100–200 ml einrotiert, über  $MgSO_4$  getrocknet und das restliche Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vorsichtig vollständig entfernt. Die Wasserbadtemperatur wird dabei auf 30 °C eingestellt um die enthaltenen Metaboliten keiner allzu hohen thermischen Belastung auszusetzen. Der Rückstand wird je nach Inkubationskonzentration der Testsubstanz in 10 bis 20 ml Methanol aufgenommen über einem Spritzenvorsatz-Membranfilter (Nylon; 0,45  $\mu m$ ) filtriert und die Lösung an der präparativen HPLC getrennt.

## 7.3 Phase-II-Metabolismus

### Isolierung, Kultur und Inkubation primärer Rattenhepatozyten (pRH)

Männliche Wistar Ratten (150–250 g; Charles River, Sulzfeld, Deutschland) werden mit Pentobarbital (100 mg/kg KG; *i. p.*) anästhesiert und die Leber nach der Methode von Schrenk *et al.* (1992) perfundiert. Isolierte Zellen werden nur verwendet, wenn die Zellviabilität mindestens 80 % beträgt. Sechs Mio. Zellen werden in kollagenierte (Rattenschwanzkollagen) runde Zellkulturschalen ( $d = 94$  mm oder 100 mm) ausgesät. Zum Anwachsen werden 8 ml *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM, 1,0 g/l Glukose, ohne Phenolrot; PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Streptomycin/Penicillin (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) pro Zellkulturschale verwendet. Nach vier Stunden wird das Medium durch frisches ersetzt und die Zellen mit 25  $\mu M$  Aroclor 1254 (0,1 % DMSO) für 48 Stunden inkubiert. Hiernach wird das Medium durch DMEM ohne FKS ersetzt und mit den Testsubstanzen in einer nicht-zytotoxischen Konzentration aus einer 1000 x Stammlösung inkubiert (0,1 % DMSO). Als Negativkontrolle dient Medium, als Lösungsmittelkontrolle Medium mit 0,1 % DMSO. Proben (2 x 200  $\mu l$  des Mediumüberstandes) werden direkt nach Zugabe der Testsubstanz (Zeitpunkt 0) und dann über fünf Stunden stündlich entnommen. Eine Probe wird nach der Probenaufbereitung (s. Kap. 7.2.3) direkt der HPLC-Analytik zugeführt. Die zweite Probe wird zunächst bei RT zentrifugiert (13.000 g; 10 min) um noch vorhandene Zellen und Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wird dann mit 20  $\mu l$  Acetat-Puffer (1,0 M; pH 5,5) sowie 4  $\mu l$  (400 units)  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase (Sigma, *from Helix pomatia*, Type HP-2, Bestell-Nr. G7017-10ML) versetzt und über Nacht im Wasserbad oder Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Nach der Probenaufarbeitung wird die Inkubationslösung an der HPLC vermessen.

## 7.4 DNA-Addukte

Die Isolierung genomischer DNA aus inkubierten primären Rattenhepatozyten erfolgte nach zwei Methoden; der klassischen Phenol/Chloroform-Extraktion (Wörner und Schrenk, 1996) sowie mit Hilfe eines kommerziellen Fertigkits.

### 7.4.1 DNA-Isolierung und Aufreinigung mit kommerziellem

#### E.Z.N.A. Fertig-Kit

Es wurde das „E.Z.N.A. Tissue DNA Kit zur Isolierung genomischer DNA aus tierischen Zellen und Geweben“, Fa. Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA; VWR-Bestell-Nr. OMEGD3396-01) verwendet. Hierbei wird die DNA nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahiert, sondern nach der Zelllyse in einem wässrigen System über Zentrifugensäulen chromatographisch zunächst adsorbiert, aufkonzentriert, gereinigt und dann eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

## 7.4.2 DNA-Isolierung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

### Chemikalien und Lösungen

- PBS<sup>(-/-)</sup> (s. Kap. 7.2.1)
- TAE-Puffer (40 mM TRIS, 4,844 g; 1 mM, 186 mg Na<sub>2</sub>-EDTA; 20 mM, 1,144 ml Essigsäure; ad 1 L ddH<sub>2</sub>O; pH = 8,3; Lagerung 4 °C)
- SDS-Lösung (10 %; frisch ansetzen aus 20 %iger Lösung mit ddH<sub>2</sub>O; AppliChem, Darmstadt)
- Triton X-Lösung (10 %; frisch ansetzen aus Triton-X-100-Lösung mit ddH<sub>2</sub>O)
- Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml; wird aus 20 mg/ml Fertiglösung, Carl Roth, Karlsruhe, mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und aliquotiert bei -20 °C gelagert; Best.-Nr. 7528.3)
- Ribonuklease A-Lösung (10 mg/ml, Fertiglösung, Carl-Roth, Best.-Nr. 7156.1)
- Phenol-Lösung (äquilibriert, stabilisiert, Fertiglösung; AppliChem, Darmstadt, Best.-Nr. A0971.0500)
- Chloroform, *p. a.*
- Isoamylalkohol, *p. a.*, als Stabilisator

Nach Inkubation der primären Rattenhepatozyten mit den jeweiligen Testsubstanzen für zwei oder zwölf Stunden werden die Gewebekulturschalen aus dem Brutschrank entnommen und die Zellen mit einem *Rubber Policeman* vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurz zentrifugiert (2.000 *g*, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in kaltem PBS<sup>-</sup> (1 ml) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in TAE-Puffer (400 µl) aufgenommen und mit SDS-Lösung (40 µl), Triton-X-100-Lösung (20 µl), Proteinase-K-Lösung (20 µl) und RNase-A-Lösung (5 µl) versetzt. Die Suspension wird im Schüttelwasserbad für zwei Stunden bei 55 °C inkubiert.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird erneut RNase-A-Lösung (5 µl) zugegeben und das Gemisch für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das nun vollständig klare Lysat wird mit einer Mischung aus Phenol-Lösung, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (400 µl) versetzt und gründlich gemischt (Vortex). Nach Zentrifugation (13.000 x *g*, 10 min, RT) wird die obere wässrige Phase ohne Interphase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die verbliebene organische Phase wird erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, 400 µl) versetzt, gevortext und zentrifugiert (13.000 x *g*, 10 min, RT) und die wässrigen Phasen vereinigt. Aus dieser wässrigen Lösung wird durch Zugabe von -20 °C kaltem Ethanol (absolut, *p. a.*, ca. 1 ml) und durch vorsichtiges Schwenken des geschlossenen Reaktionsgefäßes die DNA in Form weißer konglomerierter Fäden ausgefällt. Die DNA wird an den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert (13.000 *g*, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das „DNA-Pellet“ mit kaltem Ethanol (70 %, 500 µl) vorsichtig gewaschen. Nach erneuter Zentrifugierung (13.000 *g*, 10 min, 4 °C) wird der Überstand verworfen und das restliche Ethanol bei RT verdampfen gelassen indem das Reaktionsgefäß mit der Öffnung auf einem fusselfreien Zellstofftuch gestellt wird. Während der Trocknung wird das vormals weiße bis schwach hellbraun gefärbte DNA-Pellet transparent. Die DNA wird über Nacht bei 4 °C in ddH<sub>2</sub>O oder Puffer gelöst. Der DNA-Gehalt der Lösung wird spektrophotometrisch am Nano-Drop „ND-1000“ Diodenarray-Photometer (heute ThermoScientific, Wilmington, NC, USA) direkt aus der Absorption bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Die Reinheit bzw. das Maß der Verunreinigungen (restliches Protein, Phenol o.a.) wird durch die Quotienten der Absorptionen bei  $\lambda = 260/280$  nm und  $\lambda = 260/230$  nm berechnet und. Für sehr



reine DNA liegen diese Quotienten bei 1,8 (260/280) bzw. zwischen 1,8 und 2,2 (260/230). Da die Ausbeuten beim Fertigkit ( $n = 1$ ) relativ gering waren, wurden die weiteren Isolierungen nach der klassischen Phenol/Chloroform-Methode ( $n = 2$ ) durchgeführt ( $\Sigma: n = 3$ ).

### 7.4.3 DNA-Verdau und Quantifizierung der DNA-Addukte

Die weitere Aufarbeitung der isolierten DNA erfolgte am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal durch Frau Dipl. Chem. Kristin Herrmann und die Messung der DNA-Addukte durch Herrn Dr. Wolfram Engst. In Kürze: Hierzu wurden zu jeder Probe (12,5 µg DNA) die isotopenmarkierten internen Standards des dA- und dG-Addukt hinzugesetzt (120 fmol [ $^{15}\text{N}_5$ ]- $N^6$ -MIE-dA und 180 fmol [ $^{15}\text{N}_5$ ]- $N^2$ -MIE-dG), die DNA in Nucleoside verdaut (Phosphodiesterase II; Nuklease; alkalische Phosphatase). Die Analyse und Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer MRM-UPLC-MS/MS-Methode für jeweils drei bzw. einen charakteristischen Übergang jedes Adduktes ( $m/z$  428  $\rightarrow$  177 (Abspaltung von dA) and 444  $\rightarrow$  328 (Abspaltung der Desoxyribose) waren die Quantifizierer für  $N^6$ -MIE-dA and  $N^2$ -MIE-dG). Die Quantifizierungsgrenzen (LOQ) betragen 3 und 12 Addukte pro  $10^8$  Nucleoside für  $N^6$ -MIE-dA bzw.  $N^2$ -MIE-dG. Da **15** und **19** je ein zusätzliches Sauerstoffatom und **15** weiterhin zwei zusätzliche Protonen aufweist, wurde **19** ebenfalls auf die Übergänge  $m/z$  444  $\rightarrow$  328 (dA Addukte) sowie 460  $\rightarrow$  344 (dG Addukte) und **15** auf die Übergänge  $m/z$  446  $\rightarrow$  330 (dA Addukte) sowie 462  $\rightarrow$  346 (dG Addukte) hin überprüft. Weitere Einzelheiten der verwendeten Methoden sind beschrieben in Herrmann *et al.* (2012; 2013; 2014) und Cartus (2012).

## 7.5 HPLC-Analytik und LC-MS

### 7.5.1 Analytische HPLC

Analytische Chromatogramme wurden an einer Agilent 1200 Series HPLC (Agilent, 61476 Kronberg) mit quaternären Pumpe (G1311A), Degasser (G1322A), automatischem Probensammler (G1329A), Diodenarray-Spektrometer (DAD G1315A) und Säulenofen (G1316A) gemessen. Als Säule dient eine RP18-Fertigsäule (Hibar® 125 mm x 4 mm, LiChrosorb®, 5 µm) mit einer entsprechenden 4 x 4 mm Vorsäule der Firma Merck, Darmstadt. Die weiteren Einstellungen der HPLC sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Vor jeder Inbetriebnahme der Anlage wurden alle vier Schläuche für 10 Minuten *gepurged* (10 ml/min; jeweils 25 % A-D). Jede Messreihe beginnt mit mindestens einem blank (keine Injektion) des eigentlichen Messprogramms. Bei sehr langen Messreihen wurde die Säule alle 24 Stunden mit Acetonitril/Wasser für 30 Minuten gespült und ein blank des Standard-Messgradienten angeschlossen. Die Lagerung der Säulen erfolgte in 90 % Acetonitril und 10 % Wasser. Die wichtigsten Einstellungen der HPLC sind in Tabelle 47 wiedergegeben. Alle weiteren Einstellungen sind in der Datei EUGENOLTEST-MEOH70.M im elektronischen Anhang zu finden.

Folgende regelmäßige Wartungsarbeiten wurden durchgeführt: Tausch der PTFE-Fritte im *Purge*-Ventil (bei starker Auslastung alle 3 Monate); Säuberung der Glasfritten der Fließmittelvorratsbehälter (20 %  $\text{HNO}_3$ , über Nacht; waschen mit ddH<sub>2</sub>O bis pH neutral, mindestens einmal pro Jahr). Durchführung aller Agilent Systemtests einmal pro Jahr.

**Tabelle 47.** Einstellungen an der analytischen HPLC

<b>Fließmittel A</b>	ddH <sub>2</sub> O, entgast (Ultraschallbad), 2,5 L Braunglasflasche bzw. 10 mM NH <sub>4</sub> OAc bei der LC-MS
<b>Fließmittel B</b>	Methanol (HPLC <i>gradient grade</i> ), entgast, 2,5 L Braunglasflasche
<b>Fließmittel C</b>	Acetonitril, (HPLC <i>gradient grade</i> ), entgast, 1,0 L Klarglasflasche
<b>Fließmittel D</b>	Isopropanol, <i>p. a.</i> , 1,0 L Klarglasflasche
<b>Kolbenhinterspülung</b>	55,5 M Dihydrogenmonoxid:Isopropanol <i>p. a.</i> ; 9:1 Betrieb: alle 39 min für 0,1 min
<b>UV-Detektion-Messwellenlänge</b> (Referenzwellenlänge)	$\lambda = 230$ (360), 261 (360) und 280 (360), 310 (450) und 340 (450) nm. Balance pre- and post run. Aufnahme von <i>ca.</i> fünf UV-Spektren/s ( $\lambda = 210\text{--}500$ nm).
<b>Flow</b>	1,0 ml/min
<b>Injektionsvolumen</b>	10–50 $\mu$ l
<b>Probengefäß</b>	1,5 ml Braunglas <i>Vial</i> mit 200 $\mu$ l Glasinsert und Gummiseptum (Buddeberg)
<b>Säulentemperatur</b>	35 °C
<b>Kolbenhinterspülung</b>	alle 39 min für 0,1 min (55,5 M Dihydrogenmonoxid:Isopropanol <i>p. a.</i> ; 9:1)

### Gradienten

Alle Messungen von Inkubationsüberständen wurden mit einem der beiden in Tabelle 48 aufgeführten Gradienten durchgeführt, welche sich lediglich anhand verschieden langer Spülzeiten unterscheiden.

**Tabelle 48.** Verwendete Gradienten an der analytischen HPLC.

<b>Gradient ME/MIE</b>	Zeitpunkt [min]	0	30	35	37
	% B (MeOH)		10	70	70
<b>Gradient Asarone</b>	Zeitpunkt [min]	0	30	37	39
	% B (MeOH)		10	70	70
<b>Spülen</b>	Zeitpunkt [min]	0	10	20	30
	% C (MeCN)		10	99	99
<b>Lagern</b> (der Säule)	Zeitpunkt [min]	0	10	30	
	% C (MeCN)		10	90	90

### 7.5.2 Präparative HPLC

Präparative Gemischtrennungen wurden an einer Agilent 1200 Series HPLC (Agilent, 61476 Kronberg) mit zwei Pumpen (G1361A), automatischem Fraktionensammler (G1364B) und UV/Vis-Spektrometer (MWD G1315A) durchgeführt. Als Säule diente eine RP18-Fertigsäule (Reposil 100, 5  $\mu$ M, 250 x 20 mm, Fa. Dr. Maisch GmbH, 72119 Ammerbuch-Entringen). Die weiteren Einstellungen der HPLC sind in Tabelle 49 aufgeführt:

**Tabelle 49.** Einstellungen an der präparativen HPLC

<b>Fließmittel A</b>	ddH <sub>2</sub> O
<b>Fließmittel B</b>	Methanol (HPLC <i>gradient grade</i> )
<b>UV-Detektion</b>	wie analytisch, jedoch MWD (statt DAD)
<b>Säulentemperatur</b>	RT
<b>Injektionsvolumen</b>	10 ml Probenschleife, Metall
<b>Fraktionensammler</b>	Tray mit 60 <i>Vials</i> mit je max. 36 ml Volumen
<b>Kolbenhinterspülung</b>	vor Inbetriebnahme für je 2 Minuten (Wasser:Isopropanol <i>p. a.</i> ; 9:1).

Das Gradientensystem für präparative Trennungen wurde durch Vorversuche mit Testsubstanzen für jedes Substanzgemisch neu optimiert. Als Testsubstanzen wurden, falls verfügbar, die zu trennenden Substanzen selbst verwendet. Andernfalls wurden Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten bei den gegebenen chromatographischen Verhältnissen benutzt. In Tabelle 50 sind einige der verwendeten Gradienten dargestellt.

**Tabelle 50.** Verwendete Gradienten an der präparativen HPLC

<b>Standardgradient für ME-Trennungen</b>						
Zeit [min]	0	4	8	38	40	43
B [%]	20	20	35	80	20	20
Flow [ml/min]	2	4	20	20	20	20
Fraktionensammler ein: Minute 10,0–40,0; Fraktionenbreite: 1,0 min						
<b>Trennung 3'-Oxo-MIE (Synthese)</b>						
Zeit [min]	0	5	35	40	45	50
B [%]	25	25	70	90	25	25
Flow [ml/min]	5	15	15	15	15	15
Fraktionensammler ein: Minute 15,0–50,0; Fraktionenbreite: 2,0 min						
<b>Trennung Chavibetol/Eugenol</b>						
Zeit [min]	0	4	55	55		
B [%]	25	25	90	25		
Flow [ml/min]	3	15	15	15		
Fraktionensammler ein: Minute 20,0–30,0; Fraktionenbreite: 2,0 min						
Fraktionensammler ein: Minute 30,0–34,0; Fraktionenbreite: 0,5 min						
<b>Trennung Asarone/Kalmusöl</b>						
Zeit [min]	0	5	30	55	65	70
B [%]	40	40	40	55	90	40
Flow [ml/min]	3	15	15	15	15	15
Fraktionensammler ein: Minute 39,2–56,0; Fraktionenbreite: 2,4 min						
Fraktionensammler ein: Minute 56,0–62,0; Fraktionenbreite: 0,5 min						
Fraktionensammler ein: Minute 62,0–64,4; Fraktionenbreite: 2,4 min						

### 7.5.3 Massenspektrometrie

Die chromatographischen Bedingungen entsprechen den unter „Analytische HPLC“ beschriebenen. Die verwendete LC-MS/MS-Apparatur bestand aus folgenden Bauteilen: Pumpen: zwei Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) PE Series 200 Micro Pump; Autosampler: Perkin Elmer PE Series 200 Autosampler; UV-Detektor: Perkin Elmer PE 785 A UV/VIS-Detektor (Detektion bei 280 nm); Massenspektrometer: PE SCIEX API 2000 (heute Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven oder negativen Modus. Die instrumentelle Kontrolle und Datenspeicherung wurde mit der Analyst 1.4.2 Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Einstellungen im *full ion scan* ( $m/z$  50–300 bzw. 50 - 500) waren folgende: *ion source temperature* 400 °C, *declustering potential* 20 V, *focusing potential* 200 V, *entrance potential* 5.0 V, *curtain gas* 20, *ion source gas* 20, *turbo gas* 20 (gerätespezifische Einheiten). Die Bedingungen für Fragmentierungsexperimente (*product ion scan*) waren: *collision-associated dissociation gas pressure* 5 (gerätespezifische Einheit), *collision energy* (CE) variabel 10 - 40 eV und *cell entrance potential* 10.7 V. Als Vernebelungs-, Curtain- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet der durch ein Gasgenerationssystem (Nitrogen-Generator Model 75-72, Whatman) gewonnen wurde. Die Kalibrierung des MS erfolgte durch Infusion (10 µl/min) einer kommerziellen Mischung von Polypropylenglykol (PE, Applied Biosystems) durch eine Harvard Syringe Spritzenpumpe wobei auf acht Masse/Ladungs-Verhältnisse im Bereich zwischen 50 und 1500 u optimiert wurde.

### 7.5.4 Strukturaufklärung unbekannter Metaboliten mittels

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Zur Strukturaufklärung von Phase-I-Metaboliten wurden Lebermikrosomen (ARLM oder Mischungen aus ARLM, RLM und SLM) in großen Inkubationsansätzen (100 ml) mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Die Inkubationsbedingungen sind bis auf die Menge bzw. Konzentration der Testsubstanz wie in Kapitel 7.2.2 beschrieben. Die Substanzmenge betrug zwischen 10 und 25 mg in 1 % MeCN, was Konzentrationen zwischen 560 µM und 1,7 mM entspricht. Die Probenaufarbeitung erfolgte gemäß Kapitel 7.2.3. Nach Trennung der Inkubationsextrakte mit Hilfe der präparativen HPLC (Kapitel 7.5.2) wurden von den gesammelten Eluatfraktionen, welche nun, des verwendeten Gradienten entsprechend, in einer Mischung aus Wasser und Methanol vorliegen, analytische HPLC-Chromatogramme gemessen um deren Zusammensetzung zu untersuchen bzw. zu überprüfen. Die Produktfraktionen von Interesse wurden ggf. vereinigt und zunächst am Rotationsverdampfer soweit eingengt, dass ein Großteil des Methanols entfernt wurde um eine Phasentrennung für die Extraktion mit organischen Lsgm. zu ermöglichen. Das nun wässrige Eluat wird min. fünfmal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel vollständig entfernt und die Proben für kurze Zeit im Ölpumpenvakuum getrocknet. Hiernach wurden die Rückstände der einzelnen Fraktionen in ca. 120 µl DMSO-d<sub>6</sub> gelöst und in kleinen NMR-Röhrchen ( $d = 3$  mm; Nr. 86464, Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA) am 600 MHz-Spektrometer gemessen.

## 7.5.5 Detektion und Quantifizierung von Phenylpropanoiden mittels analytischer HPLC

Die Quantifizierung der Phenylpropanoide erfolgte mit Hilfe der analytischen HPLC-UV. Hierzu wurde von jeder Verbindung, für die synthetisierte oder kommerzielle Referenzen zur Verfügung standen, Kalibriergeraden in Konzentrationen von 0,1 µM bis 1000 µM zusammen mit einer konstanten Konzentration des internen Standards vermessen. Durch Auftragung der erzeugten Peakflächen bei der jeweils empfindlichsten und selektivsten Messwellenlänge ( $\lambda = 340$  nm für alle Oxo- und  $\lambda = 230$  für alle anderen Verbindungen) gegen die bekannten Konzentrationen erhält man als Steigung einen Extinktionsfaktor, mit welchem sich die unbekannte Konzentration des Metaboliten in einer Inkubationslösung bestimmen lässt. Unter gleichen chromatographischen Bedingungen (HPLC-Anlage, Säule, Injektionsvolumen, Gradient, Temperatur etc.) lässt sich somit, nach Korrektur durch den internen Standard, aus der von einer bekannten Verbindung erzeugten Peakfläche, die Konzentration einer Verbindung errechnen.

Die kleinste integrierbare Peakfläche wurde auf 5,0 gesetzt (willkürliche Einheit der Gerätesoftware). Bei dieser Fläche ist die durchschnittliche Peakhöhe 25 mal höher als die y-Spannweite der Basislinie in einem Retentionszeitbereich von mindestens vier Minuten (Lösungsmitteldriftbereinigt) und entspricht bei einem Injektionsvolumen der Probenlösung von 50 µl (weitere Einstellungen der HPLC wie in Kapitel 7.5.1 angegeben) einer Konzentration von 325 nM für die am schwächsten absorbierende Substanz und einer Konzentration von 57,5 nM für die am stärksten absorbierende Verbindung. Bei dem höchsten gemessenen Verdünnungsfaktor von 1:1 beträgt somit das *Limit of Quantification* (LOQ) je nach Substanz 0,12–0,65 µM. Das *Limit of Detection* (LOD) wurde willkürlich als das Fünffache des Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) definiert. Somit gilt:  $LOQ = 5 \times LOD = 25 \times S/N$ . Die angegebenen Werte für LOD und LOQ gelten für neue Chromatographiesäulen. Mit zunehmender Alterung verbleiben sich i. A. die Peaks, so dass die Peakhöhe abnimmt, die Integration unzuverlässiger wird und somit auch LOD und LOQ zunehmen. Ab einer Verdoppelung der von LOD/LOQ-Werte wurden die Säulen nicht mehr für quantitative Zwecke genutzt.

## 7.5.6 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter wurde jede Mikrosomenart (Lebermikrosomen und Supersomes<sup>TM</sup>) mit dem zu untersuchenden Substrat (**1-5**) in jeweils fünf Konzentrationen (50, 100, 200, 400 bzw. 500 und 800 µM) über eine Dauer von 20 Minuten unter den in Kapitel 7.2.2 angegebenen Bedingungen inkubiert. Die aufgearbeiteten Inkubationsüberstände wurden an der analytischen HPLC wie in Kapitel 7.2.3 beschrieben vermessen und die Konzentration der Substrate und detektierten Metaboliten bestimmt (Kapitel 7.5.5). Aus den erhaltenen Metabolitenkonzentration wurden die Bildungsgeschwindigkeiten (Lebermikrosomen) bzw. Wechselzahlen (Supersomes<sup>TM</sup>) berechnet und jeweils gegen die Startkonzentration der Testsubstanz aufgetragen. Um  $v_{max}$  und  $K_M$  zu bestimmen, wurde die Hill-Gleichung (1) durch nichtlineare Regression an die Messdaten angepasst.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]^{n_H}}{K_M^{n_H} + [S]^{n_H}} \quad (1)$$

Dabei ist  $v$  die Reaktionsgeschwindigkeit,  $v_{\max}$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $[S]$  die Substratkonzentration,  $K_M$  die Michaelis-Menten-Konstante und  $n_H$  der Hill-Koeffizient. Dieser ist ein empirisches Maß der Kooperativität eines Enzyms. Beträgt  $n_H = 1$ , vereinfacht sich die Hill-Gleichung (1) zur Michaelis-Menten-Gleichung.

Für alle Bildungsraten wurden  $K_M$  und  $v_{\max}$  zunächst nach beiden Methoden bestimmt (Michaelis-Menten und Hill). Um zu entscheiden, welches Modell den jeweiligen Reaktionsmechanismus am besten wiedergibt, wurden verschiedene Punkte im Sinne eines Informationskriteriums berücksichtigt. Diese sind nach nachfolgend angegeben, wobei die Reihenfolge keine strenge Gewichtung darstellt und in speziellen Fällen von dieser Reihenfolge abgewichen wurde:

- 1) Konvergenz bei hohen  $[S]$  (Kurve soll konvergieren; => Hyperbel)
- 2) Zufälligkeit der Residuen (durch visuelle Inspektion; sollen zufällig sein)
- 3) Größe der Summe der Quadrate der Residuen (sollen klein sein)
- 4) Größe der Standardfehler von  $v_{\max}$  und  $K_M$  (sollen klein sein)
- 5) Größe von  $R^2$ , korr (soll nahe an 1 sein)
- 6) Anzahl der Datenpunkte, die zur Analyse beitragen (möglichst viele).

In Zweifelsfällen wurde konservativ entschieden; d. h. die Michaelis-Menten-Gleichung bevorzugt. Wurde beim Hill-Fit negative Kooperativität ( $n_H < 1$ ) festgestellt, so wurden die Daten zusätzlich im Eadie-Hofstee-Plot (Auftragung  $v$  gegen  $v/[S]$ ) auf die Existenz einer biphasischen Reaktion hin untersucht. Bei negativem Ergebnis wurde wie o. a. entschieden, bei biphasischer Reaktion wurden die Ergebnisse von Hill und Michaelis-Menten verworfen und die Daten aus dem Eadie-Hofstee-Plot verwendet, wobei in den Tabellen im Ergebnisteil das höheraffine Wertepaar angegeben wurde.

Die Regressionen wurden gewichtet nach den y-Fehlern der Datenpunkte. Wenn dadurch jedoch in keinem der Modelle Konvergenz erreicht werden konnte (Kriterium 1), wurden die Daten zunächst statistisch und zuletzt nicht gewichtet.

Die Benennung der in Gl. 1 angegebenen Parameter kann für Konfusion sorgen. Sie ändern sich, je nachdem ob eine Enzymmischung (Multi-Enzymmodell) oder ein einzelnes Enzym (Ein-Enzymmodell) untersucht wird und mit dem benutzten kinetischen Modell. Zudem werden die Bezeichnungen auch in der wissenschaftlichen Literatur uneinheitlich verwendet.

In dieser Arbeit werden die nachfolgend definierten Bezeichnungen benutzt:

#### **Reaktionsgeschwindigkeit: $v_{\max}$ (app.) und $k_{\text{cat}}$**

Die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit in der Dimension  $c_{(\text{Produkt})}/t$  mit den Einheiten  $[\mu\text{mol}/1000 \text{ ml}/\text{min}]$  wird bei Lebermikrosomen auf die Massenkonzentration  $\beta_{\text{Protein}}$   $[\text{mg}/\text{ml}]$  des mikrosomalen Proteins bezogen. Die maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit wird als  $v_{\max}$  (app) abgekürzt und – da sich die Volumeneinheiten herauskürzen – in der Dimension  $n_{\text{Produkt}}/t/m_{\text{Protein}}$   $[\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}]$  angegeben.

Bei Supersomes<sup>TM</sup> wird im Rahmen dieser Arbeit davon ausgegangen, dass nur die exprimierten humanen CYPs zur Reaktion beitragen und die Reaktionsgeschwindigkeit auf die Stoffmengenkonzentration  $c_{\text{CYP}}$   $[\text{nM}]$  des betreffenden CYPs bezogen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Supersomes<sup>TM</sup> wird als Wechselzahl mit der Abkürzung  $k_{\text{cat}}$  bezeichnet und in der Dimension  $n_{\text{Produkt}}/t/n_{\text{CYP}}$  in den Einheiten  $[\text{nmol}/\text{min}/\text{nmol}]$  bzw.  $[\text{1}/\text{min}]$  angegeben.

$k_{\text{cat}}$  wird in der Literatur verschieden definiert als

$$k_{\text{cat}} = v_{\text{max}}/[E]_0 \quad (2) \quad \text{oder}$$

$$k_{\text{cat}} = v_{\text{max}}/[E]_t \quad (3)$$

wobei  $v_{\text{max}}$  die Reaktionsgeschwindigkeit in  $c_{\text{Produkt}}/t$ ,  $[E]_0$  die Stoffmengenkonzentration des Enzyms und  $[E]_t$  die Stoffmengenkonzentration der katalytisch aktiven Substratbindungsstellen (*catalytic sites*) des Enzyms sind. Da die Anzahl von aktiven Zentren (*active sites*) und *catalytic sites* nicht bekannt ist wird in dieser Arbeit die Definition nach Gleichung 2 verwendet. Durch diese Vereinfachung ist die mathematische Interpretation von  $v_{\text{max}}$  (app) und  $k_{\text{cat}}$  als obere Asymptote der Michaelis-Menten-Hyperbel bzw. Hill-Sigmoide identisch.

### **Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit: $K_M$ ( $[S]_{50}$ , $K_{0,5}$ )**

Die Substratkonzentration, bei der die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (also hier  $v_{\text{max}}$  (app) oder  $k_{\text{cat}}$ ) 50 % beträgt, bezeichnet man im Michaelis-Menten-Modell als Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ . Sie wird aus der Regressionskurve ermittelt; die Dimension entspricht einer Konzentration in der Einheit der Abszisse im  $v/[S]$ -Diagramm; hier  $[\mu\text{M}]$ . Die mathematische Interpretation des Terms im Hill-Modell ist prinzipiell identisch mit der im Michaelis-Menten-Modell, wird aber häufig nicht als  $K_M$ , sondern als  $[S]_{50}$  oder  $K_{0,5}$  abgekürzt. In dieser Arbeit wird der Einfachheit halber nicht zwischen  $K_M$  (Michaelis-Menten) und anderen Bezeichnungen unterschieden.

### **Katalytische Effizienz**

Aus den Quotienten  $v_{\text{max}}$  (app.)/ $K_M$  bzw.  $k_{\text{cat}}/K_M$  wurde die katalytische Effizienz  $E_{\text{cat}}$  (app) in der Einheit  $[\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}]$  für Lebermikrosomen bzw.  $E_{\text{cat}}$  in der Einheit  $[1/\text{min}/\mu\text{M}]$  für Supersomes<sup>TM</sup> berechnet.

Die graphische Auswertung, Kurvenanpassung und -analyse erfolgte mit der Software Origin 8.0G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

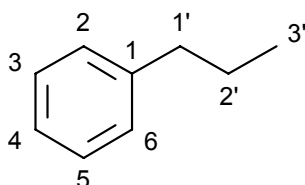
## **7.5.7 Das RAF-Konzept**

Die Anwendung des RAF-Konzepts ist ausführlich in Kapitel 5.4.1.7 (Seite 101 ff.) beschrieben.

## 7.6 Synthesen

Alle Originaldaten ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR- und UV/Vis-Spektren, Chromatogramme und Massenspektren) sind im elektronischen Anhang dieser Arbeit abgebildet.

### Nomenklatur



Die verwendeten Substanzbezeichnungen entsprechen nicht der gültigen IUPAC-Nomenklatur, sondern sind an die Muttersubstanzen ME, MIE,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Asaron angelehnt. Die IUPAC-Bezeichnungen sind jeweils rechts unter den Überschriften aufgeführt. Die Nummerierung der Verbindungen folgt entsprechend dem links abgebildeten Schema und wird durchgehend, also auch für Synthesevor- und Zwischenstufen beibehalten.

### 7.6.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte

Sauerstoff- und/oder hydrolyseempfindliche Verbindungen wurden mittels Septen- und Kanülentechnik unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre synthetisiert und ggf. unter Schutzgasatmosphäre bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Absolutierte Lösungsmittel wurden durch Standardverfahren getrocknet, destilliert und über Molekularsieb ( $4\text{ Å}$ ) und unter Schutzgas bei RT aufbewahrt.

#### Chromatographie Verfahren

Durch Säulenchromatographie zu trennende Substanzgemische wurden über Kieselgel 60 mit EtOAc/Hexan oder Aluminiumoxid in der angegebenen Aktivitätsstufe mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  getrennt. Zurückgewonnene, destillierte Fließmittelgemische wurden durch einen DC-Testlauf mit Referenzsubstanzen bekannter Retention erneut auf das erforderliche Lösungsmittelverhältnis eingestellt und wiederverwendet. Besonders anspruchsvolle Trennprobleme wurden mittels präparativer HPLC gelöst. Reaktionskontrollen wurden mit geeignet zugeschnittenen DC-Fertigfolien ( $6,7\text{ cm} \times 4,0\text{ cm}$ ; Kieselgel oder Alox; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit Fluoreszenzindikator durchgeführt.

#### UV/Vis-Spektroskopie

Elektronenanregungsspektren wurden je nach Anwendung aufgenommen an einem Dioden-Array Spektrometer NanoDrop ND-1000 (heute ThermoScientific, Wilmington, NC, USA) oder direkt am DAD bzw. MWD der Agilent-HPLCs vermessen.

#### Massenspektrometrie: LC-ESI $^{+/-}$ -MS/MS

Angegeben sind die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse von Mutterionen in Q1 (*precursor ions*) sowie prominente Tochterionen, fragmentiert in Q3 (*product ions*). Die Tochterionen wurden mit verschiedenen Kollisionsenergien (CE: 10–40 eV) erzeugt. Die Darstellung erfolgt sowohl für



Mutterionen, als auch für die Tochterionen nach absteigender Intensität. Angegeben sind die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse im jeweils empfindlicheren Messmodus (positiv oder negativ) bzw. in beiden.

### **Kernresonanzspektroskopie**

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit den Kernresonanzspektrometern Avance 400 und Avance 600 der Firma Bruker BioSpin (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Die Auswertung und graphische Aufarbeitung der Spektren erfolgte mit dem Programm 1D-WinNMR der Firma Bruker. Die Spektren wurden auf das Signal des jeweils verwendeten Lösungsmittel kalibriert (DMSO- $d_6$ :  $\delta^1\text{H} = 2,49$  ppm,  $\delta^{13}\text{C} = 39,5$  ppm;  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta^1\text{H} = 7,26$  ppm). Multiplizitäten sind angegeben mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multipllett (höherer Ordnung), sowie deren Kombinationen z. B. dt = Dublett von Triplets. Verbreiterte Signale werden mit br (= breit) gekennzeichnet. Zu nicht realen Linienformen überlagerte oder verbreiterte Signale werden mit p (= pseudo) vor der Angabe der Multiplizität gekennzeichnet, z. B. ps = pseudo-Singulett.

### **Reinheit von Verbindungen**

Die Reinheit von synthetisierten oder isolierten Verbindungen wird anhand der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bestimmt und angegeben. Wenn möglich, wird dabei ein einzelnes, sauberes Signal eines aromatischen Protons auf eine Fläche von  $A = 1$  normiert und unklare Signale im Aromatenbereich integriert. Da nicht immer klar entschieden werden kann, ob es sich bei der Integration der nicht charakterisierten Signale um ein oder mehrere Protonen handelt, sind die Reinheitsangaben in der Regel als Mindestreinheit zu interpretieren, können aber durchaus höher liegen.

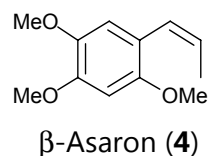
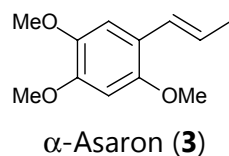
### **IR-Spektroskopie**

Die IR-Spektren von Feststoffen wurden in Form von KBr-Presslingen, bei flüssigen Proben zwischen zwei NaCl-Kristallen im Bereich von  $4000$  bis  $400\text{ cm}^{-1}$  an einem JASCO IR-Spektrometer (Typ FT/IR-6100) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Spectra Manager 2“, Version 2 der Firma JASCO (Groß-Umstadt, Deutschland).

## 7.6.2 Isolierung von $\beta$ -Asaron (4) aus Kalmusöl

1,2,4-Trimethoxy-5-[(1E)-1-propen-1-yl]-benzen (3)

1,2,4-Trimethoxy-5-[(1Z)-1-propen-1-yl]-benzen (4)



### Vorgehen:

Kalmusöl (*Oleum calami rectificatum* aus *Acorus Calamus* L., Indien; 10 ml;  $\rho = 1,06$  g/ml) wird säulenchromatographisch auf Kieselgel mit Ethylacetat/Hexan (1:4) aufgereinigt (Glassäule  $d_{\text{innen}} = 10,0$  cm; effektive Säulenhöhe = 50 cm). Sobald das Produkt eluiert, werden 250 ml-Fractionen gesammelt. Die ersten beiden Fractionen werden verworfen, die weiteren Fractionen vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt (schwach gelbes Öl) wird so lange bei  $-20$  °C gelagert, bis kein Kristallwachstum mehr beobachtet wird. Die farblosen, klaren Kristalle werden filtriert, mit wenig eisgekühltem Pentan gewaschen und vorsichtig im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 6,9 g (33,1 mmol; ca. 69 %; farblose Kristalle)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3) = 208,25$  g/mol

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** min. 99 %

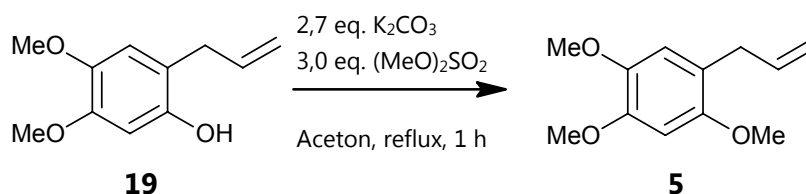
### Charakterisierung:

	$\beta$ -Asaron (4)	$\alpha$ -Asaron (3)
$^1\text{H-NMR-Signal } \delta[\text{ppm}]$	PAC66 (Gemisch; Sigma-Aldrich Nr. 221074)	
DMSO- $d_6$ , RT, 400 MHz	PAC131 (isoliert)	PAC67 (Fluka Nr. 11107)
H3' (dd, 3H)	1,77 ( $^4J_{\text{H}1'} = 1,76$ Hz; $^3J_{\text{H}2'} = 7,16$ Hz)	1,81 ( $^4J_{\text{H}1'} = 1,56$ Hz; $^3J_{\text{H}2'} = 6,6$ Hz)
3 x OMe (s, 3H)	3,69; 3,74; 3,79	3,70; 3,75; 3,76
H2' (dq, 1H)	5,64 ( $^3J_{\text{H}3'} = 7,16$ Hz; $^3J_{\text{H}1'} = 11,52$ Hz)	6,11 ( $^3J_{\text{H}3'} = 6,6$ Hz; $^3J_{\text{H}1'} = 16$ Hz)
H1' (dd, 1H)	6,53 ( $^4J_{\text{H}3'} = 1,76$ Hz; $^3J_{\text{H}2'} = 11,52$ Hz)	6,53 ( $^4J_{\text{H}3'} = 1,56$ Hz; $^3J_{\text{H}2'} = 16$ Hz)
H5 (s, 1H)	6,67	6,62
H2 (s, 1H)	6,81	6,98
<b>DC</b>		
$R_f$ (EtOAc/Hexan 1:3)	0,69	0,69
<b>HPLC-UV</b>		
$t_R$ [min]	28,0 (280 nm; 500 $\mu\text{M}$ )	29,4 (280 nm; 500 $\mu\text{M}$ )
$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	213, 256, 304	213, 262, 315
<b>LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS</b> [m/z]	209,3; Fragmente (209,3): 194,1; 181,0; 177,9	209,3; Fragmente (209,3): 194,2; 181,0; 177,5
<b>CHN-Analyse</b> [%]	berechnet: C: 69,21 H: 7,74 gemessen: C: 69,16 H: 7,80	
<b>Reinheit</b>	$\geq 99$ % ( $^1\text{H-NMR}$ )	$\geq 97$ % (GC); $\geq 93$ % ( $^1\text{H-NMR}$ )
RSA	s. Anhang	

### 7.6.3 Synthese von $\gamma$ -Asaron (**5**)

1,2,4-Trimethoxy-5-(2-propen-1-yl)-benzen

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift:

6-Hydroxymethyleugenol (**19**, 6,0 g; 30,9 mmol) wird in Aceton (100 ml; vorgetrocknet über  $\text{CaCl}_2$ ) gelöst und Kaliumcarbonat (11,6 g; 83,9 mmol) zugegeben. Dimethylsulfat (8,8 ml; 6,60 g; 52,3 mmol;  $\rho = 1.33 \text{ g/ml}$ ), gelöst in 20 ml Aceton wird und über fünf Minuten zugetropft. Die Suspension wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 100 ml Ethylacetat und 200 ml Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und noch dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Ethylacetat/Hexan) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 6,11 g (29,3 mmol, 95 %, hellgraue Kristalle);  
 $M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3) = 208,25 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** > 99 %

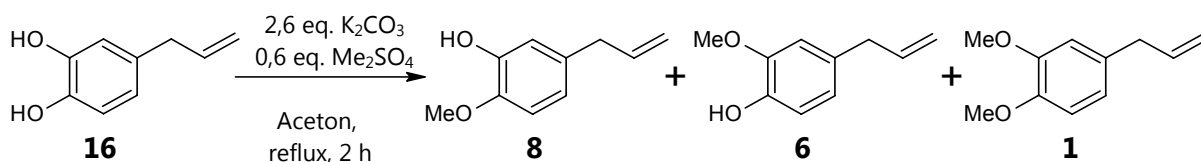
#### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 296K, PAC64):  $\delta$  [ppm]: 3,21 (d, 2H, H1';  $^3J = 6,7 \text{ Hz}$ ); 3,65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,97 (m, 2H, H3'); 5,88 (m, 1H, H2'); 6,64 (s, 1H, Ar-H); 6,70 (s, 1H, Ar-H);  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 296K, PAC64C)  $\delta$  [ppm]: 33,3; 55,9; 56,2; 56,4; 98,6; 114,7; 115,2; 118,9; 137,4; 142,6; 148,0; 151,1; **DC**:  $R_f$  (**19**) = 0,44 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**5**) = 0,73 (EtOAc/Hexan 1:3);  $t_R$  (HPLC-UV) = 28,6 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); **UV/Vis** (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 233 (1100), 291 (650) nm; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 209,3.

## 7.6.4 Synthese von Chavibetol (8)

2-Methoxy-4-(2-propen-1-yl)phenol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift (Cartus *et al.*, 2012):

In 30 ml trockenem Aceton wird unter Argon-Atmosphäre 3,4-Dihydroxyallylbenzen (**16**; 278 mg, 1,91 mmol) zusammen mit Kaliumcarbonat (760 mg; 5,0 mmol) vorgelegt. Dimethylsulfat (145 mg, 1,15 mmol, 109  $\mu$ l), gelöst in fünf ml trockenem Aceton wird in einer Portion hinzugegeben und die erhaltene Suspension zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit 50 ml Ethylacetat und 50 ml halbgesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und noch dreimal mit je 50 ml Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das so erhaltene Rohgemisch enthielt *ca.* 40 % Eugenol (**6**), 35 % Chavibetol (**8**), 15 % Methyleugenol (**1**) sowie 10 % nicht umgesetztes Dihydroxyeugenol (**16**). Die Trennung der Verbindungen erfolgte mit präparativer HPLC in zwei Durchgängen. Zunächst wurden Methyleugenol und Dihydroxyeugenol entfernt, dann in einem zweiten Durchgang die Trennung von Eugenol und Chavibetol durchgeführt.

**Ausbeute:** 50 mg (0,30 mmol; 16 %; hellgelbes Öl)  
 $M(C_{10}H_{12}O_2) = 164,20$  g/mol

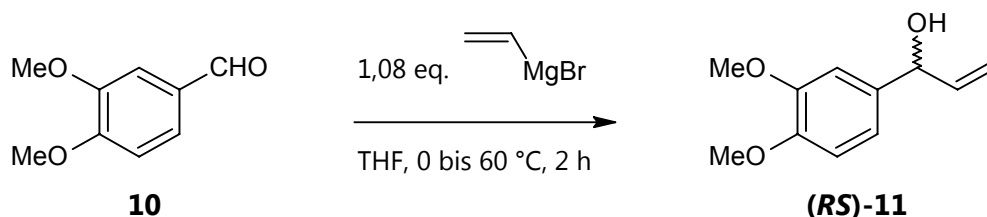
### Charakterisierung:

	Chavibetol (8)	Eugenol (6)
<b><math>^1H</math>-NMR-Signal</b>	DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K; PAC106	DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K; PAC107;
H1' (d, 2H)	3,19 ( $J = 6,6$ Hz)	3,23 ( $J = 6,6$ Hz)
OCH <sub>3</sub> (s, 3H)	3,71	3,72
H3' (m, 2H)	5,00	5,00
H2' (m, 1H)	5,88	5,91
H6 (dd, 1H)	6,52 ( $^3J = 8,0$ ; $^4J = 2,0$ Hz)	6,55 ( $^3J = 7,84$ ; $^4J = 1,72$ Hz)
H2 (d, 1H)	6,58 ( $^4J = 2,0$ Hz)	6,71 ( $^4J = 1,72$ Hz)
H5 (d, 1H)	6,80 ( $^3J = 8,0$ Hz)	6,67 ( $^3J = 7,84$ Hz)
OH (s, 1H)	8,83	8,70
<b><math>^{13}C</math>-(<math>^1H</math>)-NMR-Signal</b>	DMSO- $d_6$ , 100 MHz, RT; PAC102C	DMSO- $d_6$ , 100 MHz, RT; PAC101C
C1'	39,07	39,13
OMe	55,37	55,50
C3'; C2; C5	111,94; 112,30; 115,46	112,56; 115,25; 115,37
C6	120,19	120,51
C1	132,16	130,44
C2'	138,00	138,22
C3; C4	147,14; 148,68	144,71; 147,47
<b>DC:</b>		
$R_f$ (EtOAc/Hexan 1:4)	0,63	0,63
<b>HPLC-UV</b>		
$t_R$ [min]	24,8	24,3
$\lambda_{max}$ (abs. Absorption; mAU)	228 (620), 280 (320) nm	228 (580), 280 (260) nm
<b>LC-ESI-MS/MS (<math>m/z</math>)</b>	227,2; 96,8; 163,2	227,2; 96,8; 163,2
Fragmente (163,2) ( $m/z$ )	147,8	147,8
<b>Reinheit (<math>^1H</math>-NMR)</b>	min. 85 %	> 99 % (DAC03)

## 7.6.5 Synthese von (RS)-1'-Hydroxymethyleugenol (**11**)

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Borchert *et al.* (1973b):

Unter Argon-Atmosphäre wird in einer ausgeheizten Apparatur Veratrumaldehyd (**10**; 5,00 g; 30,0 mmol) in 120 ml trockenem THF gelöst und bei 0 °C Vinylmagnesiumbromid (33,0 ml; 1,0 M in THF; 33,0 mmol) innerhalb von 30 Minuten zur Lösung hinzugegeben. Die Lösung wird auf 60 °C erhitzt und für weitere 2 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und mit 200 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird über ca. 10 g Kieselgel mit Ethylacetat filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 5,57 g (28,7 mmol, 96%, weißer Feststoff)  
 $M(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** 99,3 %

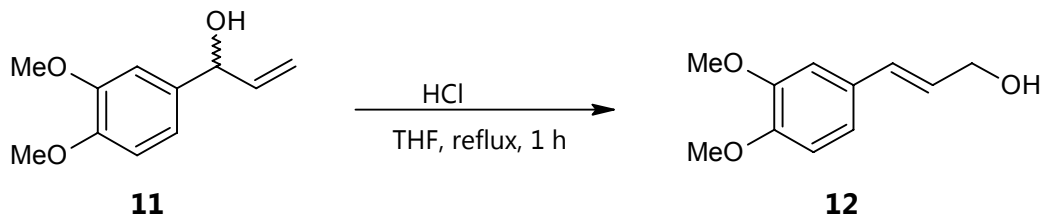
### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC90)  $\delta$  [ppm]: 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,97 (t, 1H, H3'<sub>Z</sub>,  $^3J_{\text{H}3',\text{H}2'Z} = 5,1 \text{ Hz}$ ); 5,03 (d, 1H, H3'<sub>E</sub>,  $^3J_{\text{H}3',\text{H}2'E} = 10,2 \text{ Hz}$ ); 5,22 (dt, 1H, H1',  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 17,0 \text{ Hz}$ ); 5,41 (d, 1H, OH,  $^3J_{\text{OH},\text{H}1'} = 4,4 \text{ Hz}$ ); 5,93 (m; 1H, H2'); 6,82 (dd, 1H, H6,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}5} = 8,5 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H}6,\text{H}2} = 1,6 \text{ Hz}$ ); 6,87 (d, 1H, H5,  $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8,5 \text{ Hz}$ ); 6,90 (d, 1H, H2,  $^4J_{\text{H}2,\text{H}6} = 1,6 \text{ Hz}$ );  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz, 295K, DAC20C)  $\delta$  [ppm]: 55,9 (OCH<sub>3</sub>); 56,1 (OCH<sub>3</sub>); 73,7 (C1'); 110,7 (C2); 112,2 (C5); 113,5 (C3'); 118,8 (C6); 137,4 (C1); 142,7 (C2'); 148,3 (C4); 149,1 (C3); **DC:**  $R_f$  (**10**) = 0,47 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**11**) = 0,32 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV) = 17,1 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); **UV/Vis** (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 233 (280), 278 (100) nm; **IR (Film):**  $\tilde{\nu} = 3583, 3504, 3078, 3002, 2936, 2836, 1735, 1640, 1594, 1515, 1464, 1418, 1374, 1339, 1262, 1234, 1186, 1155, 1139, 1028, 992, 926, 860, 813, 785, 763, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; **LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ): 217,3; 233,2; 177,2; Fragmente (177,2): 146,1; 162,0; 121,1; 117,1.

## 7.6.6 Synthese von (*E*)-3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**)

(2*E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift (Solheim und Scheline, 1976):

(*RS*)-1'-Hydroxymethyleugenol (**11**; 2,0 g; 10,3 mmol) wird in 50 ml THF gelöst, mit 5,0 ml verdünnter Salzsäure (0,05 M) versetzt und für *ca.* eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, bis das Edukt vollständig umgesetzt ist. Die Lösung wird abgekühlt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 1,68 g (8,65 mmol, 84 %, farbloser Feststoff)  
 $M(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** *ca.* 90 %

### Charakterisierung:

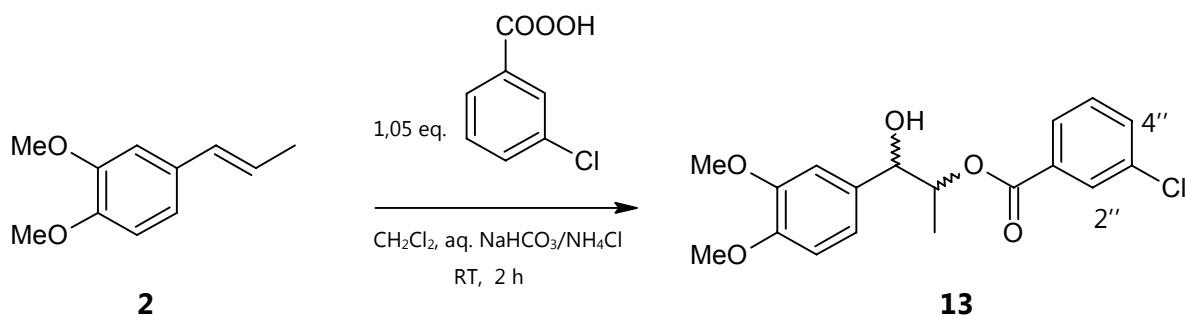
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, IG-03; SS-3-4-F27):

$\delta$  [ppm]: 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,07 (pt, 2H, H3'); 4,80 (t, 1H, OH,  $J = 5,4 \text{ Hz}$ ); 6,23 (dt, 1H, H2',  $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 16,0 \text{ Hz}$ ,  $J = 5,4 \text{ Hz}$ ); 6,44 (d, 1H, H1',  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 16,0 \text{ Hz}$ ); 6,88 (ps; 2H, H5, H6); 7,03 (s, 1H, H2); DC:  $R_f$  (**11**) = 0,50 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**12**) = 0,36 (EtOAc/Hexan 1:1);  $t_R$  (HPLC-UV) = 17,4 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 214 (780), 263 (580), 300 (220) nm; IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3583, 3414, 2255, 2128, 1659, 1050, 1025, 1005, 825, 764, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 217,3; 233,2; 177,3; Fragmente (177,3): 146,1; 162,1; 121,3; 117,0.

## 7.6.7 Synthese von 1',2'-Dihydro-1'-hydroxy-2'-*meta*-chlorbenzoesäure- methylisoeugenol (**13**)

3-Chlorbenzoesäure-(1*RS*,2*RS*)-2-(1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-hydroxypropylester

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Fieser (1967):

Methylisoeugenol (**2**, 1,00 g; 5,61 mmol) wird in Dichlormethan (15 ml) gelöst und mit einem Gemisch von gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Ammoniumchloridlösung (1:1; 20 ml) versetzt. Bei Raumtemperatur wird unter Rühren *meta*-Chlorperbenzoesäure (70%ig; 1,45 g; 5,88 mmol), gelöst in Dichlormethan (10 ml) hinzugegeben. Die Mischung wird nun für zwei Stunden kräftig gerührt, so dass eine gute Durchmischung der wässrigen und organischen Phase gewährleistet ist. Nach beendeter Reaktion wird die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase noch dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet.

**Ausbeute:** 1,90 g (5,42 mmol; 97 %, hellgelber FS)

$M(C_{18}H_{19}ClO_5) = 350,79 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** 98 %

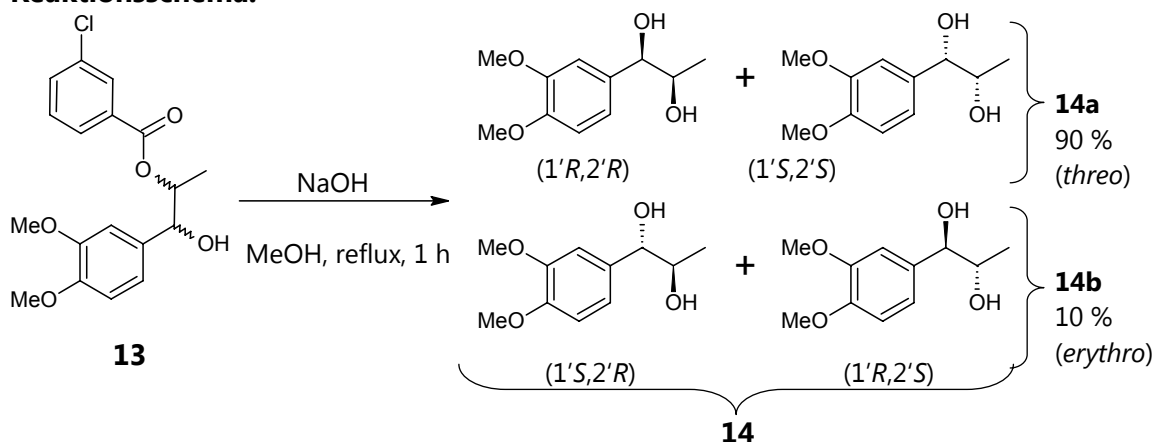
### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, DAC17)  $\delta$  [ppm]:

0,95 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $^3J_{\text{H}3',\text{H}2'} = 6,12 \text{ Hz}$ ; 90 %); [1,08 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ;  $^3J_{\text{H}3',\text{H}2'} = 6,44 \text{ Hz}$ ; 10 %]; 3,71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4,05 (sext, 1H,  $\text{H}2'$ ); 5,14 (d, 1H,  $\text{H}1'$ ); 5,59 (d, 1H, OH); 6,90 (d, 1H,  $\text{H}5$ ,  $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7,8 \text{ Hz}$ ); 6,94 (dd, 1H,  $\text{H}6$ ,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}5} = 7,8 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H}5,\text{H}2} = 1,7 \text{ Hz}$ ); 7,00 (d, 1H,  $\text{H}2$ ,  $^4J_{\text{H}2,\text{H}6} = 1,7 \text{ Hz}$ ); 7,56 (t, 1H,  $\text{H}5''$ ,  $^3J_{\text{H},\text{H}} = 7,8 \text{ Hz}$ ); 7,72 (dd, 1H,  $\text{H}4''$ ,  $^3J_{\text{H}4'',\text{H}5''} = 8,2 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H},\text{H}} = 1,4 \text{ Hz}$ ); 7,98 (d, 1H,  $\text{H}6''$ ,  $^3J_{\text{H}6'',\text{H}5''} = 7,8 \text{ Hz}$ ); 8,07 (t, 1H,  $\text{H}2''$ ,  $^4J_{\text{H},\text{H}} = 1,4 \text{ Hz}$ ); **DC:**  $R_f$  (**2**) = 0,76 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**13**) = 0,31 (EtOAc/Hexan 1:2); **IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3515, 3069, 2972, 2936, 2908, 2837, 1721, 1606, 1594, 1518, 1465, 1422, 1346, 1321, 1256, 1161, 1139, 1087, 1073, 1027, 978, 897, 866, 849, 809, 793, 749, 737, 702, 674, 665, 645 \text{ cm}^{-1}$ .

7.6.8 Synthese von 1',2'-Dihydrodihydroxymethylisoeugenol (**14**)(1*RS*,2*RS*)-1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol

## Reaktionsschema:



## Synthsevorschritt:

**13** (1,83 g; 5,23 mmol) wird in 30 ml Methanol gelöst und Natriumhydroxid (1,56 g, 39,0 mmol), gelöst in 10 ml Methanol zugegeben. Die Lösung wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Mit verdünnter Salzsäure und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung wird auf pH 10 eingestellt und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

**Ausbeute:** 1,00 g (4,74 mmol, 91 %, weiß-beiger FS);  $M(C_{11}H_{16}O_4) = 212,24$  g/mol bestehend aus: 90 % **14a** (*threo*) und 10 % **14b** (*erythro*).

## Charakterisierung:

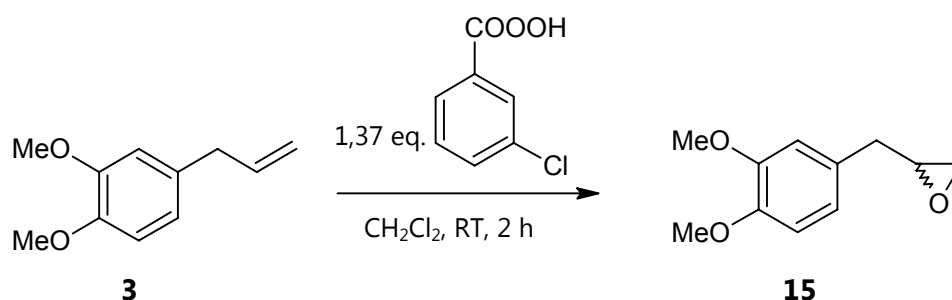
	<b>14a</b> ( <i>threo</i> )	<b>14b</b> ( <i>erythro</i> )
<b><sup>1</sup>H-NMR-Signal</b> $\delta$ [ppm]	DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz, 295K, DAC19	
H3' (s, 3H)	0,81 ( <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'</sub> = 6,28 Hz)	0,97 ( <sup>3</sup> J <sub>H2',H3'</sub> = 5,88 Hz)
2 x OMe (2, 3H)	3,709; 3,714	
H2' (m, 1H)	3,60	
H1' (m, 1H)	4,18 („dd“; J = 4,32 Hz)	4,27 („t“; J = 4,6 - 5,1 Hz)
OH (d, 1H)	4,51 ( <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 4,32 Hz)	4,36 ( <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 5,48 Hz)
OH (d, 1H)	5,05 ( <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 4,28 Hz)	5,02 ( <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 4,28 Hz)
H6 (dd, 1H)	6,79 ( <sup>3</sup> J <sub>H6,H5</sub> = 8,2 Hz, <sup>4</sup> J <sub>H6,H2</sub> = 1,6 Hz)	
H5 (d, 1H)	6,85 ( <sup>3</sup> J <sub>H5,H6</sub> = 8,2 Hz)	
H2 (d, 1H)	6,88 ( <sup>4</sup> J <sub>H2,H6</sub> = 1,6 Hz)	
<b>DC</b>		
R <sub>f</sub> (EtOAc/Hexan 1:3)	0,14	0,14
<b>HPLC-UV</b>		
t <sub>R</sub>	11,1 min (280 nm; 450 μM)	8,5 min (280 nm; 50 μM)
λ <sub>max</sub> (abs. Absorption/mAU)	230 (135), 277 (35) nm	232 (22), 277 (8) nm
<b>IR</b> (KBr, 9:1-Gemisch), $\tilde{\nu}$ =	3411, 3274, 2964, 2930, 2834, 1606, 1594, 1520, 1460, 1420, 1373, 1343, 1260, 1239, 1160, 1146, 1079, 1057, 1025, 910, 819, 789, 764, 644, 618, 598, 543, 421 cm <sup>-1</sup>	
<b>LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS</b> (m/z)	235,2; 230,3; 195,3	
<b>Reinheit</b> ( <sup>1</sup> H-NMR)	99 %	



## 7.6.9 Synthese von (2'*RS*)-Methyleugenolepoxid (**15**)

(*RS*)-2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Fieser (1967):

Methyleugenol (**3**; 1,05 g, 5,86 mmol) wird in 25 ml Dichlormethan gelöst und mit 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Bei Raumtemperatur wird unter Rühren *meta*-Chlorperbenzoesäure (70%ig, 1,98 g, 8,03 mmol), gelöst in 15 ml Dichlormethan hinzugegeben. Das Gemisch wird für zwei Stunden kräftig gerührt, so dass eine gute Durchmischung der wässrigen und organischen Phase gewährleistet ist. Nach beendeter Reaktion wird die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase noch dreimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels *Flash*chromatographie gereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 648 mg (3,34 mmol, 57 %, orangefarbenes Öl)

$M(C_{11}H_{14}O_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** 99 %

### Charakterisierung:

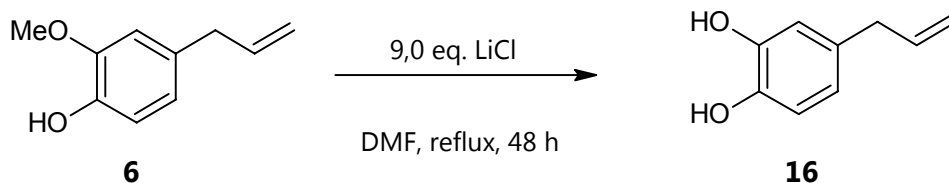
$^1\text{H-NMR}^1$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, DAC33)  $\delta$  [ppm]: 2,53 (m, 1H, H3'<sub>a</sub>); 2,70 (m, 3H, 2 x H1', H3'<sub>b</sub>); 3,07 (m, 1H, H2'); 3,71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,76 (dd, 1H, H6,  $^3J_{H_6,H_5} = 8,2 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{H_5,H_2} = 1,4 \text{ Hz}$ ); 6,86 (pd, 2H, H2, H5,  $^3J_{H_5,H_6} = 8,2 \text{ Hz}$ ); **DC**:  $R_f$  (**1**) = 0,60 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**15**) = 0,29 (EtOAc/Hexan 1:3);  $t_R$  (HPLC-UV) = 18,8 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); **UV/Vis** (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (210), 278 (90) nm; **IR** (Film):  $\tilde{\nu} = 3583, 3414, 2997, 2936, 2836, 2281, 1719, 1650, 1606, 1591, 1518, 1465, 1420, 1335, 1262, 1237, 1157, 1141, 1028, 970, 833, 811, 765, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; **LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ): 195,3; Fragmente (195,3) 151,0; 177,1; 165,0.

<sup>1</sup> Die Auswertung dieses Spektrums nach erster Ordnung ist nicht möglich, da die Signale der diastereotopen Protonen in 1'- und 3'-Position zufällig in komplizierten Multipletts zusammenfallen und so ein Signal bilden.

### 7.6.10 Synthese von 3,4-Dihydroxyeugenol (**16**)

4-(2-Propen-1-yl)-benzen-1,2-diol

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift (Kraft *et al.*, 2003):

Unter Argon-Atmosphäre wird in einer ausgeheizten Apparatur Eugenol (**6**; 5,42 g; 33,0 mmol) in 80 ml trockenem DMF gelöst und mit 3 Äquivalenten Lithiumchlorid (4,20 g, 99,0 mmol) versetzt. Die erhaltene Suspension wird unter Rückfluss erhitzt, bis das gesamte Lithiumchlorid gelöst ist. Nach 22 und 29 Stunden werden je weitere drei Äquivalente Lithiumchlorid hinzugegeben und weiter zum Rückfluss erhitzt. Nach 48 Stunden wird auch durch erneutes Zugabe von Lithiumchlorid keine Umsatzsteigerung mehr erzielt. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt, mit 200 ml halbgesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und für 30 Minuten gerührt. Nun wird mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige Phase noch dreimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 2,04 g (13,6 mmol, 41 %, gelbe Kristalle);  $M(C_9H_{10}O_2) = 150,17 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** ca. 97 %

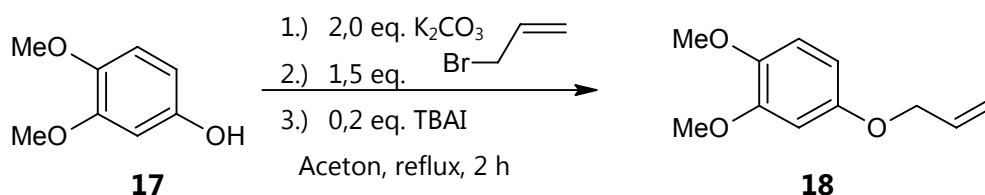
#### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC105)  $\delta$  [ppm]: 3,15 (d, 2H, H1',  $^3J_{H1',H2'} = 6,84 \text{ Hz}$ ); 4,99 (ps, 1H, H3'E); 5,00 (dd, 1H, H3'Z,  $^3J_{H3'Z,H2'} = 28,2 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{H3'Z,H3'E} = 1,7 \text{ Hz}$ ); 5,86 (m, 1H, H2'); 6,40 (dd, 1H, H6,  $^3J_{H6,H5} = 8,2 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{H6,H2} = 1,7 \text{ Hz}$ ); 6,54 (d, 1H, H2,  $^3J_{H2,H6} = 1,7 \text{ Hz}$ ); 6,62 (d, 1H, H5,  $^4J_{H5,H6} = 8,2 \text{ Hz}$ ); 8,69 (s, br, 2H, OH);  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz, 295K, DAC30-C):  $\delta$  [ppm]: 38,9 (C1'); 115,0 (C2); 115,5, 115,8 (C3', C5); 119,0 (C6); 130,4 (C1); 138,3 (C2'); 143,4 (C4); 145,1 (C3); DC:  $R_f$  (**6**) = 0,68 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**16**) = 0,38 (EtOAc/Hexan 1:3);  $t_R$  (HPLC-UV) = 19,1 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 221 (150), 282 (70) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3370, 3078, 2978, 2903, 2835, 1638, 1605, 1524, 1444, 1354, 1281, 1258, 1194, 1147, 1113, 995, 964, 914, 863, 813, 788, 758, 650, 591, 455, 419 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI-MS/MS ( $m/z$ ): 299,4; 185,3; 263,3; 195,3; 187,2; 149,2.

### 7.6.11 Synthese von 1-Allyloxy-3,4-dimethoxybenzen (**18**)

1,2-Dimethoxy-4-(2-propen-1-yloxy)-benzen

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift (Benbow und Katoch-Rouse, 2001; Procedure B):

Unter Argon-Atmosphäre wird in einer ausgeheizten Apparatur 3,4-Dimethoxyphenol (**17**; 3,87 g; 25,1 mmol) in 100 ml getrocknetem Aceton gelöst und bei RT Kaliumcarbonat (6,91 g; 50 mmol) und Tetrabutylammoniumiodid (TBAI, 1,85 g; 5,0 mmol) zugegeben. Die Suspension wird gerührt und Allylbromid (4,54 g, 3,24 ml, 37,5 mmol), gelöst in 6,7 ml Aceton, innerhalb von 30 Minuten bei RT zugetropft. Hiernach wird die Suspension bis zum Rückfluss erhitzt und für ca. 1,5 Stunden gerührt, bis die Reaktion beendet ist. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml halbgesättigter NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 4,84 g (24,9 mmol, 99 %, hellgelbes Öl);

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** min. 99 %

#### Charakterisierung:

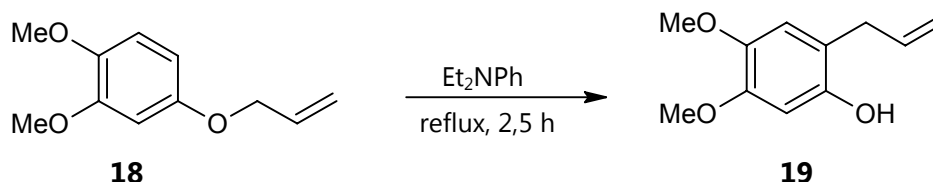
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC10)  $\delta$  [ppm]: 3,67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,47 (dt, 2H, H1', <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5,0 Hz); 5,22\* (dd, 1H, H3', J = 10,5 Hz, J = 1,2 Hz); 5,37\* (dd, 1H, H3', J = 17,3 Hz, J = 1,72 Hz); 6,00 (m, 1H, H2'); 6,42 (dd; 1H, H6; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>6</sub>,H<sub>5</sub></sub> = 8,6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H<sub>6</sub>,H<sub>2</sub></sub> = 2,7 Hz); 6,58 (d, 1H, H2, <sup>4</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,H<sub>6</sub></sub> = 2,7 Hz); 6,82 (d, 1H, H5, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub></sub> = 8,6 Hz); DC: R<sub>f</sub> (**17**) = 0,29 (EtOAc/Hexan 1:3); R<sub>f</sub> (**18**) = 0,56 (EtOAc/Hexan 1:3); IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3583, 3081, 2934, 2833, 1647, 1611, 1597, 1513, 1465, 1452, 1426, 1362, 1280, 1260, 1228, 1199, 1163, 1140, 1123, 1028, 927, 835, 789, 766, 666 cm<sup>-1</sup>.

\*Anhand der Kopplungskonstanten und der Karplus-Beziehung, würde man die Signale bei  $\delta = 5,22$  und 5,37 ppm H3'(Z) und H3'(E) zuordnen. Die <sup>1</sup>H-NMR-Prädiktion, die ChemDraw 10 vorschlägt, deckt sich mit dem beobachteten Spektrum, aber mit vertauschten Protonen.

## 7.6.12 Synthese von 6-Hydroxymethyleugenol (**19**)

4,5-Dimethoxy-2-(2-propen-1-yl)-phenol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift (Benbow und Katoch-Rouse, 2001):

Unter Argon-Atmosphäre wird in einer ausgeheizten Apparatur der Allylether (**18**; 4,62 g; 23,8 mmol) in 35 ml *N,N*-Diethylanilin gelöst und für zweieinhalb Stunden unter Rückfluss kräftig erhitzt (230–240 °C). Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch abgekühlt und mit 100 ml Diethylether sowie 100 ml verdünnter Salzsäure versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige Phase noch zweimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan).

**Ausbeute:** 4,57 g (23,5 mmol, 99 %, hellgraue Kristalle);

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** > 99 %

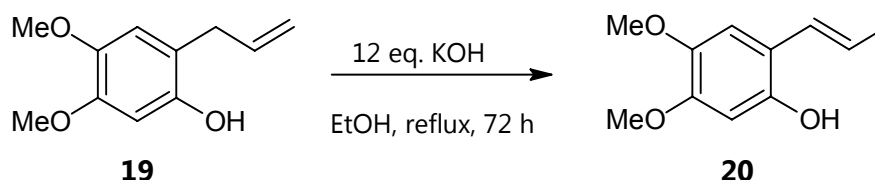
### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 294K, PAC61)  $\delta$  [ppm]: 3,18 (d, 2H, H1',  $J = 6,4 \text{ Hz}$ ); 3,62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,98 (m, 2H, H3'); 5,82 (m; 1H, H2'); 6,43 (s, 1H, H6); 6,60 (s, 1H, H5); 8,86 (s, 1H, OH);  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 297K, PAC61C)  $\delta$  [ppm]: 33,3; 55,4; 56,5; 101,0; 114,8; 114,9; 116,6; 137,6; 141,6; 147,8; 148,8; DC:  $R_f$  (**18**) = 0,73 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**19**) = 0,41 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV) = 20,4 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (260), 290 (170) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3445, 3077, 3002, 2937, 2911, 2836, 1637, 1617, 1523, 1465, 1451, 1415, 1360, 1295, 1238, 1203, 1114, 1030, 999, 916, 847, 756, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 195,3; Fragmente (195,3): 154,0; 180,1; 139,2; 163,3.

### 7.6.13 Synthese von (*E*)-6-Hydroxymethylisoeugenol (**20**)

4,5-Dimethoxy-2-[(1*E*)-1-propen-1-yl]-phenol

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift modifiziert nach Shulgin (1965):

In 5 ml trockenem Ethanol wird unter Argon-Atmosphäre 6-Hydroxymethyleugenol (**19**; 4,5 g; 23,2 mmol) zusammen mit Kaliumhydroxid (11,2 g; 0,20 mol) für 7 Tage bei 140–150 °C erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC überwacht. Nach 48 und 96 Stunden werden nochmals die gleichen Mengen Kaliumhydroxid (11,2 g; 0,20 mol) zugegeben. Nach beendeter Reaktion wird Wasser (500 ml) zum Reaktionsgemisch gegeben und die Lösung mit Schwefelsäure neutralisiert. Die Lösung wird viermal mit 150 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt (4,2 g) wird säulenchromatographisch vorgereinigt (Kieselgel; Ethylacetat/Hexan) und aus Ethylacetat/Pentan aus- bzw. umkristallisiert.

**Ausbeute:** 2,80 g (14,4 mmol, 62 %, hellgelbe Kristallnadeln)

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 194,23 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** 98,5 %

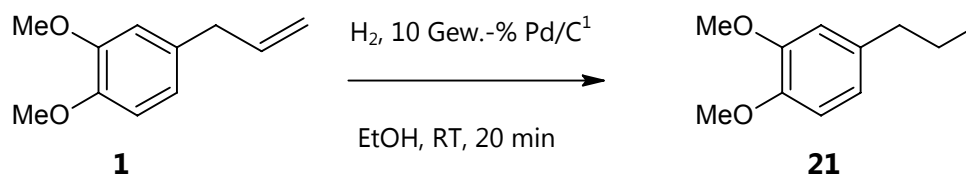
#### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz; 294K, PAC60)  $\delta$  [ppm]: 1,7 (dd, 3H, CH<sub>3</sub>,  $J = 6,4 \text{ Hz}$ ,  $J = 1,2 \text{ Hz}$ ); 3,66 (s, 6H, 2 OCH<sub>3</sub>); 6,04 (m, 1H, H2'); 6,41 (s, 1H, H5); 6,51 (dd, 1H, H1',  $J = 16,4 \text{ Hz}$ ,  $J = 1,4 \text{ Hz}$ ); 6,83 (s, 1H, H2); 9,05 (s; 1H, OH); <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta$  [ppm]: 18,6, 55,3; 56,2; 100,9; 110,0; 115,5; 121,9; 125,6; 142,0; 148,2; 148,6 ppm; DC:  $R_f$  (**19**) = 0,41 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**20**) = 0,41 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV): 21,7 min (261 nm, 500  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 215 (1100), 257 (700), 315 (350) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3405, 3040, 3009, 2995, 2956, 2932, 2848, 1615, 1524, 1454, 1419, 1375, 1297, 1266, 1204, 1115, 1033, 999, 970, 940, 873, 827, 753, 684, 538, 472 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 195,3; Fragmente (195,3): 167,1; 163,0; 180,0; 135,1; 154,0.

### 7.6.14 Synthese von 3,4-Dimethoxypropylbenzen (21)

1,2-Dimethoxy-4-propylbenzen

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift:

Unter Argon-Atmosphäre wird in einer ausgeheizten Hydrierapparatur Methyleugenol (**1**; 3,00 g; 16,8 mmol) in 30 ml Ethanol gelöst und 289 mg Palladium auf Aktivkohle<sup>1</sup> (10 Gew.-% bezogen auf **3**) hinzugegeben. Die Apparatur wird dreimal mit Wasserstoff gespült und die Suspension bei einem Überdruck von 50 cm Wassersäule kräftig gerührt. Wird kein Wasserstoff mehr verbraucht ist die Reaktion beendet (ca. 20 Minuten). Insgesamt werden 381 cm<sup>3</sup> Wasserstoff verbraucht (17,0 mmol). Die Aktivkohle wird filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 2,99 g (16,6 mmol, 99 %; farbloses Öl)

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2) = 180,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** > 99 %

#### Charakterisierung:

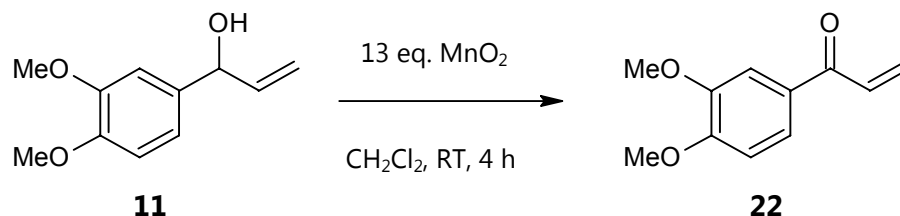
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, DAC42)  $\delta$  [ppm]: 0,86 (t, 3H, H3', <sup>3</sup>J<sub>H3',H2'</sub> = 7,5 Hz); 1,54 (sext, 2H, H2', <sup>3</sup>J<sub>H2',H1'+H3'</sub> = 7,48 Hz); 2,46 (t, 2H, H1', <sup>3</sup>J<sub>H1',H2'</sub> = 7,5 Hz); 3,69 (s, 3H, OMe); 3,71 (s, 3H, OMe); 6,66 (dd, 1H, H6, <sup>3</sup>J<sub>H6,H5</sub> = 8,2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H6,H2</sub> = 1,7 Hz); 6,75 (d, 1H, H2, <sup>4</sup>J<sub>H2,H6</sub> = 1,7 Hz); 6,81 (d, 1H, H5; <sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub> = 8,2 Hz); DC:  $R_f$  (**1**) = 0,50 (EtOAc/Hexan 1:4);  $R_f$  (**21**) = 0,57 (EtOAc/Hexan 1:4);  $t_R$  (HPLC-UV) = 31,5 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (270), 280 (100) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 2997, 2957, 2932, 2870, 2834, 1607, 1590, 1516, 1465, 1416, 1377, 1341, 1262, 1236, 1191, 1156, 1141, 1092, 1031, 846, 806, 764, 666 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 181,2; Fragmente (181,2): 138,0; 151,0; 164,0.

<sup>1</sup> 10 % Pd

## 7.6.15 Synthese von 1'-Oxomethyleugenol (**22**)

1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-on

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift (Perrier *et al.*, 1999):

Unter Argon-Atmosphäre wird 1'-Hydroxymethyleugenol (**11**; 798 mg; 4,11 mmol) in 20 ml Dichlormethan gelöst und Mangandioxid<sup>1</sup> (4,80 g, 55,2 mmol) hinzugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Suspension über Celite filtriert und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lsgm. wird entfernt und das Produkt an einer präparativen HPLC vom entstandenen Nebenprodukt (ca. 50 % Veratrumaldehyd, **10**) getrennt.

**Ausbeute:** 300 mg (1,56 mmol, 38 %, hellgelbes Öl);

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3) = 192,21 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** 97,8 %

### Charakterisierung:

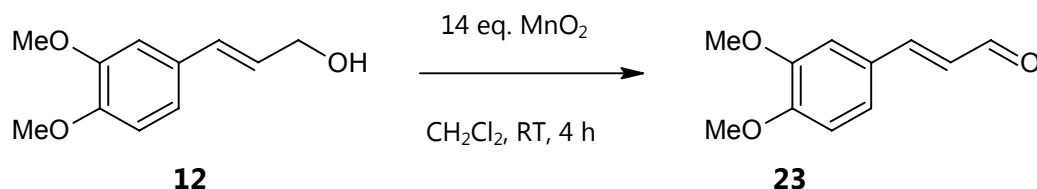
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, DAC54)  $\delta$  [ppm]: 3,82 (s, 3H, OMe); 3,84 (s, 3H, OMe); 5,88 (dd, 1H, H3'<sub>Z</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H3'Z,H2'</sub> = 10,6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H3',H3'</sub> = 2,0 Hz); 6,32 (dd, 1H, H3'<sub>E</sub>, <sup>3</sup>J<sub>H3'E,H2'</sub> = 17,0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H3',H3'</sub> = 2,0 Hz); 7,07 (d, 1H, H5, <sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub> = 8,6 Hz); 7,43 (dd, 1H, H2', <sup>3</sup>J<sub>H2',H3'Z</sub> = 10,6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2',H3'E</sub> = 17,0 Hz); 7,49 (d, 1H, H2, <sup>3</sup>J<sub>H2,H5</sub> = 2,0 Hz); 7,72 (dd, 1H, H6, <sup>3</sup>J<sub>H6,H5</sub> = 8,6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6,H2</sub> = 2,0 Hz); <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 295 K, FG\_04)  $\delta$  [ppm]: 55,5; 55,8; 110,6; 110,9; 123,5; 129,1; 129,6; 132,1; 148,8; 153,4; 187,9; DC: R<sub>f</sub> (**11**) = 0,32 (EtOAc/Hexan 1:4); R<sub>f</sub> (**22**) = 0,55 (EtOAc/Hexan 1:4); t<sub>R</sub> (HPLC-UV) = 19,5 min (261 nm; 1,0 mM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (1800), 290 (1000), 325 (1200) nm; IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3083, 3005, 2962, 2937, 2840, 1662, 1594, 1583, 1553, 1540, 1515, 1464, 1452, 1421, 1403, 1341, 1267, 1208, 1168, 1151, 1132, 1098, 1023, 982, 882, 868, 814, 783, 767, 725, 665, 625 cm<sup>-1</sup>; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS (*m/z*): 193,2; Fragmente (193,2): 55,0; 162,0; 137,1; 165,0; 151,0; 175,0.

<sup>1</sup> „aktiv“, Fluka Nr. 63548

### 7.6.16 Synthese von (*E*)-3'-Oxomethylisoeugenol (**23**)

(*2E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propenal

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift modifiziert nach Bürgi *et al.* (1993):

Unter Argon-Atmosphäre wird 3'-Hydroxymethylisoeugenol (**12**; 259 mg; 1,33 mmol) in 20 ml Dichlormethan gelöst und Mangandioxid<sup>1</sup> (1,62 g, 18,6 mmol) hinzugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Nach beendeter Reaktion wird die Suspension über Celite filtriert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt an einer präparativen HPLC vom entstandenen Nebenprodukt (ca. 40 % Veratrumaldehyd) getrennt.

**Ausbeute:** 119 mg (0,62 mmol, 47 %, hellgelbe Kristalle)

$M(C_{11}H_{12}O_3) = 192,21 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** ca. 88 %

#### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC111)  $\delta$  [ppm]: 3,80 (s, 6H, 2 OMe); 6,78 (dd, 1H, H2', <sup>3</sup>J<sub>H2',H3'</sub> = 7,8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2',H1'</sub> = 15,64 Hz); 7,02 (d, 1H, H5, <sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub> = 8,2 Hz); 7,27 (dd, 1H, H6, <sup>3</sup>J<sub>H6,H5</sub> = 8,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6,H2</sub> = 1,6 Hz); 7,35 (d, 1H, H2, <sup>3</sup>J<sub>H2,H6</sub> = 1,6 Hz); 7,62 (d, 1H, H1', <sup>3</sup>J<sub>H1',H2'</sub> = 15,6 Hz); 9,60 (d, 1H, H3', <sup>3</sup>J<sub>H3',H2'</sub> = 7,8 Hz); <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 295 K, FG\_17)  $\delta$  [ppm]: 55,6 (2x); 110,5; 111,6; 123,8; 126,6; 126,9; 149,1; 151,6; 153,6; 194,1; DC:  $R_f$  (**12**) = 0,25 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**23**) = 0,39 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV) = 19,8 min (261 nm; 1,0 mM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{max}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (2600), 240 (3000), 300 (3000), 360 (2750) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3437, 2929, 2838, 1667, 1619, 1597, 1512, 1469, 1426, 1400, 1273, 1225, 1165, 1129, 1037, 1017, 984, 794, 581 \text{ cm}^{-1}$ ; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 193,2; Fragmente (193,2): 161,0; 175,0; 137,1; 55,2.

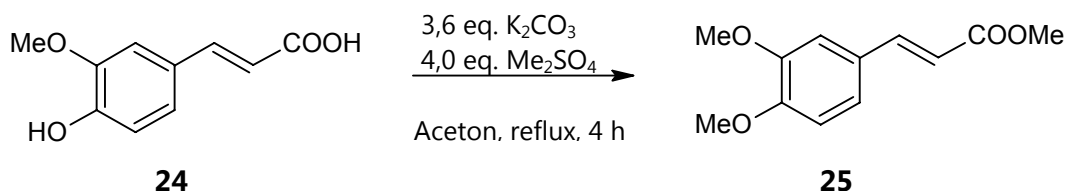
<sup>1</sup> „aktiv“, Fluka Nr. 63548



## 7.6.17 Synthese von (*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäuremethylester (**25**)

Methyl-(*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoat

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift:

Unter Argon-Atmosphäre wird *trans*-Ferulasäure (**24**; 1,06 g; 5,46 mmol) in 40 ml trockenem Aceton gelöst und Kaliumcarbonat (2,80 g, 20,3 mmol) sowie Dimethylsulfat (2,78 g, 21,8 mmol, 2 ml) hinzugegeben. Die Suspension wird 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit 50 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und noch dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

**Ausbeute:** 1,20 g (5,41 mmol, 99 %; gelbe Kristalle)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4) = 222,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** ca. 97 %

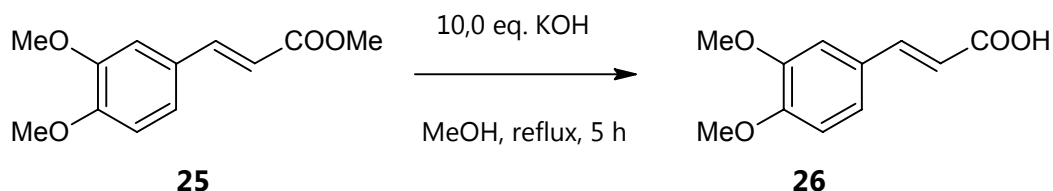
### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 293K, DAC57)  $\delta$  [ppm]: 3,70 (s, 3H, COOMe); 3,78 (s, 3H, OMe); 3,79 (s, 3H, OMe); 6,55 (d, 1H, H2',  $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 16,0 \text{ Hz}$ ); 6,96 (d, 1H, H5,  $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8,6 \text{ Hz}$ ); 7,23 (dd, 1H, H6,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}5} = 8,6 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}2} = 1,6 \text{ Hz}$ ); 7,34 (d, 1H, H2,  $^3J_{\text{H}2,\text{H}6} = 1,6 \text{ Hz}$ ); 7,58 (d, 1H, H1',  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 16,0 \text{ Hz}$ ); DC:  $R_f$  (**24**) = 0,23 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**25**) = 0,58 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV) = 25,2 min (261 nm; 1,0 mM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 218 (850), 240 (900), 300 (1100), 323 (1400) nm; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3444, 2944, 2840, 1697, 1640, 1626, 1596, 1511, 1465, 1440, 1422, 1339, 1252, 1232, 1177, 1162, 1145, 1039, 1022, 984, 925, 870, 857, 815, 777, 756, 700, 605, 567, 511 \text{ cm}^{-1}$ .

### 7.6.18 Synthese von (*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäure (**26**)

(*E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propensäure

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift:

(*E*)-3,4-Dimethoxyzimtsäuremethylester (**25**; 1,03 g; 4,63 mmol) wird in 35 ml Methanol gelöst und Kaliumhydroxid (2,58 g, 46,0 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wird fünf Stunden unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung mit Salzsäure auf pH = 9 eingestellt und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird dreimal mit je 100 ml 0,1 M HCl gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen noch einmal mit 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und im Ölpumpenvakuum entfernt.

**Ausbeute:** 947 mg (4,55 mmol, 98 %; weißes Pulver)

$M(\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4) = 208,21 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** min. 94 %

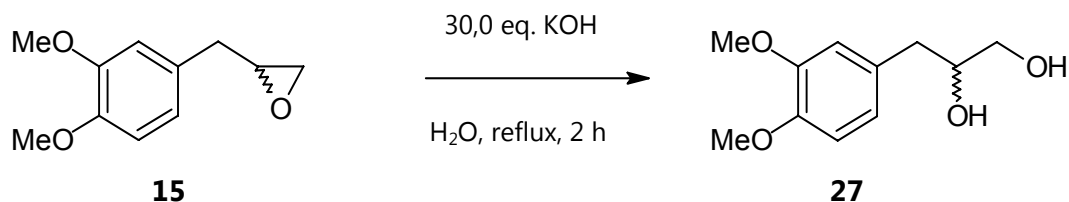
#### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz, 295K, DAC58)  $\delta$  [ppm]: 3,78 (s, 3H, OMe); 3,79 (s, 3H, OMe); 6,42 (d, 1H, H2',  $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 15,8 \text{ Hz}$ ); 6,96 (d, 1H, H5,  $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8,2 \text{ Hz}$ ); 7,18 (dd, 1H, H6,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}5} = 8,2 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{H}6,\text{H}2} = 2,0 \text{ Hz}$ ); 7,30 (d, 1H, H2,  $^3J_{\text{H}2,\text{H}6} = 2,0 \text{ Hz}$ ); 7,50 (d, 1H, H1',  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 15,8 \text{ Hz}$ ); 12,19 (s, br, 1H, COOH); **DC**:  $R_f$  (**25**) = 0,58 (EtOAc/Hexan 1:2);  $R_f$  (**26**) = 0,24 (EtOAc/Hexan 1:2);  $t_R$  (HPLC-UV) = 7,0 min (280 nm; 0,5 mM); **UV/Vis** (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 215 (600), 230 (540), 285 (590), 312 (580) nm; **IR** (KBr):  $\tilde{\nu} = 3447, 2937, 2841, 1683, 1625, 1596, 1584, 1516, 1457, 1426, 1408, 1340, 1315, 1299, 1263, 1210, 1169, 1141, 1024, 976, 939, 840, 811, 580 \text{ cm}^{-1}$ ; **LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ): 209,2; Fragmente (209,2): 191,0; 167,0; 163,0; 147,5.

## 7.6.19 Synthese von (RS)-2',3'-Dihydroxymethyleugenol (27)

3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift:

Methyleugenolepoxid (**15**; 101 mg; 0,52 mmol) wird in 5 ml Wasser suspendiert und Kaliumhydroxid (847 mg, 15,1 mmol KOH) versetzt, wobei die Substanz in Lösung geht und die Lösung ihre Farbe von leuchtend gelb über pink zu orange-braun ändert. Die Lösung wird zwei Stunden unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Salzsäure angesäuert (pH 5-6). Das Gemisch wird dreimal mit je 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

**Ausbeute:** 76,0 mg (0,36 mmol, 69 %; weißer Feststoff)

$M(C_{11}H_{16}O_4) = 212,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** > 70 %

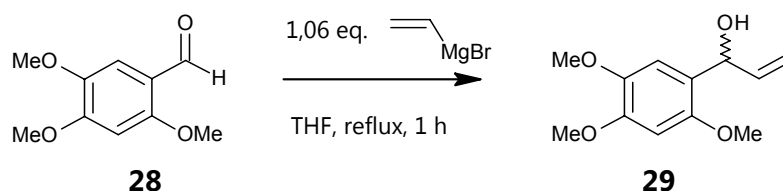
### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz, 295K, DAC50)  $\delta$  [ppm]: 2,45 u. 2,67 (m, 2H, H1'); 3,26 (m, 2H, H3'); 3,59 (m, 1H, H2'); 3,69 (s, 3H, OMe); 3,71 (s, 3H, OMe); 4,51 (ps, br, 2H, OH); 6,69 (dd, 1H, H6, <sup>3</sup>J<sub>H6,H5</sub> = 8,2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H6,H2</sub> = 1,8 Hz); 6,79 (d, 1H, H2, <sup>3</sup>J<sub>H2,H6</sub> = 1,8 Hz); 6,81 (d, 1H, H5, <sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub> = 8,2 Hz); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 294K, DAC51)  $\delta$  [ppm]: 2,47 (m, 2H, H1'); 3,13 u. 3,20 (m, 2H, H3'); 3,50 (s, 3H, OMe); 3,52 (s, 3H, OMe); 3,63 (m, 1H, H2'); 6,46 (m, 3H, ArH); <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 295 K, NS-09-c)  $\delta$  [ppm]: 39,9 (im DMSO-Signal), 55,3; 55,5; 65,2; 72,6; 111,7; 113,3; 121,2; 132,1; 146,9; 148,3; DC: R<sub>f</sub> (**15**) = 0,65 EtOAc/Hexan 1:2); R<sub>f</sub> (**27**) = 0,19 (EtOAc/Hexan 1:2); t<sub>R</sub> (HPLC-UV) = 11,3 min (280 nm; 1,0 mM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (2100), 280 (850) nm; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS (m/z): 213,3; Fragmente (213,3): 150,9; 194,9; 177,3; 164,9.

## 7.6.20 Synthese von (RS)-1'-Hydroxyasaron (29)

1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift analog zu 1'-Hydroxymethyleugenol (11):

Unter Argonatmosphäre wird 3,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**28**; 10,2 g; 52,0 mmol) in 100 ml trockenem THF gelöst. Bei 0 °C werden 55 ml Vinylmagnesiumbromidlösung (1,0 M in THF; Sigma 225584) innerhalb von 15 min zugetropft. Die Lösung wird unter Rückfluss eine Stunde gerührt. Die erkaltete Suspension (weißer NS, gelbe Lsg.) wird mit 100 ml Wasser und 100 ml Ethylacetat versetzt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Hexan 1:3).

**Ausbeute:** 10,5 g (46,8 mmol, 90 %, farbloses Öl);

$M(C_{12}H_{16}O_4) = 224,2 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** min. 93 %

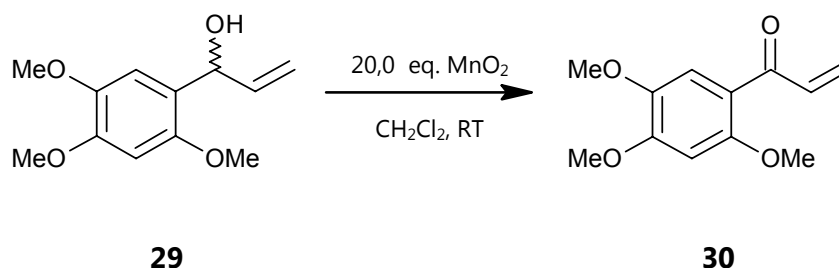
### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC71):  $\delta$  [ppm]: 3,66 (s, 3H, OMe); 3,75 (s, 3H, OMe); 3,76 (s, 3H, OMe); 4,94 (dd, 1H, H3',  $J = 10,6 \text{ Hz}; 0,7 \text{ Hz}$ ); 5,14 (dd, 1H, H3',  $J = 17,2; 0,7 \text{ Hz}$ ); 5,21 (d, 1H, OH,  $J = 5,1 \text{ Hz}$ ); 5,31 (t, 1H, H1',  $J = 4,7 \text{ Hz}$ ); 5,90 (m, 1H, H2'); 6,63 (s, 1H, ArH); 6,91 (s, 1H, ArH).  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC71C):  $\delta$  [ppm]: 55,8; 56,21; 56,24; 66,6; 98,2; 111,2; 112,2; 123,6; 141,4; 142,7; 148,4; 149,9. **DC:**  $R_f$  (**28**) = 0,58 (EtOAc/Hexan 1:1); 0,26 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**29**) = 0,58 (EtOAc/Hexan 1:1); 0,24 (EtOAc/Hexan 1:3).  $t_R$  (HPLC-UV) = 18,2 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ); **UV/Vis** (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 235 (550), 290 (300) nm; **LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ): 207,2; 236,2; 247,4; Fragmente (207,2): 192,0; 176,1; 161,2; 133,0; **LC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ): 113,0; 249,3; 227,4; 223,0.

## 7.6.21 Synthese von 1'-Oxoasaron (30)

1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propen-1-on

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Bürgi *et al.* (1993):

(*RS*)-1'-Hydroxyasaron (**29**; 271 mg; 1,21 mmol) wird in 15 ml Dichlormethan gelöst und Mangandioxid<sup>1</sup> (2,0 g; 24,2 mmol) zugegeben. Bei RT wird die Suspension über Nacht gerührt. Das MnO<sub>2</sub> wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Hexan 1:1).

**Ausbeute:** 178 mg (0,80 mmol, 66 %, farblose Kristalle).

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4) = 222,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** ca. 94 %

### Charakterisierung:

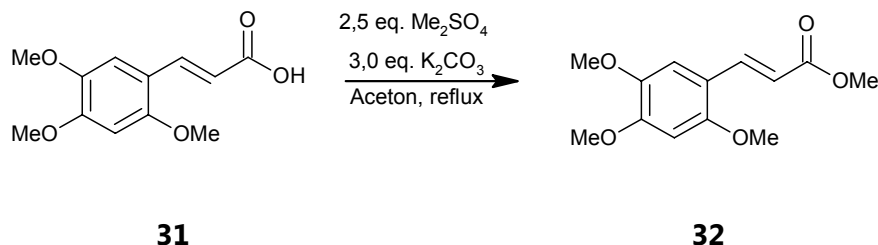
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC74):  $\delta$  [ppm]: 3,32 (s, 3H, OMe); 3,87 (s, 6H, 2 OMe); 5,73 (dd, 1H, H3'<sub>Z</sub>;  $J = 2,0$ ; 10,6 Hz); 6,17 (dd, 1H, H3'<sub>E</sub>;  $J = 2,0$ ; 17,0 Hz); 6,76 (s, 1H, Ar-H); 7,16 (s, 1H, Ar-H); 7,18 (dd, 1H, H2';  $J = 10,6$ ; 17,0 Hz). <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC74C):  $\delta$  [ppm]: 55,9; 56,0; 56,5; 97,9; 112,7; 118,4; 126,9; 136,6; 142,8; 154,0; 154,9; 189,0. DC:  $R_f$  (**29**) = 0,39 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**30**) = 0,45 (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 22,1 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 230 (415), 250 (sh, 315), 287 (140); 355 (190) nm; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 223,2; 245,3; Fragment (223,2): 191,9.

<sup>1</sup> „aktiv“, Fluka Nr. 63548

## 7.6.22 Synthese von (*E*)-3,4,6-Trimethoxyzimtsäureester (**32**)

Methyl-(*E*)-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenoat

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift:

3,4,6-Trimethoxyzimtsäure<sup>1</sup> (**31**; 1,5 g; 6,3 mmol) wird in 100 ml trockenem Aceton gelöst und Kaliumcarbonat (19,0 mmol, 2,64 g) zugegeben. Zu dieser Suspension tropft man Dimethylsulfat (16 mmol, 2,0 g, 1,5 ml) gelöst in 10 ml Aceton. Die Suspension wird zum Rückfluss erhitzt bis kein Edukt mehr vorhanden ist (2 h). Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch abgekühlt, mit 100 ml Wasser versetzt und mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit je 50 ml Ethylacetat gewaschen und die vereinigten organischen Phasen zum vollständigen Entfernen überschüssigen Dimethylsulfates noch dreimal mit je 50 ml halbgesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Hexan 1:1).

**Ausbeute:** 1,6 g (6,3 mmol, 100 %, weißes Pulver)  
 $M(\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5) = 252,26 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** min. 93 %

### Charakterisierung:

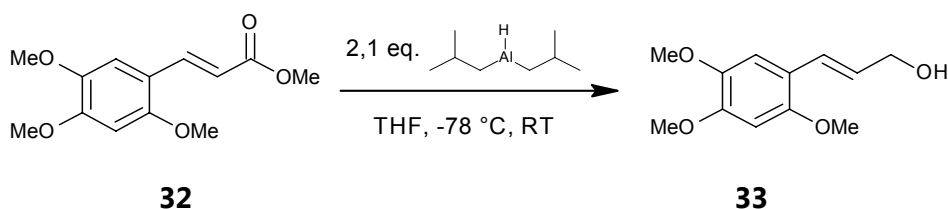
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC77)  $\delta$  [ppm]: 3,68; 3,74; 3,83; 3,85 (4x s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,52 (d, 1H, H1', J = 16 Hz); 7,26 (s, 1H, Ar-H); 7,84 (d, 1H, Ar-H, J = 16 Hz). DC:  $R_f$  (**31**) = 0,34 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**32**) = 0,66 (EtOAc/Hexan 1:1). t<sub>R</sub> (HPLC-UV) = 25,0 min (261 nm; 2,0 mM). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 218 (2500), 241 (2800), 302 (2750), 352 (2660) nm.

<sup>1</sup>Sigma-Aldrich Nr. T70394 („predominantly *trans*“) ist TCI Nr. T1393 vorzuziehen, da das TCI-Edukt Verunreinigungen enthält, die eine zweifache säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes notwendig machen. Das Sigma-Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet werden.

### 7.6.23 Synthese von (*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**)

(*E*)-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift modifiziert nach Abe *et al.* (2001); Boudron *et al.* (2006) und Sauerberg *et al.* (2007):

Unter Argon-Atmosphäre wird Trimethoxyzimtsäureester (**32**; 0,84 g; 3,33 mmol) in 30 ml trockenem THF gelöst. Bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  wird Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL; 7,0 ml einer 1,0 M Lösung in Toluol; 7,0 mmol; Sigma-Aldrich Nr. 215007) zugetropft. Die fast farblose Lösung färbt sich zunächst intensiv gelb. Nach ca. 30 min Rühren in der Kälte ist die Lösung wieder fast vollständig entfärbt. Die Aufarbeitung erfolgt auf Eis, so dass die Temperatur nicht über  $10\text{ }^\circ\text{C}$  steigt. Das Reaktionsgemisch wird mit 10%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und ges.  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und mehrfach mit EtOAc extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt (hellgelbes Öl) wird säulenchromatographisch bei RT auf Aluminiumoxid (ALOX Aktivität Super I, mit 10 %  $\text{H}_2\text{O}$  auf Aktivität IV eingestellt) mit 3 % Methanol in Dichlormethan als Fließmittel aufgereinigt.

**Ausbeute:** 0,70 g (3,12 mmol, 94 %, farblose Kristalle)  
 $M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4) = 224,25\text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** min. 98 %

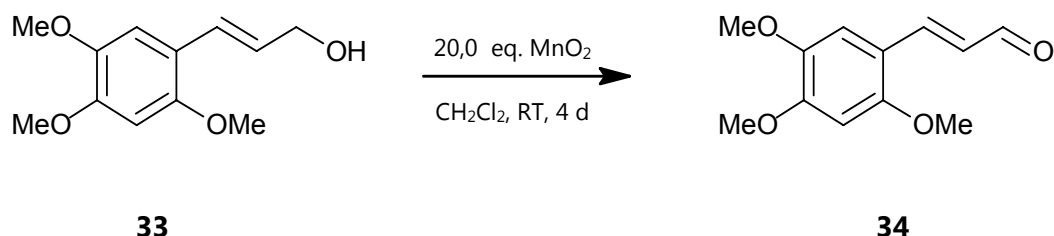
#### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC100)  $\delta$  [ppm]: 3,71 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,76 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4,07 (dt, 2H,  $\text{H}_3'$ ;  $J = 1,6; 5,6\text{ Hz}$ ); 4,77 (t, 1H, OH,  $J = 5,6\text{ Hz}$ ); 6,21 (dt, 1H,  $\text{H}_2'$ ,  $J = 5,4; 16,0\text{ Hz}$ ); 6,64 (s, 1H, Ar-H); 6,70 (dt, 1H,  $\text{H}_1'$ ,  $J = 16,0\text{ Hz}$ ); 7,02 (s, 1H, Ar-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 295K, PAC98C)  $\delta$  [ppm]: 55,7; 56,2; 56,3; 62,0; 98,3; 110,1; 116,9; 122,9; 128,6; 142,9; 149,1; 150,8. DC (Kieselgel):  $R_f$  (**32**) = 0,71 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**33**) = 0,40 (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 18,2 min (280 nm; 500  $\mu\text{M}$ ). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 215 (700), 262 (540), 315 (280) nm; LC-ESI $^+$ -MS/MS ( $m/z$ ): 247,4; 207,2; Fragmente (207,2): 192,0; 176,1; 161,3.

## 7.6.24 Synthese von (*E*)-3'-Oxoasaron (**34**)

(*E*)-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propenal

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Bürgi *et al.* (1993):

(*E*)-3'-Hydroxyasaron (**33**; 100 mg; 0,45 mmol) wird in Dichlormethan (15 ml) gelöst und Mangandioxid<sup>1</sup> (0,78 g; 9,0 mmol) zugegeben. Bei RT wird die Suspension vier Tage gerührt. Dann wird das MnO<sub>2</sub> über Celite filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/Hexan 1:1).

**Ausbeute:** 58,0 mg (0,26 mmol, 58 %, hellgelbe Kristalle)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4) = 222,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** ca. 74 %

### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz, 295K, PAC84)  $\delta$  [ppm]: 3,74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,74 (s, 1H, Ar-H); 6,78 (dd, 1H, H<sub>2</sub>',  $J = 15,8; 7,9 \text{ Hz}$ ); 7,28 (s, 1H, Ar-H); 7,82 (d, 1H, H<sub>1</sub>',  $J = 15,8 \text{ Hz}$ ); 9,57 (d, 1H, CHO,  $J = 7,9 \text{ Hz}$ ). DC:  $R_f(\mathbf{33}) = 0,40$  (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f(\mathbf{34}) = 0,57$  (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 22,1 min (280 nm; 100  $\mu\text{M}$ ). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 247 (27), 300 (36), 372 (48) nm; LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 223,2; 245,3; Fragmente (223,2): 195,1; 191,0; 176,0; 167,0.

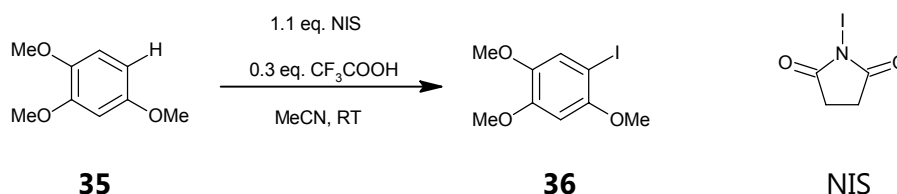
<sup>1</sup> „aktiv“, Fluka Nr. 63548



## 7.6.25 Synthese von 3,4,6-Trimethoxyiodbenzen (36)

1-Iod-2,4,5-trimethoxybenzen

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift (Castanet *et al.*, 2002):

3,4,6-Trimethoxybenzen (**35**; 5,76 g, 34,2 mmol) wird in 150 ml Acetonitril gelöst und Trifluoressigsäure (10,3 mmol, 1,17 g, 800  $\mu$ l) zugegeben. In drei bis vier Portionen wird *N*-Iodsuccinimid (NIS, 8,47 g, 37,6 mmol) zugegeben. Die zunächst farblose Lösung verfärbt sich nach Zugabe des NIS zunehmend dunkler. Die Reaktion ist nach 5 min beendet. Es werden 100 ml Wasser zugegeben und das Gemisch dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das sehr dunkel gefärbte Rohprodukt wird wegen des noch enthaltenen überschüssigen Iods säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat/Hexan 1:3).

**Ausbeute:** 8,94 g (30,4 mmol, 89 %, weißes Pulver)

$M(\text{C}_9\text{H}_{11}\text{IO}_3) = 294,09 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** min. 96 %

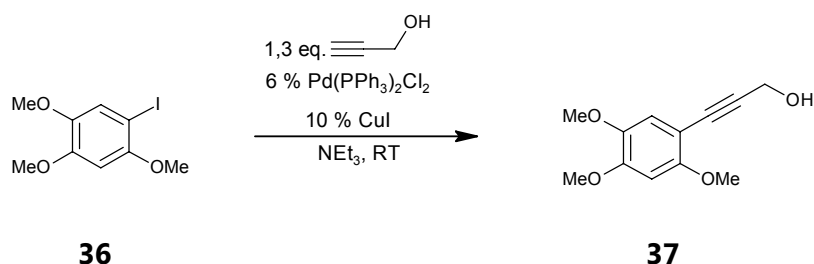
### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC92):  $\delta$  [ppm]: 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,78 (d, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>); 6,70 (s, 1H, Ar-H); 7,22 (s, 1H, Ar-H). <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 295K, PAC92C):  $\delta$  [ppm]: 55,8; 56,4; 57,0; 72,8; 98,5; 121,8; 143,8; 150,1; 152,6. DC:  $R_f$  (**35**) = 0,77 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**36**) = 0,48 (EtOAc/Hexan 1:3).

### 7.6.26 Synthese von 3,4,6-Trimethoxypropin-3'-ol-benzen (37)

3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propin-1-ol

#### Reaktionsschema:



#### Synthesevorschrift modifiziert nach Obika *et al.* (2008):

3,4,6-Trimethoxyiodbenzen (**36**; 3,17 g, 10,8 mmol), Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-dichlorid (448 mg, 0,64 mmol; 6 mol-%; Sigma-Aldrich Nr. 208671) und Kupfer(I)-iodid (214 mg, 1,12 mmol; 10,4 mol-%) werden in einer ausgeheizten Apparatur unter Argonatmosphäre vorgelegt. Die Substanzen werden vermischt, der Kolben dreimal evakuiert und wieder mit Argon geflutet. Frisch destilliertes, über KOH und LiAlH<sub>4</sub> getrocknetes, entgastes Triethylamin (30 ml) wird über einen Tropftrichter zugegeben. Propargylalkohol (750 µl; 773 mg; 13,8 mmol) wird in 10 ml Triethylamin gelöst und innerhalb von 10 min bei RT zugetropft. Die anfänglich zitronengelbe Suspension färbt sich sofort dunkelbraun. Nach vollständiger Zugabe des Alkinols setzt sich ein schwarzer, körniger NS an Kolbenboden und -wand ab, die darüberstehende Lösung ist klar und farblos. Der NS wird unter Schutzgas resuspendiert und eine Stunde weiter kräftig gerührt, wobei sich die Suspension tief braun verfärbt und kein Edukt mehr nachweisbar ist (DC-Kontrolle). Zur Suspension werden je ca. 100 ml Wasser und Ethylacetat gegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit ca. 80 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden noch dreimal mit reichlich Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Reaktionsgemisch wird auf Aluminiumoxid (Aktivität Super I, mit 10 % H<sub>2</sub>O auf Aktivität IV eingestellt) mit Dichlormethan als Fließmittel säulenchromatographisch aufgereinigt.

**Ausbeute:** 2,21 g (9,94 mmol, 92 %, hellbrauner Feststoff)

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4) = 222,24 \text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** ca. 94 %

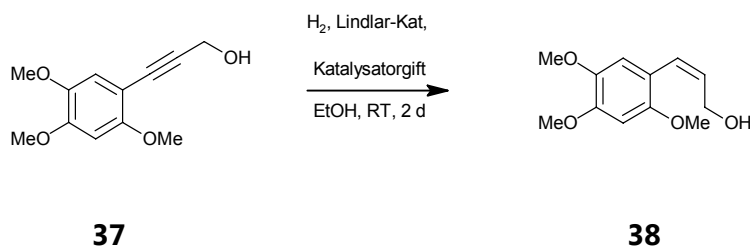
#### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC96):  $\delta$  [ppm]: 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,26 (d, 2H, CH<sub>2</sub>,  $J = 6 \text{ Hz}$ ); 5,23 (t, 1H, OH,  $J = 6 \text{ Hz}$ ); 6,67 (s, 1H, Ar-H); 6,87 (s, 1H, Ar-H); <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 296K, PAC96C):  $\delta$  [ppm]: 49,7; 55,7; 56,1 (2Cs); 80,6; 91,7; 97,8; 101,8; 116,2; 142,3; 150,2; 155,0. DC:  $R_f$  (**36**) = 0,54 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**36**) = 0,76 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**37**) = 0,12 (EtOAc/Hexan 1:3);  $R_f$  (**37**) = 0,31 (EtOAc/Hexan 1:1);  $t_R$  (HPLC-UV) = 16,2 min (280 nm; ca. 500 µM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}} = 218, 258, 307 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{min}} = 237, 276 \text{ nm}$ .

## 7.6.27 Synthese von (Z)-3'-Hydroxyasaron (38)

(2Z)-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Pavlakos *et al.* (2009):

3,4,6-Trimethoxypropinolbenzen (**37**; 209 mg; 0,93 mmol) wird in 6,0 ml trockenem Ethanol zusammen mit Lindlar-Katalysator (5 % Pd auf CaCO<sub>3</sub>, vergiftet mit Blei; 21,2 mg; 10 Gew.-%, TCI Nr. P1703) sowie Katalysatorgift 3,6-Dithiaoctan-1,8-diol (3,9 mg; 21,4 μmol; 18 Gew.-% bezogen auf Katalysator) in einer ausgeheizten und mehrfach mit Argon gefluteten Hydrierapparatur vorgelegt. Die Apparatur wird dreimal mit Wasserstoff geflutet und die Reaktion durch heftiges Rühren der Suspension gestartet. Wegen des geringen Unterschiedes der Retentionsfaktoren bei der DC wird die Reaktionskontrolle mittels HPLC durchgeführt. Da die Reaktion nur langsam verläuft, werden nach 4 h, 20 h und 24 h erneut 39 mg, 16,7 mg bzw. 20 mg Lindlar-Katalysator hinzugegeben. Nach 40 Stunden ist die Reaktion beendet. Die Suspension wird über Celite filtriert, der Filterkuchen noch achtmal mit Portionen von 10 ml kaltem Ethanol *p. a.* gewaschen, das Lösungsmittel vorsichtig am Rotationsverdampfer ( $T < 35\text{ °C}$ ) entfernt und das erhaltene Produkt zwei Stunden im ÖPV getrocknet.

**Ausbeute:** 206,3 mg (0,92 mmol; 99 %; gelb-oranges Öl).

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4) = 224,25\text{ g/mol}$

**Reinheit (<sup>1</sup>H-NMR):** min. 90 %

### Charakterisierung:

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, 295K, PAC99)  $\delta$  [ppm]: 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,12 (t, 2H, H3';  $J = 4,68$ ); 4,79 (t, 1H, OH,  $J = 4,68\text{ Hz}$ ); 5,65 (dt, 1H, H2',  $J = 6,4; 11,7\text{ Hz}$ ); 6,44 (dt, 1H, H1',  $J = 1,5; 11,7\text{ Hz}$ ); 6,66 (s, 1H, ArH); 6,72 (s, 1H, ArH); <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz, 295K, PAC104C):  $\delta$  [ppm]: 55,8; 56,0; 56,3; 58,1; 98,0; 114,6; 116,5; 124,0; 131,1; 142,0; 149,1; 151,3; DC:  $R_f(\mathbf{37}) = 0,32$  (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f(\mathbf{38}) = 0,35$  (EtOAc/Hexan 1:1);  $t_R(\text{HPLC-UV}) = 18,2\text{ min}$  (280 nm; *ca.* 500 μM); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 213 (660), 256 (330), 304 (180) nm;  $\lambda_{\text{min}} = 240$  (240), 278 (100); LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ): 247,4; 242,4; 270,3; 207,2; 225,3; Fragmente (207,2): 192,3; 176,1; 161,1.

## 7.6.28 Synthese von Asaron-Diolen

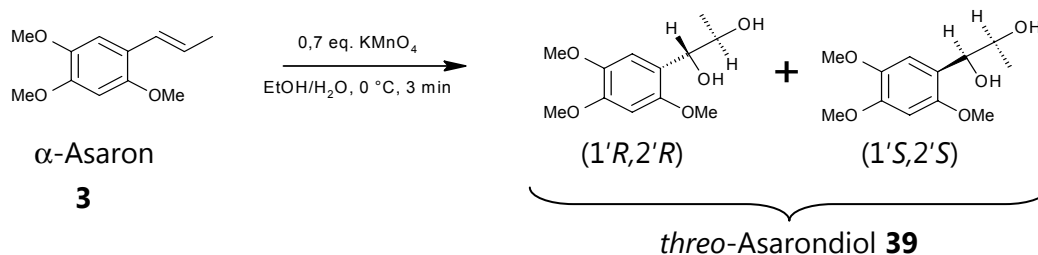
**Allgemeine Synthesevorschrift modifiziert nach Lane und Kubanek (2006) und korrigiert nach Simson (2012):**

Es wird eine *ca.* 130 mM Lösung von  $\alpha$ - (für **39**),  $\beta$ - (für **40**) oder  $\gamma$ -Asaron (für **41**) in Ethanol/Wasser (2:1) hergestellt und auf 0 °C gekühlt. Eine wässrige Kaliumpermanganatlösung (*ca.* 55 mM in Wasser) wird unter Rühren bei 0 °C hinzuge tropft und das Gemisch für drei Minuten gerührt, wobei sich ein brauner Niederschlag bildet. Der Niederschlag wird filtriert und mehrfach mit Diethylether gewaschen. Hiernach wird das Eluat dreimal mit der gleichen Menge EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/Pentan 1:1) aufgereinigt.

### 7.6.28.1 *threo*-Asarondioli (39)

(1*R*,2*R*)- bzw. (1*S*,2*S*)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol

**Reaktionsschema:**



**Ausbeute:** 81 mg (0,33 mmol, 17 %; leicht gelbes Öl)

$M(C_{12}H_{18}O_5) = 242,27\text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** *ca.* 98 %

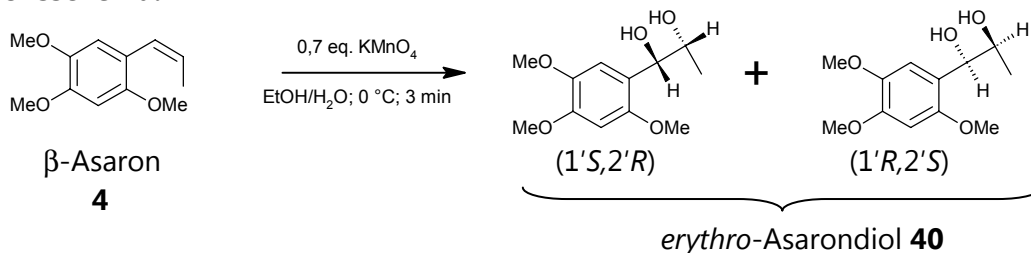
**Charakterisierung:**

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 296K, NS-42)  $\delta$  [ppm]: 0,86 (d, 3H, H3',  $^3J_{H3';H2'} = 6,36\text{ Hz}$ ); 3,55 (m, 1H, H2',  $J = 6,12; 6,36; 4,64\text{ Hz}$ ); 3,67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,35 (d, 1H, OH,  $^3J_{H1', H2'} = 4,64\text{ Hz}$ ); 4,55 (m, 1H, H1',  $J = 6,12; 1,48\text{ Hz}$ ); 4,86 (d, 1H, OH,  $J = 4,64\text{ Hz}$ ); 6,62 (s, 1H, H5) 6,92 (s, 1H, H2).  $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 298K, NS-42c)  $\delta$  [ppm]: 19,3; 55,8; 56,2; 56,2; 70,7; 70,7; 98,0; 112,2; 123,1; 142,5; 148,2; 150,4. **DC:**  $R_f$  (**3**) = 0,88 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**39**) = 0,15 (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 13,0 min (280 nm; *ca.* 500  $\mu\text{M}$ ). **UV/Vis (HPLC-UV):**  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 231 (500), 288 (350) nm;  $\lambda_{\text{min}} = 220$  (400), 257 (50). **LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ) = 265,3; 242,3; 225,2; Fragmente (225,2): 210,1; 193,1; 168,0; 165,0. **LC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS** ( $m/z$ ) = 287,2; 285,2; 277,1; 249,2; 241,3; 209,0.

### 7.6.28.2 erythro-Asarondiol (40)

(1*S*,2*R*)- bzw. (1*R*,2*S*)-1-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol

#### Reaktionsschema:



#### Ausbeute:

$M(C_{12}H_{18}O_5) = 242,27 \text{ g/mol}$

33 mg, 0,14 mmol, 3 % (farbloser Feststoff)

#### Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):

min. 95 %

#### Charakterisierung:

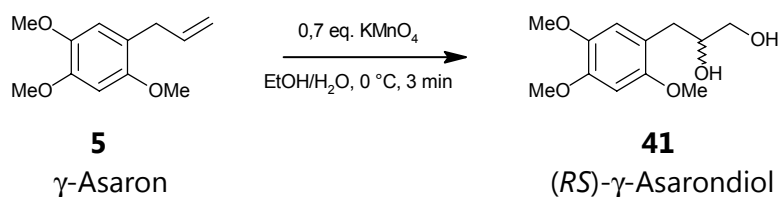
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 296K, NS-41)  $\delta$  [ppm]: 0,87 (d, 3H, H3',  $^3J_{\text{H3',H2'}} = 6,36 \text{ Hz}$ ); 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,70 (m, 1H, H2'); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,32 (d, 1H, OH,  $J = 5,4 \text{ Hz}$ ); 4,74 (t, 1H, H1',  $J = 4,2 \text{ Hz}$ ); 4,81 (d, 1H, OH,  $J = 4,64 \text{ Hz}$ ); 6,60 (s, 1H, H5); 6,97 (s, 1H, H2).

$^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 296K, NS-41c)  $\delta$  [ppm]: 17,2; 55,8; 56,2; 56,3; 68,9; 70,3; 97,9; 112,3; 122,7; 142,4; 148,1; 150,2. DC:  $R_f$  (**4**) = 0,92 (EtOAc/Hexan 1:1);  $R_f$  (**40**) = 0,13 (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 11,2 min (280 nm; ca. 500  $\mu\text{M}$ ). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 231 (540), 289 (300) nm;  $\lambda_{\text{min}}$  = 220 (450), 257 (90). LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ) = 288,4; 265,4; 260,4; 242,3; 225,3; Fragmente (225,3): 210,1; 193,1; 168,0; 165,1. LC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS ( $m/z$ ) = 175,1; 227,2; 241,3; 249,1; 277,3.

### 7.6.28.3 (RS)- $\gamma$ -Asarondiol (41)

(2*RS*)-3-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)-propan-1,2-diol

#### Reaktionsschema:



#### Ausbeute:

186 mg (0,77 mmol, 39 %; farbloser Feststoff)

$M(C_{12}H_{18}O_5) = 242,27 \text{ g/mol}$

#### Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):

ca. 98 %

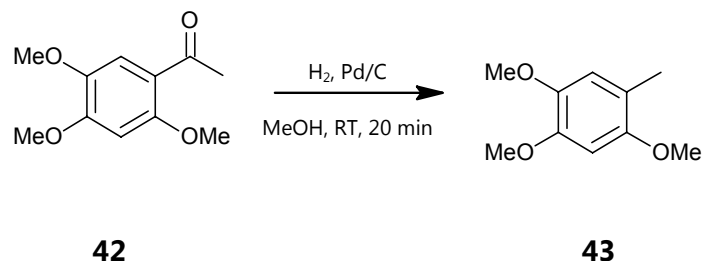
#### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 297K, NS-39)  $\delta$  [ppm]: 2,53 (m, 2H, H1'); 3,24 (m, 2H, OH); 3,58 (m, 1H, H2'); 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,40 (m, 2H, H3'); 6,61 (s, 1H, H5); 6,77 (s, 1H, H2).  $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 296K, NS-39c)  $\delta$  [ppm]: 33,7; 55,9; 56,1; 56,4; 65,6; 71,4; 98,4; 116,1; 118,7; 142,3; 147,8; 151,4. DC:  $R_f$  (**5**) = 0,91 (EtOAc/Hexan 1:1),  $R_f$  (**41**) = 0,15 (EtOAc/Hexan 1:1).  $t_R$  (HPLC-UV) = 13,8 min (280 nm; ca. 500  $\mu\text{M}$ ). UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 229 (480), 290 (240) nm;  $\lambda_{\text{min}}$  = 220 (450), 257 (30). LC-ESI<sup>+</sup>-MS/MS ( $m/z$ ) = 288,4; 265,4; 260,3; 243,3; 225,3; Fragmente (243,3): 225,1; 194,8; 181,0. LC-ESI<sup>-</sup>-MS/MS ( $m/z$ ) = 175,0; 241,4; 249,2; 277,3; 285,2; 287,2.

## 7.6.29 Synthese von 2,4,5-Trimethoxytoluol (**43**)

1,2,4-Trimethoxy-5-methylbenzen

### Reaktionsschema:



### Synthesevorschrift modifiziert nach Xing *et al.* (2007):

3,4,6-Trimethoxyacetophenone (**42**; 970 mg; 4,94 mmol) wird unter Argonatmosphäre in 50 ml MeOH gelöst und mit Hydrierkatalysator (10 % Palladium auf Aktivkohle; 235 mg; 24 Gew.-%) und zwei Tropfen 37%ige Salzsäure versetzt. Die Hydrierapparatur wird mit Wasserstoff gespült und die Suspension mit einem Überdruck von *ca.* 50 cm Wassersäule kräftig gerührt. Nach 20 min wird kein Wasserstoff mehr verbraucht und es ist kein Edukt mehr nachweisbar. Die Suspension wird über Celite filtriert, der Filterkuchen mehrfach mit Ethanol gespült und dann das Lösungsmittel entfernt.

**Ausbeute:** 850 mg (4,67 mmol, 94 %, farbloser kristalliner Feststoff)

$M(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3) = 182,22 \text{ g/mol}$

**Reinheit ( $^1\text{H-NMR}$ ):** *ca.* 99 %

### Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600 MHz, 295K, PAC126):  $\delta$  [ppm]: 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,61 (s, 1H, ArH); 6,75 (s, 1H, ArH);  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz, 296K, PAC126C):  $\delta$  [ppm]: 15,3; 55,87; 55,90; 56,3; 98,2; 115,5; 116,5; 142,3; 147,5; 151,3; DC:  $R_f(\mathbf{42}) = 0,18$  (EtOAc/Hexan 1:4);  $R_f(\mathbf{43}) = 0,53$  (EtOAc/Hexan 1:4).  $t_R$  (HPLC-UV) = 23,4 min (280 nm; *ca.* 274  $\mu\text{M}$ ); UV/Vis (HPLC-UV):  $\lambda_{\text{max}}$  (absolute Absorption in mAU) = 228 (95), 289 (45) nm.

## A

- Abbott** DD, Packman EW, Wagner BM, Harrison JWE, "Chronic Oral Toxicity of Oil of *Sassafras* and *Safrol*", *Pharmacologist*, **1961**, J, 62
- Abel** G, Göggelmann W, "Genotoxic activity of  $\beta$ -asarone and commercial calamus drugs", *Mutat Res/Environ Mutagen*, **1986**, 164, 4, 287
- Abel** G, "Chromosome-damaging effect of beta-asarone on human lymphocytes/Chromosomenschädigende Wirkung von beta-Asaron in menschlichen Lymphocyten", *Planta Med*, **1987**, 53, 3, 251-3
- Abdo** KM, Cunningham ML, Snell ML, Herbert RA, Travlos GS, Eldridge SR, Bucher JR, "14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice", *Food Chem Toxicol*, **2001**, 39, 4, 303-16
- Abe** H, Yamasaki A, Koshiba N, Takeuchi Y, Harayama T. "One-pot conversion of allyl alcohols into selenochroman derivatives", *Chem Pharm Bull*, **2001**, 49, 9, 1223-5
- Adams** DH, Eksteen B, "Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease", *Nat Rev Immunol*, **2006**, 6, 244-51
- Alhusainy** W, Paini A, Punt A, Louise J, Spenkelink A, Vervoort J, Delatour T, Scholz G, Schilter B, Adams T, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Identification of nevadensin as an important herb-based constituent inhibiting estragole bioactivation and physiology-based biokinetic modeling of its possible *in vivo* effect", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2010**, 1, 245, 2, 179-90, doi: 10.1016/j.taap.2010.02.017, Erratum in: *Toxicol Appl Pharmacol*, **2010**, 15, 247, 3, 250
- Alhusainy** W, van den Berg SJ, Paini A, Campana A, Asselman M, Spenkelink A, Punt A, Scholz G, Schilter B, Adams TB, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Matrix modulation of the bioactivation of estragole by constituents of different alkenylbenzene-containing herbs and spices and physiologically based biokinetic modeling of possible *in vivo* effects", *Toxicol Sci*, **2012**, 129, 1, 174-87, doi: 10.1093/toxsci/kfs196
- Alhusainy** W, Paini A, van den Berg JH, Punt A, Scholz G, Schilter B, van Bladeren PJ, Taylor S, Adams TB, Rietjens IM, "In vivo validation and physiologically based biokinetic modeling of the inhibition of SULT-mediated estragole DNA adduct formation in the liver of male Sprague-Dawley rats by the basil flavonoid nevadensin", *Mol Nutr Food Res*, **2013**, 57, 11, 1969-78, doi: 10.1002/mnfr.201300144
- Al Masaoudi** T, Sieben S, Callahan CP, Merk HF, Blömeke B; "Eugenol but Not Isoeugenol Induces CYP1A1 mRNA in Human Keratinocytes" *Int Arch Allergy Immunol* **2001**, 124, 309-11 (Poster Presentation: Allergic Manifestation)
- Al-Subeihi** AA, Spenkelink B, Rachmawati N, Boersma MG, Punt A, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Physiologically based biokinetic model of bioactivation and detoxification of the alkenylbenzene methyleugenol in rat", *Toxicol In Vitro*, **2011**, 25, 267-85, doi: 10.1016/j.tiv.2010.08.019
- Al-Subeihi** AA, Spenkelink B, Punt A, Boersma MG, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Physiologically based kinetic modeling of bioactivation and detoxification of the alkenylbenzene methyleugenol in human as compared with rat", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2012**, 260, 271-84, doi: 10.1016/j.taap.2012.03.005
- Al-Subeihi** AA, Alhusainy W, Paini A, Punt A, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Inhibition of methyleugenol bioactivation by the herb-based constituent nevadensin and prediction of possible *in vivo* consequences using physiologically based kinetic modeling", *Food Chem Toxicol*, **2013**, 59:564-71, doi: 10.1016/j.fct.2013.06.043
- Amato** G, Longo V, Mazzaccaro A, Gervasi PG, "Chlorzoxazone 6-hydroxylase and *p*-nitrophenol hydroxylase as the most suitable activities for assaying cytochrome P450 2E1 in cynomolgus monkey liver", *Drug Metab Dispos*, **1998**, 26, 483-9
- Ames** BN, McCann J, Yamasaki E, "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test", *Mutation Res*; **1975**, 31, 347-64
- Antúnez-Solis** J, Hernández-Derramadero F, Aquino-Vega M, Ibarra-Ramírez S, Rodríguez-Páez L, Baeza I, Wong C, "2,4,5-trimethoxycinnamic acid: the major metabolite of alpha-asarone, retains most of the pharmacological properties of alpha-asarone", *J Enzyme Inhib Med Chem*, **2009**, 24, 903-9, doi: 10.1080/14756360802318902
- Arand** M, Wagner H, Oesch F, "Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase", *J Biol Chem*, **1996**, 271, 8, 4223-9
- Arand** M, Herrero Plana ME, Hengstler JG, Lohmann M, Cronin A, Oesch F; "Detoxification strategy of epoxide hydrolase the basis for a threshold in chemical carcinogenesis", *EXCLI J*, **2003**, 2, 22-30
- Atkins** WM, Lu WD, Cook DL, "Is there a toxicological advantage for non-hyperbolic kinetics in cytochrome P450 catalysis? Functional allostery from "distributive catalysis"", *J Biol Chem*, **2002**, 277, 33258-66
- Atsumi** T, Fujisawa S, Tonosaki KA, "Comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions", *Toxicol in vitro*, **2005**, 19, 8, 1025-33
- Auerbach** SS, Shah RR, Mav D, Smith CS, Walker NJ, Vallant MK, Boorman GA, Irwin RD, "Predicting the hepatocarcinogenic

- potential of alkenylbenzene flavoring agents using toxicogenomics and machine learning", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2010**, 243, 3, 300-14, doi: 10.1016/j.taap.2009.11.021
- ## B
- Badger** DA, Smith RL, Bao J, Kuester RK, Sipes IG., "Disposition and metabolism of isoeugenol in the male Fischer 344 rat", *Food Chem Toxicol*, **2002**, 12, 1757-65
- Bär** VF, Griepentrog F, "Where we stand concerning the evaluation of flavoring substances from the viewpoint of health"; *Medizin Ernähr*, **1967**, 8, 244-251
- Bailey** GS, Reddy AP, Pereira CB, Harttig U, Baird W, Spitsbergen JM, Hendricks JD, Orner GA, Williams DE, Swenberg JA, "Nonlinear cancer response at ultralow dose: a 40800-animal ED(001) tumor and biomarker study", *Chem Res Toxicol*, **2009**, 22, 1264-76, doi: 10.1021/tx9000754
- Barr** DB, Barr JR, Bailey SL, Lapeza CR Jr, Beeson MD, Caudill SP, Maggio VL, Schecter A, Masten SA, Lucier GW, Needham LL, Sampson EJ, "Levels of methyleugenol in a subset of adults in the general U.S. population as determined by high resolution mass spectrometry", *Environ Health Perspect*, **2000**, 108, 4, 323-8
- BD**, BD Biocience, Produktinformation zu "BD Ultra Pool™ HLM 150" Katalog-Nr. 452117, **2008** (der elektronischen Anlage dieser Arbeit beigefügt)
- BD**, BD Biocience; Application Note 476: „Cytochrome P450 Enzyme Mapping in Drug Discovery using BD Supersomes Enzymes“; **2009**; [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/dl/doc/tech\\_bulletin/live/web\\_enabled/467.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/tech_bulletin/live/web_enabled/467.pdf); abgerufen am 23.11.2013
- Bean** CL, Armstrong MJ, Galloway SM; "Effect of sampling time on chromosome aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells"; *Mutat Res*, **1992**, 65, 31-44
- Belitz** HD, Grosch W, Schieberle P; „Lehrbuch der Lebensmittelchemie“, 5. Auflage; Springer-Verlag, Berlin, **2001**, ISBN: 3540732012
- Bellelli** A, "Hemoglobin and cooperativity: Experiments and theories", *Curr Protein Pept Sci*, **2010**, 11, 2-36
- Bellucci** G, Lippi A, Marioni F, Citti L, Gervasi PG, Turchi G, „Structure activity relationship of epoxides: different mutagenicity of the two diastereoisomeric 3-bromo-1,2-epoxycyclohexanes“, *Chem Biol Interact*, **1984**, 51, 77-89
- Belova** LF, Alibekov SD, Baginskaia AI, Sokolov SI, Pokrovskaja GV, „Asarone and its biological properties“, *Farmakol Toksikol*, **1985**, 48, 17-20
- Benbow** JW, Katoch-Rouse R, "A biomimetic approach to dihydrobenzofuran synthesis", *J Org Chem*, **2001**, 66, 4965-72
- Benford** D, Dinovi M, Setzer RW, „Application of the margin-of-exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic e.g.: benzo[a]pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons“, *Food Chem Toxicol*, **2010**, 48 Suppl 1, S42-8, doi: 10.1016/j.fct.2009.09.039
- Benigni** R, Bossa C, Tcheremenskaia O, „Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts“, *Chem Rev*, **2013**, 113, 2940-57, doi: 10.1021/cr300206t
- Berka** K, Hendrychová T, Anzenbacher P, Otyepka M, „Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site“, *J Phys Chem A*, **2011**, 115, 11248-55, doi: 10.1021/jp204488j
- Bernhardt** R, „Cytochrome P450: versatile Enzymsysteme mit Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin“, *magazin forschung*, **1/2004**, Universität des Saarlandes
- Beroza** M, Insoe MN, Schwartz PH Jr, Keplinger ML, Mastri CW, „Acute toxicity studies with insect attractants“, *Toxicol Appl Pharmacol*, **1975**, 31, 421-9
- Bertea** CM, Azzolin CM, Bossi S, Doglia G, Maffei ME, „Identification of an EcoRI restriction site for a rapid and precise determination of beta-asarone-free *Acorus calamus* cytotypes“, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 5, 507-14
- Bischoff** R, "Synthesen und Untersuchungen zur Mutagenität ausgewählter Phenylpropanoid-Metaboliten", Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, AK Schrenk, **2013**
- Björnstad** K, Helander A, Hultén P, Beck O, "Bioanalytical investigation of asarone in connection with *Acorus calamus* oil intoxications", *J Anal Toxicol*, **2009**, 33, 604-9
- Blobaum** AL, "Mechanism-based inactivation and reversibility: is there a new trend in the inactivation of cytochrome p450 enzymes?", *Drug Metab Dispos*, **2006**, 34, 1-7
- Boberg** EW, Miller EC, Miller JA, Poland A, Liem A, "Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfoöxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver", *Cancer Res*, **1983**, 43, 5163-73
- Boberg** EW, Miller EC, Miller JA, „The metabolic sulfonation and side-chain oxidation of 3'-hydroxyisosafrrole in the mouse and its inactivity as a hepatocarcinogen relative to 1'-hydroxysafrole“, *Chem Biol Interact*, **1986**, 59, 73-97
- Boberg** EW, Liem A, Miller EC, Miller JA, „Inhibition by pentachlorophenol of the initiating and promoting activities of 1'-hydroxysafrole for the formation of enzyme-altered foci and tumors in rat liver, *Carcinogenesis*, **1987**, 8, 531-9
- Bolt** HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH, „Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective“, *Toxicol Lett*, **2004**, 151, 29-41
- Bolton** JL, Comeau E, Vukomanovic V, "The influence of 4-alkyl substituents on the formation and reactivity of 2-methoxyquinone methides: evidence that extended pi-conjugation dramatically stabilizes the quinone methide formed from eugenol" *Chem Biol Interact*, **1995**, 14, 95, 279-90
- Bolton** JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ, "Role of quinones in toxicology", *Chem Res Toxicol*, **2000**, 13, 3, 135-60
- Borchert** P, Miller JA, Miller EC, Shires TK, "1'-Hydroxysafrole, a proximate carcinogenic metabolite of safrole in the rat and mouse", *Cancer Res*, **1973a**, 33, 3, 590-600
- Borchert** P, Wislocki PG, Miller JA, Miller EC "The metabolism of the naturally occurring hepatocarcinogen safrole to 1'-hydroxysafrole and the electrophilic reactivity of 1'-acetoxyasafrole", *Cancer Research*, **1973b**, 33, 3, 575-89
- Bourdi** M, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JT, Nelson SD, Pohl LR, "Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis", *Chem Res Toxicol*, **1996**, 9, 1159-66
- Bourdrion** J, Commeiras L, Barbier P, Bourgarel-Rey V, Pasquier E, Vanthuyne N, Hubaud JC, Peyrot V, Parrain JL, "Caulerpenyne-colchicine hybrid: synthesis and biological evaluation", *Bioorg Med Chem*, **2006**, 14, 16, 5540-8
- Bowalgaha** K, Elliot DJ, Mackenzie PI, Knights KM, Miners JO, "The glucuronidation of Delta4-3-Keto C19- and C21-hydroxysteroids by human liver microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): Galpha- and 21-hydroxyprogesterone are selective substrates for UGT2B7", *Drug Metab Dispos*, **2007**, 35, 363-70
- Bradford** MM, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, **1976**, 72, 248-254
- Brandon** EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH, "An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2003**, 189, 233-46
- Brennan** RJ, Kandikonda S, Khramian AP, DeMilo AB, Liquido NJ, Schiestl RH, „Saturated and monofluoro analogs of the oriental fruit fly attractant methyl eugenol show reduced genotoxic activities in yeast“, *Mutat Res*, **1996**, 369, 3-4, 175-81
- Burdock** GA, „Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients“, 5. Auflage, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2004**, ISBN 9781420037876
- Burkey** JL, Sauer JM, McQueen CA, Sipes IG, "Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners-- a mechanism of activation for methyleugenol", *Mutat Res*, **2000**, 453, 1, 25-33
- Busby** WF Jr, Ackermann JM, Crespi CL, „Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on *in vitro* activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450“, *Drug Metab Dispos*, **1999**, 27, 246-9
- Bürgi** C, Liu G, Rüedi P, "Synthese von Alkylphenolen und -pyrocatecholen aus *Plectranthus albidus* (Labiatae)", *Helv Chim Acta*, **1993**, 76, 5, 1901-15



## C

- Caldwell** J, Sutton JD, Howes AJ, „Comparative studies on the metabolism of food additives: case examples in the safety evaluation of the allylbenzene natural flavors“, *J Nutr Biochem*, **1990**, 1, 396–409
- Carlson** GP, „Critical appraisal of the expression of cytochrome P450 enzymes in human lung and evaluation of the possibility that such expression provides evidence of potential styrene tumorigenicity in humans“, *Toxicology*, **2008**, 254, 1-2, 1-10, doi: 10.1016/j.tox.2008.09.017
- Cartus** AT, „Identifizierung und Quantifizierung mikrosomaler Metaboliten von Eugenol, Isoeugenol, Methyleugenol und Methylisoeugenol“, Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, AK Schrenk, **2009**
- Cartus** AT, Merz KH, Schrenk D, „Metabolism of methylisoeugenol in liver microsomes of human, rat, and bovine origin“, *Drug Metab Dispos*, **2011**, 39, 1727-33, doi: 10.1124/dmd.111.038851
- Cartus** AT, Herrmann K, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Schrenk D, „Metabolism of Methyleugenol in Liver Microsomes and Primary Hepatocytes: Pattern of Metabolites, Cytotoxicity, and DNA-Adduct Formation“, *Toxicol Sci*, **2012**, 129, 21-34, doi: 10.1093/toxsci/kfs181
- Castanet** AS, Colobert F, Broutin PE, „Mild and regioselective iodination of electron-rich aromatics with N-iodosuccinimide and catalytic trifluoroacetic acid“, *Tetrahedron Lett*, **2002**, 43, 5047-5048
- Catalytic Site Atlas**, Datenbank, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>, abgerufen am 20.11.2013
- Caujolle** F, Meynier D, „Toxicity of methyleugenol, of methylisoeugenols and of methyl-dihydroeugenol“, *C R Hebd Seances Acad Sci*, **1960**, 8, 250, 1148-9
- CFR**, „Code of federal regulations“ der U.S. FDA, Title 21, einsehbar unter (zuletzt abgerufen im Juli 2014) <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>
- Chamorro** G, Salazar M, Salazar S, „Dominant lethal effects in male and female Wistar rats after shortterm alpha-asarone treatment“, *Toxicol Lett Suppl*, **1996**, 1, 88, 67
- Chamorro** G, Garduño L, Martínez E, Madrigal E, Tamariz J, Salazar M, „Dominant lethal study of alpha-asarone in male mice“, *Toxicol Lett*, **1998**, 99, 2, 71-7
- Chamorro** G, Salazar M, Tamariz J, Díaz F, Labarrios F, „Dominant lethal study of alpha-asarone in male and female mice after sub-chronic treatment“, *Phytother Res*, **1999**, 13, 4, 308-11
- Chan** VS, Caldwell J, „Comparative induction of unscheduled DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by allylbenzenes and their 1'-hydroxy metabolites“, *Food Chem Toxicol*, **1992**; 30, 10, 831-6
- Chang** Y, Moody DE, McCance-Katz EF, „Novel metabolites of buprenorphine detected in human liver microsomes and human urine“, *Drug Metab Dispos*, **2006**, 34, 440-8
- Chang** CL, Cho IK, Li QX, „Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*“, *J Econ Entomol*, **2009**, 102, 1, 203-9
- Chiappe** C, De Rubertis A, Amato G, Gervasi PG, „Stereochemistry of the biotransformation of 1-hexene and 2-methyl-1-hexene with rat liver microsomes and purified P450s of rats and humans“, *Chem Res Toxicol*, **1998**, 11, 1487-93
- Chiappe** C, De Rubertis A, Tinagli V, Amato G, Gervasi PG, „Stereochemical course of the biotransformation of isoprene monoepoxides and of the corresponding diols with liver microsomes from control and induced rats“, *Chem Res Toxicol*, **2000**, 13, 831-8
- Chiappe** C, De Rubertis A, De Carlo M, Amato G, Gervasi PG, „Stereochemical aspects in the 4-vinylcyclohexene biotransformation with rat liver microsomes and purified P450s. monoepoxides and diols“, *Chem Res Toxicol*, **2001**, 14, 5, 492-9
- Chopra** IC, Khajuria BN, Chopra CL, „Antibacterial properties of volatile principles from *Alpinia galanga* and *Acorus calamus*“, *Antibiot Chemotherap*, **1957**, 1, 378-383
- Chuang** YY, Hou RF, „Effectiveness of attract-and-kill systems using methyl eugenol incorporated with neonicotinoid insecticides against the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae)“, *J Econ Entomol*, **2008**, 101, 2, 352-9
- Clayden** J, Greeves N, Warren S, Wothers P, „Organic Chemistry“, *Oxford University Press*, **2001**, 505
- Collins** AR, Dusinská M, Gedik CM, Stětina R, „Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?“, *Environ Health Perspect*, **1996**, 104, Suppl 3, 465-9
- Correia** MA, Ortiz de Montellano PR, „Inhibition of cytochrome P450 enzymes“, In: „Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry“, Editor: Ortiz de Montellano PR, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 3. Auflage, **2005**, 247–322
- COE**, **1974**; Council of Europe, Natural Flavouring Substances, Their Sources, and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field, List 1, 186, 163, Strasbourg; referenziert in RIFM monographs: <http://legacy.library.ucsf.edu/tid/ced92d00/pdf;jsessionid=121ACBEFB0B4C76F1EF90970B3A2B41C.tobacco04>
- COE**, **2005**; Committee of Experts on Flavouring Substances of the Council of Europe (Europarat); „The 1st report on active principles (constituents of toxicological concern) contained in natural sources of flavouring“, 2005, online einsehbar unter: [http://www.coe.int/t/e/social\\_cohesion/soc%2Dsp/public\\_health/flavouring\\_substances/Active%20principles.pdf](http://www.coe.int/t/e/social_cohesion/soc%2Dsp/public_health/flavouring_substances/Active%20principles.pdf), abgerufen am 15.11.2013
- Crespi** CL, Penman BW, „Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions“, *Adv Pharmacol*, **1997**, 43, 171-88
- Crespi** CL, Miller VP, „The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future“, *Pharmacol Ther*, **1999**, 84, 121-31
- Culleré** L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V, „Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines“, *J Agric Food Chem*, **2004**, 52, 6, 1653-60

## D

- Dandiya** PC, Cullumbine H, „Studies on *Acorus calamus*. III. Some pharmacological actions of the volatile oil“, *J Pharmacol Exptl Therap*, **1959**, 125, 353-359
- Dandiya** PC, Baxter RM, Walker GC, Cullumbine H, „Studies on *Acorus calamus*. II. Investigation of volatile oil“, *J Pharm Pharmacol*, **1959**, 11, 163-168
- De Vincenzi** M, Silano M, Stacchini P, Scaccocchio B, „Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol“, *Fitoterapia*, **2000**, 71, 216-21
- Delaforge** M, Janiaud P, Dorange JL, Morizot JP, Padiou P, „Metabolic activation of a natural promutagen, eugenol, by replicative cultures of adult rat liver epithelial cells“, *C R Seances Soc Biol Fil*, **1977**, 171, 1, 100-7; referenziert in NTP, 1983
- Delaforge** M, Janiaud P, Levi P, Morizot JP, „Biotransformation of allylbenzene analogues *in vivo* and *in vitro* through the epoxide-diol pathway“, *Xenobiotica*, **1980**, 10, 10, 737-44
- Delaforge** M, Ioannides C, Parke DV, „Ligand binding of safrole to cytochrome P-450“, *Arch Toxicol Suppl*, **1980**, 4, 45-8
- Della Greca** MD, Monaco P, Previtera L, Aliotta G, Pinto G, Pollio A, „Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus*“, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 2319-21, doi:10.1016/S0031-9422(00)97975-5
- Denisov** IG, Frank DJ, Sligar SG, „Cooperative properties of cytochromes P450“, *Pharmacol Ther*, **2009**, 124, 151-67
- Denisov** IG, Sligar SG, „A novel type of allosteric regulation: functional cooperativity in monomeric proteins“, *Arch Biochem Biophys*, **2012**, 519, 91-102, doi: 10.1016/j.abb.2011.12.017
- Devereux** TR, Anna CH, Foley JF, White CM, Sills RC, Barrett JC, „Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis“, *Oncogene*, **1999**, 19, 18, 33, 4726-33
- Devgan** ON and Bokadia MM, „Isolation of 2,4,5-

- trimethoxyallylbenzene from *Caesulia axillaries* oil", *Aust J Chem*, **1968**, 21, 12, 3001-3
- Dewick** PM, "Medicinal Natural Products", John Wiley & Sons Verlag, **2002**
- Di Cesare** LF, Forni E, Viscardi D, Nani RC, "Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures", *J Agric Food Chem*, **2003**, 51, 3575-81
- Ding** W, Levy DD, Bishop ME, Lyn-Cook Lascelles E, Kulkarni R, Chang CW, Aidoo A, Manjanatha MG, "Methyleugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling", *Toxicol Sci*, **2011**, 123, 1, 103-12, doi: 10.1093/toxsci/kfr153
- Dong** H, Gao Z, Rong H, Jin M, Zhang X, "β-asarone reverses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior and promotes hippocampal neurogenesis in rats", *Molecules*, **2014**, 19, 5, 5634-49, doi: 10.3390/molecules19055634
- Dorange** JL, Delaforge M, Janiaud P, Padieu P, "Mutagenicity of the metabolites of the epoxide-diol pathway of safrole and its analogs. Study on *Salmonella typhimurium*", *C R Seances Soc Biol Fil*, **1977**, 171, 5, 1041-8; referenziert in NTP, 1983
- Drinkwater** NR, Miller EC, Miller JA, Pitot HC, "Hepatocarcinogenicity of estragole (1-allyl-4-methoxybenzene) and 1'-hydroxyestragole in the mouse and mutagenicity of 1'-acetoxyestragole in bacteria", *J Natl Cancer Inst*, **1976**, 57, 1323-31
- ## E
- Easterbrook** J, Fackett D, Li AP, "A comparison of aroclor 1254-induced and uninduced rat liver microsomes to human liver microsomes in phenytoin O-deethylation, coumarin 7-hydroxylation, tolbutamide 4-hydroxylation, S-mephenytoin 4'-hydroxylation, chloroxazone 6-hydroxylation and testosterone 6β-hydroxylation", *Chem Biol Interact*, **2001a**, 134, 3, 243-9
- Easterbrook** J, Lu C, Sakai Y, Li AP, "Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes", *Drug Metab Dispos*, **2001b**, 29, 141-4
- Eder** E, Neudecker T, Lutz D, Henschler D, "Mutagenic potential of allyl and allylic compounds", *Biochem Pharmacol*, **1980**, 29, 993-948
- Eisenbrand** G, Metzler M, Hennecke FJ, "Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner", Wiley-VCH-Verlag, 3. Auflage **2005**, ISBN 3527309896
- Ekroos** M, Sjogren T, "Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4", *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**, 103, 37, 13682-7
- EMCDDA**, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Report on the risk assessment of TMA-2 in the framework of the joint action on new synthetic drugs, **2004**, ISSN 1725-4485, available at: [http://bdoc.ofdt.fr/pmb/opac\\_css/doc\\_num.php?explnum\\_id=6259](http://bdoc.ofdt.fr/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=6259)
- Epstein** SS, Fujii K, Andrea J, Mantel N, "Carcinogenicity testing of selected food additives by parenteral administration to infant Swiss mice", *Toxicol Appl Pharmacol*, **1970**, 16, 321-34
- Evans** WE, Relling MV. "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics", *Science*, **1999**, 286, 5439, 487-91
- ## F
- Fang** YQ, Shi C, Liu L, Fang RM, "Analysis of transformation and excretion of β-asarone in rabbits with GC-MS", *Eur J Drug Metab Pharmacokin*, **2012a**, 37, 3, 187-90, doi: 10.1007/s13318-012-0083-z
- Fang** YQ, Shi C, Liu L, Fang RM, "Pharmacokinetics of beta-asarone in rabbit blood, hippocampus, cortex, brain stem, thalamus and cerebellum", *Pharmazie*, **2012b**, 67, 2, 120-3, doi: 10.1691/ph.2012.1100
- Fenaroli** G, "Fenaroli's Handbook of flavor ingredients" Adapted from the Italian language works of Giovanni Fenaroli. Ed., transl. and rev. by Thomas E. Furia; CRC Press; Cleveland, Ohio, **1975**, Band 1 und 2
- Fennell** TR, Miller JA, Miller EC, "Characterization of the biliary and urinary glutathione and N-acetylcysteine metabolites of the hepatic carcinogen 1'-hydroxysafrole and its 1'-oxo metabolite in rats and mice", *Cancer Res*, **1984**, 44, 3231-40
- Ferlay** J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 11.02.2014
- Fieser** L, "Fiesers' Reagents for Organic Synthesis", Wiley, Volume 1, **1967**, 136-37
- Fischer** IU, von Unruh GE, Dengler HJ, "The metabolism of eugenol in man", *Xenobiotica*, **1990**, 2, 209-22
- Fischer** R, Nitzan N, Chaimovitch D, Rubin B, Dudai N, "Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age", *J Agric Food Chem*, **2011**, 59, 4913-22, doi: 10.1021/jf200017h
- FCT**, Food and Cosmetics Toxicology: Monographs on Fragrance Raw Materials", *Methylisoeugenol*, **1975**, 13, 6, 865; "Isoeugenol", **1975**, 13, 6, 815-17; "Methyleugenol", **1975**, 13, 6, 857; "Eugenol", 13, 5, **1975**, 545-47
- Freire** F, Seco JM, Quiñoá E, Riguera R, "Determining the absolute stereochemistry of secondary/secondary diols by 1H NMR: basis and applications", *J Org Chem*, **2005**, 13, 70, 10, 3778-90
- Frey** HH, Löscher W, "Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin", Enke Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, **2009**; ISBN: 978-3830410799
- Fujimoto** A, Sakanashi Y, Matsui H, Oyama T, Nishimura Y, Masuda T, Oyama Y, "Cytometric analysis of cytotoxicity of polyphenols and related phenolics to rat thymocytes: potent cytotoxicity of resveratrol to normal cells", *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2009**, 104, 6, 455-62
- Fujii** K, Jaffe H, Bishop Y, Arnold E, Mackintosh D, Epstein SS, "Structure-activity relations for methylenedioxyphenyl and related compounds on hepatic microsomal enzyme function, as measured by prolongation of hexobarbital narcosis and zoxazolamine paralysis in mice", *Toxicol Appl Pharmacol*, **1970**, 16, 2, 482-94
- Fujita** Y, "Studies on the Essential oils of the Genus *Orthodon* (Labiatae), Indigenous to the East Asia XXVI Essential Oil of *Orthodon methylisoeugenolisferum* Fujita", *Nippon Kagaku Kaishi*, **1944**, 65, 1, 79-84, doi: <http://dx.doi.org/10.1246/nikkashi1921.65.79>
- Fukuda**, S, "Assessment of the carcinogenic hazard of 6 substances used in dental Practices", *Shikagu*, **1987**, 74, 1365-1384
- ## G
- Gaikwad** NW, "Metabolomic profiling unravels DNA adducts in human breast that are formed from peroxidase mediated activation of estrogens to quinone methides", *PLoS One*, **2013**, 8, 6, e65826, doi: 10.1371/journal.pone.0065826.
- Galloway** SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Duk S, Rimpo J, Margolin BH, Resnick MA, Anderson B, Zeiger E, "Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals", *Environ Mol Mutag*, **1987**, 10, 1-175
- Gardner** I, Bergin P, Stening P, Kenna JG, Caldwell J, "Immunochemical detection of covalently modified protein adducts in livers of rats treated with methyleugenol", *Chem Res Toxicol*, **1996**, 9, 4, 713-21
- Gardner** I, Wakazono H, Bergin P, de Waziers I, Beaune P, Kenna JG, Caldwell J, "Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver

- microsomes", *Carcinogenesis*, **1997**, 18, 9, 1775-83
- Gavin** CL, Williams MC, Hallagan JB, FEMA Poundage and Technical Effects Update Survey, Flavor and Extract Manufacturers Association, **2007**, Washington, DC, USA; referenziert in Smith *et al.*, **2010**
- George** JD, Price CJ, Marr MC, Myers CB, Jahnke GD, "Evaluation of the developmental toxicity of isoeugenol in Sprague-Dawley (CD) rats", *Toxicol Sci*, **2001**, 60, 1, 112-20
- Gerlach** M, "Synthese von 1'-Hydroxymethyleugenol und 3'-Hydroxymethylisoeugenol und Oxidation durch Alkoholdehydrogenase", Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Betreuung: Alexander Cartus, **2014**
- Glatt** HR, Oesch F, "Species differences in enzymes controlling reactive epoxides", *Arch Toxicol Suppl*, **1987**, 10, 111-24
- Godoy** P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG, "Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME", *Arch Toxicol*, **2013**, 87, 8, 1315-530, doi: 10.1007/s00204-013-1078-5
- Göggelmann** W, Schimmer O, "Mutagenicity testing of beta-asarone and commercial calamus drugs with *Salmonella typhimurium*", *Mutat Res*, **1983**, 121, 191-4
- Gonzalez** FJ, Korzekwa KR, "Cytochromes P450 expression systems", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1995**, 35, 369-90
- Gottlieb** OR, da Rocha AI, "Constituents of *Aniba hostmanniana*", *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1861-3
- Green** NR, Savage JR, "Screening of safrole, eugenol, their ninhydrin positive metabolites and selected secondary amines for potential mutagenicity", *Mutat Res*, **1978**, 57, 115-121
- Green** IR, October N, "Role of the methoxy group in product formation via TiCl<sub>4</sub> promoted 4-phenyldioxolane isomerizations", *ARKIVOC, Arch Org Chem*, **2010**, 2, 71-96, doi: 10.3998/ark.5550190.0011.206
- Greim** H, Göggelmann W, Summer KH, Wolff T, "Mutagenicity testing with *Salmonella* microsome test", *Arch Toxicol*, **1980**, 46, 1-2, 31-40
- Groh** IA, Cartus AT, Vallicotti S, Kajzar J, Merz KH, Schrenk D, Esselen M, "Genotoxic potential of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites in cultured Chinese hamster V79 cells", *Food Funct*, **2012**, 3, 428-36, doi: 10.1039/C2FO10221H
- Groh** IA, Chen C, Lüske C, Cartus AT, Esselen M, "Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells", *J Nutr Metab*, **2013**, Article ID 821082, doi: 10.1155/2013/821082
- Groh** IA, "Wirkmechanismen zur Genotoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten sowie zur posttranslationalen Histondeacetylase-Modifizierung durch Polyphenole", Dissertation, **2014**, TU Kaiserslautern, Fachrichtung Lebensmittelchemie & Toxikologie, AG Esselen.
- Grosch** S, Monakhova YB, Kuballa T, Ruge W, Kimmich R, Lachenmeier DW, "Comparison of GC/MS and NMR for quantification of methyleugenol in food", *Eur Food Res Technol*, **2013**, 236, 267-275, doi 10.1007/s00217-012-1879-4
- Gruebner** I, Klinger W, Ankermann H, "Various substances and substance classes with inducer properties", *Arch Int Pharmacodyn*, **1972**, 196, 1-9
- Gupta** KP, van Golen KL, Putman KL, Randerath K, "Formation and persistence of safrole-DNA adducts over a 10,000-fold dose range in mouse liver", *Carcinogenesis*, **1993**, 14, 8, 1517-21
- Gursale** A, Dighe V, Parekh G, "Simultaneous quantitative determination of cinnamaldehyde and methyl eugenol from stem bark of *Cinnamomum zeylanicum* Blume using RP-HPLC", *J Chromatogr Sci*, **2010**, 48, 1, 59-62

## H

- Hackett** PH, Rodriguez G, Roach RC, "Clove cigarettes and high-altitude pulmonary edema" *J Am Med Assoc*, **1985**, 253, 24, 3551-2
- Hagan** EC, Jenner PM, Jones WI, Fitzhugh OG, Long EL, Brouwer JG, Webb WK, "Toxic properties of compounds related to safrole"; *Toxicol Appl Pharmacol*, **1965**, 7, 18-24
- Han** JH, Hong SJ, Lee EY, Lee JH, Kim HJ, Kwak H, Kim C, "Conversion of Epoxides into *trans*-Diols or *trans*-Diol Mono-Ethers by Iron(III) Porphyrin Complex", *Bull Korean Chem Soc*, **2005**, 26, 9, 1434-1436
- Hanahan** D, Weinberg RA, "The hallmarks of cancer", *Cell*, **2000**, 100, 57-70
- Hasheminejad** G, Caldwell J, "Genotoxicity of the alkenylbenzenes alpha- and beta-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes", *Food Chem Toxicol*, **1994**, 32, 223-31
- Hayen** H, Karst U, "Strategies for the liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of non-polar compounds", *J Chromatogr A*, **2003**, 1000, 1-2, 549-65
- Heffter** A, "Zur Pharmakologie der Safrolgegruppe", *Arch Exptl Pathol Pharmacol (heute Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol)*, **1895**, 35, 342-374
- Henderson** RF, "Species differences in the metabolism of olefins: implications for risk assessment", *Chem Biol Interact*, **2001**, 135-136, 53-64
- Herbert** RA, Abdo K, "Methyleugenol". In: Predictive Value of Rodent Forestomach and Gastric Neuroendocrine Tumours in Evaluating Carcinogenic Risks to Humans. *Technical Publication No. 39*, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, **2003**, 143-158
- Herrero** ME, Arand M, Hengstler JG, Oesch F, "Recombinant expression of human microsomal epoxide hydrolase protects V79 Chinese hamster cells from styrene oxide- but not from ethylene oxide-induced DNA strand breaks", *Environ Mol Mutagen*, **1997**, 30, 429-39
- Herrmann** K, Engst W, Appel KE, Monien BH, Glatt H, "Identification of human and murine sulfotransferases able to activate hydroxylated metabolites of methyleugenol to mutagens in *Salmonella typhimurium* and detection of associated DNA adducts using UPLC-MS/MS methods", *Mutagenesis*, **2012**, 27, 453-62, doi: 10.1093/mutage/ges004
- Herrmann** K, Schumacher F, Engst W, Appel KE, Klein K, Zanger UM, Glatt H, "Abundance of DNA adducts of methyleugenol, a rodent hepatocarcinogen, in human liver samples", *Carcinogenesis*, **2010**, 31, 1025-30, doi: 10.1093/carcin/bgt013
- Herrmann** K, Engst W, Meinel W, Florian S, Cartus AT, Schrenk D, Appel KE, Nolden T, Himmelbauer H, Glatt H, "Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2", *Carcinogenesis*, **2014**, 35, 4, 935-41, doi: 10.1093/carcin/bgt408
- Hesse** M, Meier H, Zeeh B, "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", 6. Auflage, **2002**, Thieme, Stuttgart, ISBN 3-13-576106-1; 109-11
- Hill** AV, "The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves" *J Physiol*, **1910**, 40 (Suppl), iv-vii
- Hirao** N, "Synthesis of 4-Hydroxy-3-ethoxy-1-allylbenzene from 4-Hydroxy-3-methoxy-1-Allylbenzene (Eugen-ol)", *Bull Chem*

- Soc Japan*, **1936**, 11, 3, 179-84
- Hirose M**, Masuda A, Imaida K, Kagawa M, Tsuda H, Ito N, "Induction of forestomach lesions in rats by oral administrations of naturally occurring antioxidants for 4 weeks", *Jpn J Cancer Res*, **1987**, 78,317-321
- HMPC**, Committee on Herbal Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, Public statement on the use of herbal medicinal products containing asarone, European Medicines Agency (EMA), London, **2005** (Doc Ref: EMA/HMPC/139215/2005). Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/04/WC500089956.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/04/WC500089956.pdf)
- Holt JM**, Ackers GK, "The Hill coefficient: inadequate resolution of cooperativity in human haemoglobin", *Methods Enzymol*, **2009**, 455, 193-212, doi: 10.1016/S0076-6879(08)04207-9
- Homburger F**, Kelly T Jr, Friedler G, Russfield AB, "Toxic and possible carcinogenic effects of 4-allyl-1,2-methylenedioxybenzene (Safrole) in rats on deficient diets", *Med Exp Int J Exp Med*, **1961**, 4, 1-11
- Hoffer A**, Osmond H, The Hallucinogens, Academic Press Inc, New York, **1967**, ISBN 0-12-351850-4
- Houston JB** and Kenworthy KE, "In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model", *Drug Metab Dispos*, **2000**, 28, 246-254
- Howes AJ**, Chan VS, Caldwell J, "Structure-specificity of the genotoxicity of some naturally occurring alkenyl-benzenes determined by the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes", *Food Chem Toxicol*, **1990**, 28, 8, 537-42
- Hsia MTS**, Adamovics JA, Kremer BL, "Microbial mutagenicity studies of insect growth regulators and other potential insecticidal compounds in *Salmonella typhimurium*", *Chemosphere*, **1979**, 8, 8, 521-529
- Hu J**, Feng X, "Phenylpropanes from *Acorus tatarinowii*", *Planta Med*, **2000**, 66, 662-4
- Hutzler JM**, Tracy TS, "Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions", *Drug Metab Dispos*, **2002**, 30, 355-62
- Hwang JK**, Chung JY, Baek NI, Park JH, "Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*", *Int J Antimicrob Agents*, **2004**, 4, 377-81
- 
- I**
- IARC** (International Agency for Research on Cancer), Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Safrole, isosafrole and dihydrosafrole, 10, 231-244, Lyon, France, **1976**
- IARC** (International Agency for Research on Cancer), Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans", IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 101, **2012**, Available online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-013.pdf>
- Iida M**, Anna CH, Holliday WM, Collins JB, Cunningham ML, Sills RC, Devereux TR, "Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens", *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 3, 689-99
- Iida M**, Anna CH, Gaskin ND, Walker NJ, Devereux TR, "The putative tumor suppressor Tsc-22 is downregulated early in chemically induced hepatocarcinogenesis and may be a suppressor of Gadd45b", *Toxicol Sci*, **2007**, 99, 1, 43-50
- Innes JR**, Ulland BM, Valerio MG, Petrucelli L, Fishbein L, Hart ER, Pallotta AJ, Bates RR, Falk HL, Gart JJ, Klein M, Mitchell I, Peters J; Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note", *J Natl Cancer Inst*, **1969**, 42, 6, 1101-14
- Ioannides C**, Delaforge M, Parke DV, "Safrole: its metabolism, carcinogenicity and interactions with cytochrome P-450", *Food Cosmet Toxicol*, **1981**, 19, 657-66
- Ishidate M Jr**, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A, "Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food", *Chem Toxicol*, **1984**, 22, 623-636
- Isin EM**, Guengerich FP, "Kinetics and thermodynamics of ligand binding by cytochrome P450 3A4", *J Biol Chem*, **2006**, 281, 9127-36
- 
- J**
- Janiaud P**, Delaforge M, Levi P, Maume BF, Padieu P, "[A comparative study in cultured rat liver cells of the metabolism of different analogues and metabolites of a natural hepatocarcinogen: safrol], *C R Seances Soc Biol Fil*, **1976**, 170, 1035-41
- Jansson T**, Curvall M, Hedin A, Enzell CR, "In vitro studies of biological effects of cigarette smoke condensate. II. Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by weakly acidic, semivolatile constituents", *Mutat Res*, **1986**, 169, 129-39
- JECFA**, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, "Toxicological Evaluation of Certain Food Additives", *WHO Tech Rep Ser No. 669*, **1981**, 33-44
- JECFA**, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *WHO technical report series No. 952: Williams GM, Mattia A, Alkoxy-substituted Allylbenzenes Present in Foods and Essential Oils and Used as Flavouring Agents*, **2009**, 105-106
- Jenner PM**, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG, "Food Flavorings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity", *Food Cosmet Toxicol*, **1964**, 2, 327-43
- Jeurissen SM**, Bogaards JJ, Boersma MG, ter Horst JP, Awad HM, Fiamegos YC, van Beek TA, Alink GM, Sudhölter EJ, Cnubben NH, Rietjens IM, "Human cytochrome p450 enzymes of importance for the bioactivation of methyleugenol to the proximate carcinogen 1'-hydroxymethyleugenol", *Chem Res Toxicol*, **2006**, 19, 111-6
- Jeurissen SM**, Punt A, Boersma MG, Bogaards JJ, Fiamegos YC, Schilter B, van Bladeren PJ, Cnubben NH, Rietjens IM, "Human cytochrome p450 enzyme specificity for the bioactivation of estragole and related alkenylbenzenes", *Chem Res Toxicol*, **2007**, 20, 5, 798-806
- Jeurissen SM**, Punt A, Delatour T, Rietjens IM, "Basil extract inhibits the sulfotransferase mediated formation of DNA adducts of the procarcinogen 1'-hydroxyestragole by rat and human liver S9 homogenates and in HepG2 human hepatoma cells", *Food Chem Toxicol*, **2008**, 46, 6, 2296-302
- Jiang H**, Zhu AG, Mamczur M, Morisseau C, Hammock BD, Falck JR, McGiff JC, "Hydrolysis of cis- and trans-epoxyeicosatrienoic acids by rat red blood cells", *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**, 326, 1, 330-7, doi: 10.1124/jpet.107.134858
- Jin M**, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, "In vivo genotoxicity of methyleugenol in gpt delta transgenic rats following medium-term exposure", *Toxicol Sci*, **2013**, 131, 2, 387-94, doi: 10.1093/toxsci/kfs294
- Jing WH**, Song YL, Yan R, Wang YT, "Identification of cytochrome P450 isoenzymes involved in metabolism of (+)-praeurotin A, a calcium channel blocker, by human liver microsomes using ultra high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", *J Pharm Biomed Anal*, **2013**, 77, 175-88, doi: 10.1016/j.jpba.2013.01.023
- Johnson JD**, Ryan MJ, Toft JD II, Graves SW, Hejtmancik MR, Cunningham ML, Herbert R, Abdo KM, "Two-year toxicity and carcinogenicity study of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F(1) mice", *J Agric Food Chem*, **2000**, 48, 8, 3620-32
- Jung C**, de Vries S, Schünemann V, "Spectroscopic characterization of cytochrome P450 Compound I", *Arch Biochem Biophys*, **2011**, 507, 44-55, doi: 10.1016/j.abb.2010.12.029
- 
- K**
- Ka MH**, Choi EH, Chun HS, Lee KG, "Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissimae* roots, peppermint leaves, pine needles, and sweet flag leaves", *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 10, 4124-9
- Kah-Wei Hee A**, Tan KH, "Transport of methyl eugenol-derived sex pheromonal components in the male fruit fly, *Bactrocera dorsalis*", *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **2006**,

- 143, 4, 422-8
- Kamatani** T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H, Fujita K, "Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer", *Mutat Res*, **1999**, 428, 125-30
- Karwicka** E, Marczevska J, Anuszevska E, Łozowicka B, Chilmonczyk Z, "Genotoxicity of alpha-asarone analogues", *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 6069-74, doi: 10.1016/j.bmc.2008.04.049
- Kashiwagi** T, Ji S, Lemasters JJ, Thurman RG, "Rates of alcohol dehydrogenase-dependent ethanol metabolism in periportal and pericentral regions of the perfused rat liver", *Mol Pharmacol*, **1982**, 21, 438-43
- Keating** JW, Report to the Research Institute for Fragrance Materials, 5 July, **1972**
- Keller** K, Stahl E, "Composition of the essential oil from beta-Asarone free *calamus*", *Planta Med*, **1983**, 47, 2, 71-4
- Kercher** S, "Oxidation von Methyl Eugenol- und Asaron-Seitenkettenalkoholen in Mikrosomen, Zytosol und durch Alkoholdehydrogenasen verschiedener Spezies und Organe", Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, Lebensmittelchemie und Toxikologie, AG Schrenk, Betreuung: A. Cartus, **2014**, in Bearbeitung
- Kerckaert** GA, Brauning R, LeBoeuf RA, Isfort RJ, "Use of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for carcinogenicity prediction of chemicals currently being tested by the National Toxicology Program in rodent bioassays", *Environ Health Perspect*, **1996**, 104, Suppl 5, 1075-84
- Kevekordes** S, Mersch-Sundermann V, Burghaus CM, Spielberger J, Schmeiser HH, Arlt VM, Dunkelberg H, "SOS induction of selected naturally occurring substances in *Escherichia coli* (SOS chromotest)", *Mutat Res*, **1999**, 445, 81-91
- Kevekordes** S, Spielberger J, Burghaus CM, Birkenkamp P, Zietz B, Paufler P, Diez M, Bolten C, Dunkelberg H, "Micronucleus formation in human lymphocytes and in the metabolically competent human hepatoma cell line Hep-G2: results with 15 naturally occurring substances", *Anticancer Res*, **2001**, 21, 1A, 461-9
- Khandwala** AS, Kasper CB, "Preferential induction of aryl hydroxylase activity in rat liver nuclear envelope by 3-methylcholanthrene", *Biochem Biophys Res Commun*, **1973**, 54, 4, 1241-6
- Khare** S, Zhang Q, Ibdah JA, "Epigenetics of hepatocellular carcinoma: role of microRNA", *World J Gastroenterol*, **2013**, 19, 5439-45, doi: 10.3748/wjg.v19.i33.5439
- Kim** SG, Liem A, Stewart BC, Miller JA, "New studies on trans-anethole oxide and trans-asarone oxide", *Carcinogenesis*, **1999**, 20, 1303-7
- Kim** EH, Kim HK, Ahn YJ, "Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae)", *J Agric Food Chem*, **2003**, 51, 4, 885-9
- Kim** KH, Moon E, Kim HK, Oh JY, Kim SY, Choi SU, Lee KR, "Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities", *Bioorg Med Chem Lett*, **2012**, 22, 19, 6155-9, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.016
- Kitteringham** NR, Davis C, Howard N, Pirmohamed M, Park BK, "Interindividual and interspecies variation in hepatic microsomal epoxide hydrolase activity: studies with *cis*-stilbene oxide, carbamazepine 10, 11-epoxide and naphthalene", *J Pharmacol Exp Ther*, **1996**, 278, 3, 1018-27
- Klaunig** JE, "Acrylamide carcinogenicity", *J Agric Food Chem*, **2008**, 56, 15, 5984-8, doi: 10.1021/jf8004492
- Kligman** AM, Report to the Research Institute for Fragrance Materials, 12 June, **1972**, gemessen nach Kligman AM und Epstein W, "Updating the maximization test for identifying contact allergens", *Contact Dermatitis I*, **1975**, 231
- Knasmüller** S, Schwab C, Parzefall W, "Kanzerogene und gentoxische Substanzen in Lebensmitteln und natürliche Protektionsmechanismen", *J Ernährungs-medizin*, **2001**, 1, 5-16
- Knasmüller** S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl C, Bichler J, Majer BJ, "Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge", *Toxicology*, **2004**, 198, 1-3, 315-28
- Koeduka** T, Fridman E, Gang DR, Vassão DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP, Baiga TJ, Dudareva N, Pichersky E, "Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester", *Proc Natl Acad Sci*, **2006**, 103, 26, 10128-33
- Koeduka** T, Baiga TJ, Noel JP, Pichersky E, "Biosynthesis of *t*-anethole in anise: characterization of *t*-anol/ isoeugenol synthase and an *O*-methyltransferase specific for a C7-C8 propenyl side chain", *Plant Physiol*, **2009**, 149, 1, 384-94, doi: 10.1104/pp.108.128066
- Kono** H, Bradford BU, Yin M, Sulik KK, Koop DR, Peters JM, Gonzalez FJ, McDonald T, Dikalova A, Kadiiska MB, Mason RP, Thurman RG, "CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury", *Am J Physiol*, **1999**, 277, G1259-67
- Kothari** SK, Bhattacharya AK, Ramesh S, "Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest", *J Chromatogr A*, **2004**, 1054, 67-72
- Koul** SK, Taneja SC, Malhotra S, Dhar KL, "Phenylpropanoids and (-)-ledol from two Piper species", *Phytochem*, **1993**, 32, 2, 478-480, doi: 10.1016/S0031-9422(00)95023-4
- Kraft** P, Eichenberger W, "Conception, Characterization and Correlation of New Marine Odorants", *Eur J Org Chem*, 19, **2003**, 3735-43

## L

- Lander** V, Schreier P, "Light-induced transformation of asarone", *Flavour Fragrance J*, **1991**, 6, 21-28
- Landsiedel** R, Andrae U, Kuhlow A, Scholtyssek M, Glatt H, "Enantioselective Metabolic Activation of Safrrole", in: Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food: Novel Concepts? - Symposium (Forschungsberichte (DFG)) [held in Kaiserslautern from 4th to 7th October 1998], Deutsche Forschungsgemeinschaft, Ed.: Gerhard Eisenbrand, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, XIX, ISBN: 3-527-27144-9
- Lane** AL, Kubanek J, "Structure-activity relationship of chemical defenses from the freshwater plant *Micranthemum umbrosum*", *Phytochemistry*, **2006**, 67, 12, 1224-31
- LaVoie** EJ, Adams JD, Reinhardt J, Rivenson A, Hoffmann D, "Toxicity studies on clove cigarette smoke and constituents of clove: determination of the LD50 of eugenol by intratracheal instillation in rats and hamsters", *Arch Toxicol*, **1986**, 59, 2, 78-81
- Lee** JY, Lee JY, Yun BS, Hwang BK, "Antifungal activity of beta-asarone from rhizomes of *Acorus gramineus*", *J Agric Food Chem*, **2004**, 52, 776-80
- Lee** MH, Chen YY, Tsai JW, Wang SC, Watanabe T, Tsai YC, "Inhibitory effect of  $\beta$ -asarone, a component of *Acorus calamus* essential oil, on inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells", *Food Chem*, **2011**, 126, 1-7, doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.052
- Levy** GN, Weber WW, "High-performance liquid chromatographic analysis of  $^{32}$ P-postlabeled DNA-aromatic carcinogen adducts", *Anal Biochem*, **1988**, 1, 174, 381-92
- Lewinsohn** E, Ziv-Raz I, Dudai N, Tadmor Y, Lastochkin E, Larkov O, Chaimovitch D, Ravid U, Putievsky E, Pichersky E, Shoham Y, "Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol *O*-methyltransferase activities", *Plant Sci*, **2000**, 160, 27-35
- Lewis** DF, Pratt JM, "The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism", *Drug Metab Rev*, **1998**, 30, 4, 739-86
- Li** AP, "A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity", *Chem Biol Interact*, **2002**, 142, 1-2, 7-23
- Li** Q, Csanády GA, Kessler W, Klein D, Pankratz H, Pütz C, Richter N, Filser JG, "Kinetics of ethylene and ethylene oxide in subcellular fractions of lungs and livers of male B6C3F1 mice and male fischer 344 rats and of human livers", *Toxicol Sci*, **2011**, 123, 384-98, doi: 10.1093/toxsci/kfr194
- Li** J, Wei DQ, Wang JF, Li YX, "A negative cooperativity mechanism of human CYP2E1 inferred from molecular dynamics simulations

- and free energy calculations", *J Chem Inf Model*, **2011b**, 51, 3217-25, doi: 10.1021/ci2004016
- Lim H**, Lee SY, Lee KR, Kim YS, Kim HP, „The Rhizomes of *Acorus gramineus* and the Constituents Inhibit Allergic Response *In vitro* and *In vivo*", *Biomol Ther (Seoul)*, **2012**, 20, 5, 477-81, doi: 10.4062/biomolther.2012.20.5.477
- Lippard SJ**, Berg JM, Bioanorganische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag, **1995**
- Liu T**, Xie CB, Ma WJ, Chen WQ, „Association between CYP2A6 genetic polymorphisms and lung cancer: a meta-analysis of case-control studies", *Environ Mol Mutagen*, **2013**, 54, 133-40, doi: 10.1002/em.21751
- Liu L**, Wang J, Shi L, Zhang W, Du X, Wang Z, Zhang Y, „ $\beta$ -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression", *Phytomedicine*, **2013b**, 20, 6, 512-20, doi: 10.1016/j.phymed.2012.12.008
- Long EL**, Nelson AA, Fitzhugh OG, Hansen WH, "Liver tumors produced in rats by feeding saffrole", *Arch Pathol*, **1963**, 75, 595-604
- Lopachin RM**, Gavin T, Decaprio A, Barber DS, „Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant-target interactions", *Chem Res Toxicol*, **2012**, 25, 239-51. doi: 10.1021/tx2003257
- López ML**, Hernández A, Chamorro G, Mendoza-Figueroa T, "alpha-Asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes", *Planta Med*, **1993**, 59, 2, 115-20
- Lu J**, Fu T, Qian Y, Zhang Q, Zhu H, Pan L, Guo L, Zhang M, „Distribution of  $\alpha$ -asarone in brain following three different routes of administration in rats", *Eur J Pharm Sci*, **2014**, pii: S0928-0987(14)00266-8, doi: 10.1016/j.ejps.2014.06.006
- Luo G**, Guenther TM, „Detoxication of the 2',3'-epoxide metabolites of allylbenzene and estragole. Conjugation with glutathione", *Drug Metab Dispos*, **1994**, 22, 5, 731-7
- Luo G**, Guenther TM, „Metabolism of allylbenzene 2',3'-oxide and estragole 2',3'-oxide in the isolated perfused rat liver", *J Pharmacol Exp Ther*, **1995**, 272, 2, 588-96
- Luo G**, Guenther TM, „Covalent binding to DNA *in vitro* of 2',3'-oxides derived from allylbenzene analogs", *Drug Metab Dispos*, **1996**, 24, 1020-7
- ## M
- Maron DM**, Ames BN, „Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test", *Mutat Res*, **1983**, 113, 173-215
- Marongiu B**, Piras A, Porcedda S, Scorciapino A, „Chemical composition of the essential oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Commiphora myrrha* (NEES) Engl. and of *Acorus calamus* L.", *J Agric Food Chem*, **2005**, 53, 20, 7939-43
- Marquardt H**, Schäfer SG, Lehrbuch der Toxikologie, BI Wissenschaftsverlag, **1994**, 417-34
- Marczewska J**, Drozd E, Anuszewska E, Chilmonczyk Z, Łozowicka B, „Assessment of the genotoxic activity of alpha-asarone and its derivatives in the comet assay", *Acta Pol Pharm*, **2013**, 70, 2, 349-54
- Masuda T**, Inazumi A, Yamada Y, Padolina WG, Kikuzaki H, Nakatani N, „Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*", *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3227-8
- Matsui K**, Munakata K, Wada K, „Insect antifeeding substances in *Parabenzoin praecox* and *Piper futokadzura*", *Agr Biol Chem*, **1976**, 40, 1045-6
- Melles D**, Vielhaber T, Baumann A, Zazzeroni R, Karst U, „*In chemico* evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **2013**, 913-914, 106-12, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.12.004
- Meng X**, Zhao X, Wang S, Jia P, Bai Y, Liao S, Zheng X, „Simultaneous Determination of Volatile Constituents from *Acorus tatarinowii* SCHOTT in Rat Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Selective Ion Monitoring and Application in Pharmacokinetic Study", *J Anal Methods Chem*, **2013**, 2013:949830, doi: 10.1155/2013/949830
- Meng X**, Liao S, Wang X, Wang S, Zhao X, Jia P, Pei W, Zheng X, Zheng X, „Reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance *in vitro* by  $\alpha$ -asarone and  $\beta$ -asarone, bioactive *cis-trans* isomers from *Acorus tatarinowii*", *Biotechnol Lett*, **2013**, in print, doi: 10.1007/s10529-013-1419-8
- Meyer GM**, Meyer MR, Wink CS, Zapp J, Maurer HH, „Studies on the *in vivo* contribution of human cytochrome P450s to the hepatic metabolism of glaucine, a new drug of abuse", *Biochem Pharmacol*, **2013**, 86, 1497-506, doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.025
- Meyer J**, Liesener A, Götz S, Hayen H, Karst U, „Liquid chromatography with on-line electrochemical derivatization and fluorescence detection for the determination of phenols", *Anal Chem*, **2003**, 75, 4, 922-6
- Michaelis L**, Menten ML, "Die Kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z*, **1913**, 49, 333-369
- Miele M**, Dondero R, Ciarallo G, Mazzei M, „Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. *genovese gigante*", *J Agric Food Chem*, **2001**, 49, 517-21
- Miller AEG**, Bliss JW, Schwatzmann LH, „Reductions with Dialkylaluminum Hydrides", *J Org Chem*, **1959**, 24, 627
- Miller EC**, Swanson AB, Phillips DH, Fletcher TL, Liem A, Miller JA; „Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to saffrole and estragole", *Cancer Res*, **1983**, 43, 1124-34
- Miller JA**, Miller EC, „The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors saffrole and estragole", *Br J Cancer*, **1983**, 48, 1-15
- Miller EC**, Miller JA, Boberg EW, Delclos KB, Lai CC, Fennell TR, Wiseman RW, Liem A, „Sulfuric acid esters as ultimate electrophilic and carcinogenic metabolites of some alkenylbenzenes and aromatic amines in mouse liver", *Carcinog Compr Surv*, **1985**, 10, 93-107
- Mohan RS**, Gavidinas K, Kyere S, Whalen DL, „Spontaneous hydrolysis reactions of *cis-* and *trans*-beta-methyl-4-methoxystyrene oxides (Anethole oxides): buildup of *trans*-anethole oxide as an intermediate in the spontaneous reaction of *cis*-anethole oxide", *J Org Chem*, **2000**, 65, 5, 1407-13
- Mohar BO**, Espinoza-Aguirre C, Cortinas dew NavChamorro G, Determinación de la actividad mutagénica de alpha-asarona en el sistema *Salmonella typhimurium*/ microsomas, Proceedings of 1st Congress of the Mexican Association of Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis, **1986**, referenziert in Morales-Ramírez *et al.*, 1992
- Morales-Ramírez P**, Madrigal-Bujaidar E, Mercader-Martínez J, Cassini M, González G, Chamorro-Cevallos G, Salazar-Jacobo M, „Sister-chromatid exchange induction produced by *in vivo* and *in vitro* exposure to alpha-asarone", *Mutat Res*, **1992**, 279, 269-73
- Morin PJ**, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW, „Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC", *Science*, **1997**, 21, 275, 5307, 1787-90
- Mortelmans K**, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger E, „*Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals", *Environ Mutagen*, **1986**, 8, Suppl 7, 1-119
- Motley TJ**, The Ethnobotany of Sweet Flag, *Acorus Calamus (Araceae)*, *Economic Botany*, **1994**, 48, 4, 397-412
- Moudgil V**, Redhu D, Dhanda S, Singh J, „A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses", *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **2013**, 32, 2, 165-75
- MSDS** Methylisoeugenol, CAS 93-16-3, Sigma-Aldrich, verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com>, abgerufen am 11.12.2013 (dem Anhang beigefügt)
- MSDS** Methylisoeugenol, CAS 6380-24-1, Clearsynth, verfügbar unter <http://www.clearsynth.com/docs/MSD-CS-N-01542.pdf>, abgerufen am 16.12.2013 (dem Anhang beigefügt)
- Müller F**, Arand M, Frank H, Seidel A, Hinz W, Winkler L, Hänel K, Blée E, Beetham JK, Hammock BD, Oesch F, „Visualization of a covalent intermediate between microsomal epoxide hydrolase, but not cholesterol epoxide hydrolase, and their substrates", *Eur J Biochem*, **1997**; 245, 2, 490-6
- Mumby SM**, Hammock BD, „Substrate selectivity and stereochemistry of enzymatic epoxide hydration in the soluble fraction of

- mouse liver", *Pesticide Biochem Physiol*, **1979**, 11, 275-284, doi: 10.1016/0048-3575(79)90067-1
- Murray** BP, Edwards RJ, Murray S, Singleton AM, Davies DS, Boobis AR, "Human hepatic CYP1A1 and CYP1A2 content, determined with specific anti-peptide antibodies, correlates with the mutagenic activation of PhIP", *Carcinogenesis*, **1993**, 4, 585-92
- Mukherjee** PK, Rai S, Kumar V, Mukherjee K, Hylands P, Hider R, "Plants of Indian origin in drug discovery", *Expert Opin Drug Discov*, **2007a**, 2, 633-57, doi: 10.1517/17460441.2.5.633
- Mukherjee** PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ, "In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents", *Planta Med*, **2007b**, 73, 283-5
- Mukherjee** PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ, "Acorus calamus: Scientific Validation of Ayurvedic Tradition from Natural Resources", *Pharm Biol*, **2007c**, 45, 8, 651-666, doi:10.1080/13880200701538724
- Mutschler** E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, **2001**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Myhr** BC, Caspary WJ, "Chemical mutagenesis at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells: Results for 31 coded compounds in the National Toxicology Program", *Environ Mol Mutag*, **1991**, 18, 51-83
- ## N
- Nagai** A, Duarte LM, Santos DY, "Influence of viral infection on essential oil composition of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae)", *Nat Prod Commun*, **2011**, 6, 1189-92
- Nath** A, Atkins WM, "A theoretical validation of the substrate depletion approach to determining kinetic parameters", *Drug Metab Dispos*, **2006**, 34, 1433-5
- National Toxicology Program (NTP)** "Carcinogenesis Studies of Eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies), TR 223, NTP publication No. 84-1 779, Research Triangle Park, North Carolina, USA, National Toxicology Program, **1983**
- National Toxicology Program (NTP)**, "Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol (CAS No. 93-15-12) in F344/n rats and B6C3F1 mice (gavage studies)", DRAFT NTP-TR-491; NIH, Publication No. 98-3950, **2000**
- National Toxicology Program (NTP)**, "Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)", *Natl Toxicol Program, Tech Rep Ser*, **2010**, 551, 1-178
- National Toxicology Program (NTP)**, "NTP Technical Report on the 3-Month Toxicity Studies of Estragole (CAS No. 140-67-0) Administered by Gavage to F344/N Rats and B6C3F1 Mice", *Natl Toxicol Program, Tech Rep Ser*, No. 82, **2011**
- Nebert** DW, McKinnon RA, "Cytochrome P450: Evolution and Functional Diversity"; *Progr Liv Dis*; **1994**, 12, 63
- Nebert** DW, Gonzalez FJ, "P450 genes: structure, evolution and regulation"; *Annu Rev Biochem*, **1987**, 56, 945-993
- Nelson** DR, <http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>; abgerufen am 12.11.2013. Referenziert in: Nelson DR, The Cytochrome P450 Homepage, *Human Genomics*, 2009, 4; 59-65
- ## O
- Obika** S, Yasui Y, Yanada R, Takemoto Y, "Concise synthesis of the CDE ring system of tetrahydroisoquinoline alkaloids using carbophilic Lewis acid-catalyzed hydroamidation and oxidative Friedel-Crafts cyclization", *J Org Chem*, **2008**, 73, 13, 5206-9, doi: 10.1021/jo800898k
- Oesch** F, Raphael D, Schwind H, Glatt HR, "Species differences in activating and inactivating enzymes related to the control of mutagenic metabolites", *Arch Toxicol*, **1977**, 39, 1-2, 97-108
- Oesch** F, Herrero ME, Hengstler JG, Lohmann M, Arand M, "Metabolic detoxification: implications for thresholds", *Toxicol Pathol*, **2000**, 28, 3; :382-7 (Review)
- Oesch** F, Hengstler JG, Arand M, "Detoxication strategy of epoxide hydrolase-the basis for a novel threshold for definable genotoxic carcinogens", *Nonlinearity Biol Toxicol Med*, **2004**, 2, 1, 21-6
- Omicinski** CJ, Rimmel RP, Hosagrahara VP, "Concise Review of the Cytochrome P450s and their Roles in Toxicology", *Toxicol Sci*, **1999**, 48, 151-156
- Omura** T, Sato R, "A new Cytochrome in Liver Microsomes", *J Biol Chem*, **1962**, 239, 2370-85
- Omura** T, Sato R, "The carbon monoxide binding pigment of rat liver microsomes. II. Solubilisation, purification and properties", *J Biol Chem*, **1964**, 239, 2379-85
- Opdyke** DL, "Fragrance raw materials monographs: calamus Oil", *Food Cosmet Toxicol*, **1977**, 15, 623-626
- Organikum**, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1988**, 17. Auflage
- Ortiz de Montellano** PR, "Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry", 3rd ed., New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2005**, ISBN 0-306-48324-6, doi: 10.1007/b139087
- ## P
- Pan** H, Fu X, Huang W, "Molecular mechanism of liver cancer", *Anticancer Agents Med Chem*, **2011**, 11, 493-9, (Review)
- Pandit** S, Mukherjee PK, Ponnusankar S, Venkatesh M, Srikanth N, "Metabolism mediated interaction of  $\alpha$ -asarone and *Acorus calamus* with CYP3A4 and CYP2D6", *Fitoterapia*, **2011**, 82, 369-74, doi: 10.1016/j.fitote.2010.11.009
- Park** CH, Kim KH, Lee IK, Lee SY, Choi SU, Lee JH, Lee KR, "Phenolic constituents of *Acorus gramineus*", *Arch Pharm Res*, **2011**, 34, 8, 1289-96, doi: 10.1007/s12272-011-0808-6
- Parkinson** A, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM, Safe SH, Robertson LW, Levin W, "Differential time course of induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase by Aroclor 1254", *Arch Biochem Biophys*, **1983**; 225, 1, 203-15
- Patten** CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Yang CS, "Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics", *Chem Res Toxicol*, **1993**, 6, 511-8
- Pavlakos** E, Georgiou T, Tofi M, Montagnon T, Vassilikogiannakis G, "Gamma-spiroketal gamma-lactones from 2-(gamma-hydroxyalkyl)furans: syntheses of epi-pyrenolide D and crassalactone D", *Org Lett*, **2009**, 11, 20, 4556-9, doi: 10.1021/ol901794r
- Perrier** H, Bayly C, Laliberté F, Huang Z, Rasori R, Robichaud A, Girard Y, Macdonald D, "Substituted furans as inhibitors of the PDE4 enzyme", *Bioorg Med Chem Lett*, **1999**, 9, 3, 323-6
- Phillips** DH, Miller JA, Miller EC, Adams B; "Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole", *Cancer Res*, **1981a**, 41, 176-86
- Phillips** DH, Miller JA, Miller EC, Adams B, "N2 atom of guanine and N6 atom of adenine residues as sites for covalent binding of metabolically activated 1'-hydroxysafrole to mouse liver DNA in vivo", *Cancer Res*, **1981b**, 41, 2664-71
- Phillips** DH, Hanawalt PC, Miller JA, Miller EC, "The in vivo formation and repair of DNA adducts from 1'-hydroxysafrole", *J Supramol Struct Cell Biochem*, **1981c**, 16, 83-90
- Phillips** DH, Reddy MV, Randerath K, "32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice", *Carcinogenesis*, **1984**, 5, 1623-8
- Pianalto** KM, Hartman JH, Boysen G, Miller GP, "Differences in butadiene adduct formation between rats and mice not due to selective inhibition of CYP2E1 by butadiene metabolites", *Toxicol Lett*, **2013**, 223, 221-7, doi: 10.1016/j.toxlet.2013.08.025
- Pianeza** ML, Sellers EM, Tyndale RF, "Nicotine metabolism defect reduces smoking", *Nature*, **1998**, 393, 750
- Pinot** F, Caldas ED, Schmidt C, Gilchrist DG, Jones AD, Winter CK, Hammock BD, "Characterization of epoxide hydrolase activity

- in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Possible involvement in toxin production", *Mycopathologia*, **1997**, 140, 1, 51-8
- Poplawski** J, Lozowicka B, Dubis AT, Lachowska B, Witkowski S, Siluk D, Petruszewicz J, Kaliszan R, Cybulski J, Strzałkowska M, Chilmonczyk Z, "Synthesis and hypolipidemic and antiplatelet activities of alpha-asarone isomers in humans (*in vitro*), mice (*in vivo*), and rats (*in vivo*)", *J Med Chem*, **2000**, 43, 3671-6
- Prashar** A, Locke IC, Evans CS, "Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells", *Cell Prolif*, **2006**, 39, 4, 241-8
- Priyadarsini** KI, Guha SN, Rao MN, "Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols", *Free Radic Biol Med*, **1998**, 6, 933-41
- Purchase** R, Ford GP, Creasy DM, Brantom PG, Gangolli SD, "A 28-day feeding study with methyl isoeugenol in rats", *Food Chem Toxicol*, **1992**, 30, 6, 475-81
- 
- Q**
- Qin** W, Huang S, Li C, Chen S, Peng Z, Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae)", *Pesticide Biochem Physiol*, **2010**, 132-139, doi:10.1016/j.pestbp.2009.10.006
- 
- R**
- Radford** R, Frain H, Ryan MP, Slattery C, McMorrow T, "Mechanisms of chemical carcinogenesis in the kidneys", *Int J Mol Sci*, **2013**, 14, 19416-33, doi: 10.3390/ijms141019416
- Raffo** A, D'Aloise A, Magri AL, Leclercq C, "Quantitation of trans-cinnamaldehyde, safrole and myristicin in cola-flavoured soft drinks to improve the assessment of their dietary exposure", *Food Chem Toxicol*, **2013**, 59, 626-35, doi: 10.1016/j.fct.2013.06.058
- Rajput** SB, Tonge MB, Karuppaiyl SM, "An overview on traditional uses and pharmacological profile of *Acorus calamus* LINN. (Sweet flag) and other *Acorus* species", *Phytomedicine*, **2013**, 4, S0944-7113, 13, 00407-8, doi: 10.1016/j.phymed.2013.09.020
- Ramakrishna** G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK, "From Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma: New Molecular Insights on Inflammation and Cellular Senescence", *Liver Cancer*, **2013**, 2, 367-383
- Ramos-Ocampo** VE, Hsia MTS, "Effects of acute treatments of calamus oil, beta-asarone and dimethoxy-propenylbenzenes in laboratory rats", *Phillip Ent*, **1987**, 7, 2, 129-158; referenziert in JECFA, 1981
- Ramos-Ocampo** VE, Hsia MTS, "Mutagenic and DNA-damaging activity of calamus oil, asarone isomers and dimethoxypropenylbenzenes analogues", *Phillip Ent*, **1988**, 7, 3, 275-297; referenziert in JECFA, 1981
- Rana** TS, Mahar KS, Pandey MM, Srivastava SK, Rawat AK, "Molecular and chemical profiling of 'sweet flag' (*Acorus calamus* L.) germplasm from India", *Physiol Mol Biol Plants*, **2013**, 19, 2, 231-7, doi: 10.1007/s12298-013-0164-8
- Randerath** K, Haglund RE, Phillips DH, Reddy MV, "32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice", *Carcinogenesis*, **1984**, 5, 1613-22
- Randy** RL, Hodgson E, Chapter 7 "Metabolism of Toxicants" in: A Textbook of Modern Toxicology, Third Edition, **2004**, John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 9780471646778, doi: 10.1002/0471646776.ch7
- Rao** BR, Kotharia SK, Rajput DK, Patel RP, Darokar MP, "Chemical and biological diversity in fourteen selections of four *Ocimum* species", *Nat Prod Commun*, **2011**, 6, 1705-10
- Ravindran** PN, Nirmal-Babu K, Shylaja M, "Cinnamon and Cassia: The Genus *Cinnamomum* - Medicinal and Aromatic Plants--Industrial Profiles", *Routledge Chapman & Hall Verlag*, **2003**
- Rendic** S, Guengerich FP, "Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism", *Chem Res Toxicol*, **2012**, 25, 1316-83, doi: 10.1021/tx300132k
- Richfield** D, "An investigation into the biological activity of rooibos (*Aspalathus linearis*) extracts", Master Thesis, University of Stellenbosch, **2008**, public domain
- Rietjens** IM, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SM, Schutte ME, Alink GM, "Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk", *Mutat Res*, **2005**, 574, 1-2, 124-38
- Rittle** J, Green MT, "Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics", *Science*, **2010**, 330, 6006, 933-7, doi: 10.1126/science
- Robertson** GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, Lehnert A, Liddle C; "Transgenic Mouse Models of Human CYP3A4 Gene Regulation", *Molecular Pharmacology*, **2003**, 64, 1, 42-50
- Römpp**, Lexikon der Lebensmittelchemie, Hrsg. Gerhard Eisenbrand und Peter Schreier, Thieme-Verlag, Stuttgart; 2. Auflage, **2006** und **Römpp-Online**: www.roempp.com, abgerufen zwischen **2010** und **2014**
- Rompelberg** CJ, Ploemen JH, Jaspersen S, van der Greef J, Verhagen H, van Bladeren PJ, "Inhibition of rat, mouse, and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products", *Chem Biol Interact*, **1996**, 99, 1-3, 85-97
- Rowlands** JC, Gustafsson JÅ, "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction", *Crit Rev Tox*, **1997**, 27, 109-34
- RTECS**, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, 2008, Record for benzene, 4-allyl-1,2-dimethoxy- (CAS Registry No. 93-15-2); **Originalquelle**: Engelbrecht JA, Long JP, Nichols DE, Barfknecht CF, "Pharmacologic evaluation of 3,4-dimethoxyphenyl-propenes and 3,4-dimethoxyphenylpropanediols", *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **1972**, 199, 226-244
- Rudakovski** O, Dilpomarbeit, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Jun.-Prof. Dr. Melanie Esselen, **2013**, referenziert in Groh, 2014
- 
- S**
- Säll** C, Houston JB, Galetin A, "A comprehensive assessment of repaglinide metabolic pathways: impact of choice of *in vitro* system and relative enzyme contribution to *in vitro* clearance", *Drug Metab Dispos*, **2012**, 40, 1279-89, doi: 10.1124/dmd.112.045286
- Salazar** M, Salazar S, Ulloa V, Mendoza T, Pages N, Chamorro G, "[Teratogenic action of alpha-asarone in the mouse]", [Article in French], *J Toxicol Clin Exp*, **1992**, 12, 3, 149-54
- Satyal** P, Paudel P, Poudel A, Dosoky NS, Moriarity DM, Vogler B, Setzer WN, "Chemical compositions, phytotoxicity, and biological activities of *Acorus calamus* essential oils from Nepal", *Nat Prod Commun*, **2013**, 8, 8, 1179-81
- Sauerberg** P, Mogensen JP, Jeppesen L, Bury PS, Fleckner J, Olsen GS, Jeppesen CB, Wulff EM, Pihera P, Havranek M, Polivka Z, Pettersson I, "Design of potent PPARalpha agonists", *Bioorg Med Chem Lett*, **2007**, 17, 11, 3198-202
- Savidge** RA, Förster H, "Coniferyl alcohol metabolism in conifers - II. Coniferyl alcohol and dihydroconiferyl alcohol biosynthesis", *Phytochemistry*, **2001**, 57, 7, 1095-103
- SCF**, Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyl Eugenol (4-Allyl-1,2-dimethoxybenzene), SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/4 ADD1 FINAL, 26 September **2001**, available at: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out102\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out102_en.pdf)
- SCF**, Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the presence of beta-asarone in flavourings and other food ingredients with flavouring properties, SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/9 ADD1 Final, **2002**, available at: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out111\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out111_en.pdf)
- Schecter** A, Lucier GW, Cunningham ML, Abdo KM, Blumenthal G, Silver AG, Melnick R, Portier C, Barr DB, Barr JR, Stanfill SB, Patterson DG Jr, Needham LL, Stopford W, Masten S, Mignogna J, Tung KC, "Human consumption of methyl eugenol and its elimination from serum"; *Environ*



- Health Perspect*, **2004**, 112, 6, 678-80
- Schiestl** RH, Chan WS, Gietz RD, Mehta RD, Hastings PJ, „Safrole, eugenol and methyleugenol induce intrachromosomal recombination in yeast“, *Mutat Res*, **1989**, 224, 4, 427-36
- Schmelzeisen-Redeker** G, Büttfering L, Röllgen FW, „Desolvation of ions and molecules in Thermospray Mass Spectrometry“, *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, **1989**, 90, 139-50
- Schrenk** D, „Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics“, *Biochem Pharmacol*, **1998**, 55, 1155-62
- Schrenk** D, Karger A, Lipp HP, Bock KW, „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as comitogens in cultured rat hepatocytes“, *Carcinogenesis*, **1992**, 13, 453-6
- Schultes** RE, „Hallucinogenic Plants“, illus. Smith EW, Golden Press, New York, **1976**, ISBN 0-307-24362-1
- Sekizawa** J, Shibamoto T, „Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems“, *Mutat Res*, **1982**, 101, 2, 127-40
- Shi** HX, Yang J, Yang T, Xue YL, Liu J, Li YJ, Zhang DD, Xu JW, Bian K, „Alpha-Asarone Protects Endothelial Cells from Injury by Angiotensin II“, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2014**, 2014:682041, doi: 10.1155/2014/682041
- Shimada** T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP, „Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians“, *J Pharmacol Exp Ther*, **1994**, 270, 414-23
- Shulgin** AT, „Synthesis of the trimethoxyphenylpropenes“, *Can J Chem*, **1965**, 43, 3437-3440
- Siano** F, Ghizzoni G, Gionfriddo F, Colombob E, Servilloc L, Castaldo D, „Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products“, *Food Chem*, **2003**, 81, 469-475, doi: 10.1016/S0308-8146(03)00004-9
- Simson** N, „Synthese und Zytotoxizität von Asaron-Epoxiden und Asaron-Diolen“, Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Betreuung: Alexander Cartus, **2012**
- Sinha** AK, Sharma A, Joshi BP, Singh NP, „A mild conversion of phenylpropenoid into rare phenylbutanoids: (E)-4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene and (E)-4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1-ene occurring in Zingiber cassumunar“, *Nat Prod Res*, **2005**, 19, 771-6
- Slamenová** D, Horváthová E, Wsóllová L, Sramková M, Navarová J, „Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines“, *Mutat Res*, **2009**; 677, 1-2, 46-52
- Smith** RL, Adams TB, Doull J, Feron VJ, Goodman JJ, Marnett LJ, Portoghese PS, Waddell WJ, Wagner BM, Rogers AE, Caldwell J, Sipes IG, „Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - methyl eugenol and estragole“, *Food Chem Toxicol*, **2002**, 40, 7, 851-70
- Smith** B, Cadby P, Leblanc JC, Setzer RW, „Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: methyleugenol, CASRN: 93-15-2“, *Food Chem Toxicol*, **2010**, 48 Suppl, 1, S89-97, doi: 10.1016/j.fct.2009.10.036
- Solheim** E, Scheline RR, „Metabolism of alkenebenzene derivatives in the rat. I. p-Methoxyallylbenzene (Estragole) and p-methoxypropenylbenzene (Anethole)“, *Xenobiotica*, **1973**, 3, 493-510
- Solheim** E, Scheline RR, „Metabolism of Alkenebenzene Derivates in the Rat. II. Eugenol and Isoeugenol Methyl Ethers“, *Xenobiotica*, **1976**, 6, 3, 137-50
- Soars** MG, Ring BJ, Wrighton SA, „The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of udp-glucuronosyltransferases“, *Drug Metab Dispos*, **2003**, 31, 762-7
- Sohl** CD, Isin EM, Eoff RL, Marsch GA, Stec DF, Guengerich FP, „Cooperativity in oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 1A2: highly cooperative pyrene hydroxylation and multiphasic kinetics of ligand binding“, *J Biol Chem*, **2008**, 283, 7293-308, doi: 10.1074/jbc.M709783200
- Sono** M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH, „Heme-Containing Oxygenases“, *Chem Rev*, **1996**, 96, 2841-2888, doi: 10.1021/cr9500500
- Sontag** TJ, Parker RS, „Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status“, *J Biol Chem*, **2002**, 277, , 25290-6
- Sutton** JD, Sangster A, Caldwell J, „Dose-dependent variation in the disposition of Eugenol in the rat“, *Biochem Pharm*, **1985**, 34, 3, 465-66
- Stahl** E, Keller K, „Zur Klassifizierung handelsüblicher Kalmusdrogen“, [„To the classification of commercial Calamus drugs“], *Planta Med*, **1981**, 43, 2, 128-40
- Stanfill** SB, Calafat AM, Brown CR, Polzin GM, Chiang JM, Watson CH, Ashley DL, „Concentrations of nine alkenylbenzenes, coumarin, piperonal and pulegone in Indian bidi cigarette tobacco“, *Food Chem Toxicol*, **2003**, 41, 2, 303-17
- Stegmüller** S, „Zytotoxizität von Asaronen und Asaronmetaboliten in primären Rattenhepatozyten“, Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Betreuung: Alexander Cartus, **2012**, 19
- Stich** HF, Stich W, Lam PPS, „Potentiation of genotoxicity by concurrent application of compounds found in betel quid: arecoline, eugenol, quercetin, chlorogenic acid and Mn<sup>2+</sup>“, *Mutat Res*, **1981**, 90, 355-363
- Stillwell** W, Carman JK, Bell L, Horning MG, „The metabolism of safrole and 2',3'-epoxysafrole in the rat and guinea pig“, *Drug Metab Dispos*, **1974**, 2, 489-98
- Styn** MA, Nukui T, Romkes M, Perkins KA, Land SR, Weissfeld JL, „CYP2A6 genotype and smoking behavior in current smokers screened for lung cancer“, *Subst Use Misuse*, **2013**, 48, 490-4, doi: 10.3109/10826084.2013.778280
- Sugumaran** M, Bolton J, „Direct evidence for quinone-quinone methide tautomerism during tyrosinase catalyzed oxidation of 4-allylcatechol“, *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**, 213, 2, 469-74
- Sugumaran** M, Bolton JL, „Laccase--and not tyrosinase--is the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol“, *Arch Biochem Biophys*, **1998**, 353, 2, 207-12
- Swanson** AB, Chambliss DD, Blomquist JC, Miller EC, Miller JA, „The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants“, *Mutat Res*, **1979**, 60, 143-153
- Swanson** AB, Miller EC, Miller JA, „The side-chain epoxidation and hydroxylation of the hepatocarcinogens safrole and estragole and some related compounds by rat and mouse liver microsomes“, *Biochim Biophys Acta*, **1981**, 673, 504-16
- Swenberg** JA, Ham A, Koc H, Morinello E, Ranasinghe A, Tretyakova N, Upton PB, Wu K, „DNA adducts: effects of low exposure to ethylene oxide, vinyl chloride and butadiene“, *Mutat Res*, **2000**, 464, 77-86

## T

- Takeyoshi** M, Iida K, Suzuki K, Yamazaki S, „Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test“, *J Appl Toxicol*, **2008**, 4, 530-4
- Tan** KH, Nishida R, „Methyl eugenol: its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination“, *J Insect Sci*, **2012**; 12, 56, doi: 10.1673/031.012.5601
- Taylor** JM, Jones WI, Hagan EC, Gross MA, Davis DA, Cook EL, „Toxicity of oil of calamus (Jammus variety)“, *Toxicol Appl Pharmacol*, **1967**, 10, 405
- Tennant** RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J, Caspary W, Resnick M, Stasiewicz S, Anderson B, Minor R; „Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays“, *Science*, **1987**, 236, 933-41
- Thompson** D, Constantin-Teodosiu D, Norbeck K, Svensson B, Moldéus P, „Metabolic activation of eugenol by myeloperoxidase and polymorphonuclear leukocytes“, *Chem Res Toxicol*, **1989**, 2, 3, 186-92

- Thompson** D, Norbeck K, Olsson LI, Constantin-Teodosiu D, Van der Zee J, Moldéus P, "Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite(s)", *J Biol Chem*, **1989b**, 264, 2, 1016-21
- Thompson** D, Constantin-Teodosiu D, Egestad B, Mickos H, Moldéus P, "Formation of glutathione conjugates during oxidation of eugenol by microsomal fractions of rat liver and lung", *Biochem Pharmacol*, **1990**, 39, 10, 1587-95
- Thompson** DC, Constantin-Teodosiu D, Moldéus P; "Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes"; *Chem Biol Interact*, **1991**, 2; 137-47
- Thompson** DC, Perera K, Krol ES, Bolton JL, "o-Methoxy-4-alkylphenols that form quinone methides of intermediate reactivity are the most toxic in rat liver slices", *Chem Res Toxicol*, **1995**, 8, 3, 323-7
- Truhaut** R, Le Bourhis B, Attia M, Glomot R, Newman J, Caldwell J, "Chronic toxicity/carcinogenicity study of trans-anethole in rats", *Food Chem Toxicol*, **1989**, 27, 1, 11-20
- Tsai** YC, Li PY, Chen CC, Liu YC, "Is the oxidative DNA damage level of human lymphocyte correlated with the antioxidant capacity of serum or the base excision repair activity of lymphocyte?", *Oxid Med Cell Longev*, **2013**, 2013:237583, doi: 10.1155/2013/237583
- Tsai** RS, Carrupt PA, Testa B, Caldwell J, "Structure-genotoxicity relationships of allylbenzenes and propenylbenzenes: a quantum chemical study", *Chem Res Toxicol*, **1994**, 7, 1, 73-6 (Erratum in: *Chem Res Toxicol*, **1995**)
- U**
- Uchida** M, Nakajin S, Toyoshima S, Shinoda M, "Antioxidative effect of sesamol and related compounds on lipid peroxidation", *Biol Pharm Bull*, **1996**, 4, 623-26
- Uchida** GK, Mackey BE, McInnis DO, Vargas RI, "Attraction of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) and nontarget insects to methyl eugenol bucket traps with different preservative fluids on Oahu Island, Hawaiian Islands", *J Econ Entomol*, **2007**, 100, 3, 723-9
- Ueno** T, Gonzalez FJ, "Transcriptional control of the rat hepatic CYP2E1 gene", *Mol Cell Biol*, **1990**, 10, 4495-505
- UNEP** Chemicals (United Nations Environment Programme), "Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs", **1999**, <http://www.chem.unep.ch/pops/pdf/PCBident/pcb1d1.pdf>, abgerufen im Juni 2014
- Unger** P, Melzig MF, "Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of alpha- and Beta-asarone", *Sci Pharm*, **2012**, 80, 3, 663-8
- Usui** T, Mise M, Hashizume T, Yabuki M, Komuro S, "Evaluation of the potential for drug-induced liver injury based on *in vitro* covalent binding to human liver proteins", *Drug Metab Dispos*, **2009**, 37, 12, 2383-92, doi: 10.1124/dmd.109.028860
- V**
- Valliccotti** S, "Untersuchungen zur Genotoxizität von Asaron-Isomeren *in vitro*", Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Jun.-Prof. Dr. Melanie Esselen, Betreuung: Melanie Esselen, **2012**, 18-21
- van den Berg** SJ, Serra-Majem L, Coppens P, Rietjens IM, "Safety assessment of plant food supplements (PFS)", *Food Funct*, **2011a**, 2, 12, 760-8, doi: 10.1039/c1fo10067j
- van den Berg** SJ, Restani P, Boersma MG, Delmulle L, Rietjens IM, "Levels of Genotoxic and Carcinogenic Compounds in Plant Food Supplements and Associated Risk Assessment", *Food Nutr Sci*, **2011b**, 2, 989-1010, doi:10.4236/fns.2011.29134
- Varani** J, Perone P, Spahlinger DM, Singer LM, Diegel KL, Bobrowski WF, Dunstan R, "Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage" *Toxicol Pathol*, **2007**; 35, 5, 693-701
- Variyar** PS, Ahmad R, Bhat R, Niyas Z, Sharma A, "Flavoring components of raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing", *J Agric Food Chem*, **2003**, 51, 27, 7945-50
- W**
- Waddell** WJ, "Thresholds of carcinogenicity of flavors", *Toxicol Sci*, **2002**, 68, 275-9 (Review)
- Waddell** WJ, "Thresholds of carcinogenicity in the ED01 study", *Toxicol Sci*, **2003**, 72, 158-63
- Wahl** A, "Etablierung des Ames- Platteninkubationstests unter Anwendung auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asaron" Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Schrenk, **2014**, Betreuung: Dr. H.-J. Schmitz
- Wang** MY, Vakharia V, Bentley WE, "Expression of epoxide hydrolase in insect cells: a focus on the infected cell", *Biotechnol Bioeng*, **1993**, 42, 2, 240-6
- Wang** LZ, Ramirez J, Yeo W, Chan MY, Thuya WL, Lau JY, Wan SC, Wong AL, Zee YK, Lim R, Lee SC, Ho PC, Lee HS, Chan A, Ansher S, Ratain MJ, Goh BC, "Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients", *PLoS One*, **2013**, 8, e54522, doi: 10.1371/journal.pone.0054522
- Wang** ZJ, Levinson SR, Sun L, Heinbockel T, "Identification of both GABAA receptors and voltage-activated Na(+) channels as molecular targets of anticonvulsant  $\alpha$ -asarone", *Front Pharmacol*, **2014**, 5, 40, doi: 10.3389/fphar.2014.00040
- Watabe** T, Akamatsu K, Kiyonaga K, "Stereoselective hydrolysis of *cis*- and *trans*-stilbene oxides by hepatic microsomal epoxide hydrolase", *Biochem Biophys Res Commun*, **1971**, 44, 1, 199-204
- Weishaupt** LW, "Metabolismus von Methyleugenol und Methylisoeugenol in primären Rattenhepatozyten: Etablierung einer Aufarbeitungsmethode zur Isolierung von Metaboliten", Forschungsarbeit, TU Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Betreuung: Alexander Cartus, **2010**, 7-8
- Weishaupt** LW, "Zytotoxizität ausgewählter oxidativer Metaboliten von Methyleugenol und Methylisoeugenol an primären Rattenhepatozyten", Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, FB Chemie, FR Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Betreuung: Alexander Cartus, **2011**, 17-27
- Werning** S, Photo reprinted with permission from CalPhotos Database, University of California, Berkeley. Copyright © **2007** Sarah Werning; <http://calphotos.berkeley.edu/>, abgerufen am 24.11.2013
- White** JM, White IR, Glendinning A, Fleming J, Jefferies D, Basketter DA, McFadden JP, Buckley DA; "Frequency of allergic contact dermatitis to isoeugenol is increasing: a review of 3636 patients tested from 2001 to 2005"; *Br J Dermatol*, **2007**, 157, 580-82
- White** IR, Johansen JD, Arnau EG, Lepoittevin JP, Rastogi S, Bruze M, Andersen KE, Frosch PJ, Goossens A, Menné T, "Isoeugenol is an important contact allergen: can it be safely replaced with isoeugenyl acetate?" *Contact Dermatitis*, **1999**, 41, 5, 272-5
- Williams** GM, Mattia A, "Alkoxy-substituted allylbenzenes present in foods and essential oils and used as flavouring agents. In: Safety evaluation of certain food additives", Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO food additives series no. 60, **2009**, 351-480. Verfügbar unter: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241660600\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241660600_eng.pdf), abgerufen im Dezember 2013
- Williams** GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM, Duan JD, "Methyleugenol hepatocellular cancer initiating effects in rat liver", *Food Chem Toxicol*, **2013**, 53, 187-96, doi: 10.1016/j.fct.2012.11.050
- Wiseman** RW, Fennell TR, Miller JA, Miller EC, "Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole *in vitro* and in mouse liver *in vivo*, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues", *Cancer Res*, **1985**, 45, 3096-105
- Wiseman** RW, Miller EC, Miller JA, Liem A, "Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives

- related to estragole and safrole on administration to preweaning male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice", *Cancer Res*, **1987**, 47, 2275-83
- Wislocki** PG, Borchert P, Miller JA, Miller EC, „The metabolic activation of the carcinogen 1'-hydroxysafrole *in vivo* and *in vitro* and the electrophilic reactivities of possible ultimate carcinogens", *Cancer Res*, **1976**, 36, 1686-95
- Wislocki** PG, Miller EC, Miller JA, McCoy EC, Rosenkranz HS, „Carcinogenic and mutagenic activities of safrole, 1'-hydroxysafrole, and some known or possible metabolites", *Cancer Res*, **1977**, 37, 1883-91
- Wörner** W, Schrenk D, Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1", *Cancer Res*, **1996**, 56, 1272-8
- microsomes", *Drug Metab Dispos*, **2008**, 36, 331-8
- Zhuan** Fang, Guo-Chuan Zhou, Shi-Long Zheng, Guang-Li He, Ju-Lian Li, Ling He, Di Bei, "Lithium chloride-catalyzed selective demethylation of aryl methyl ethers under microwave irradiation" *J Mol Catal A*, **2007**, 274, 1-2, 16-23
- Ziegler** K, Schneider K, Schneider J, „Aluminiumtrialkyle und Dialkyl-Aluminiumhydride als Reduktionsmittel", *Liebigs Ann Chem*, **1959**, 623, 9
- Zuba** D, Byrska B, „ Alpha- and beta-asarone in herbal medicinal products. A case study", *Forensic Sci Int*, **2012**, 223, 1-3, e5-9, doi: 10.1016/j.forsciint.2012.08.015

---

## X

- Xing** L, Wang X, Cheng C, Zhu R, Liu B, Hu Y; "A solvent-controlled highly efficient Pd-C catalyzed hydrogenolysis of benzaldehydes to methylbenzenes via a novel 'acetal pathway", *Tetrahedron* **2007**, 63, 38, 9382-6

---

## Y

- Yabiku** HK, "Calamus oil - Toxicological aspects and their control in alcoholic beverages", **1980**, M. S. Thesis, Sao Paulo, Brazil; zitiert in JECFA, 1981
- Yamazaki** H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP, "Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5", *J Biol Chem*, **1996**, 271, 44, 27438-44
- Yee** D, Wiedner H, Eckstein F, „Biphasic steady-state kinetics of myosin adenosine triphosphatase. Evidence for a substrate effector site", *Eur J Biochem*, **1980**, 113, 85-90
- Yoshida** R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon JT, Yokoi T, "Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism", *Br J Clin Pharmacol*, **2002**, 54, 511-7
- Yuan** R, Madani S, Wei XX, Reynolds K, Huang SM, „Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions", *Drug Metab Dispos*, **2002**, 30, 1311-9

---

## Z

- Zakharkin** LI, Khorlina IM, "Reduction of esters of carboxylic acids into aldehydes with diisobutylaluminium hydride", *Tetrahedron Lett*, **1962**, 3, 14, 619-620
- Zarbl** H, Gallo MA, Glick J, Yeung KY, Vouros P, „The vanishing zero revisited: thresholds in the age of genomics", *Chem Biol Interact*, **2010**, 184, 273-8, doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.031
- Zhang** ZY, Pelletier RD, Wong YN, Sugawara M, Zhao N, Littlefield BA, "Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells" *Biochem Biophys Res Commun*, **2006**; 341, 2, 399-407
- Zhao** LQ, Sun ZH, Zheng P, Zhu LL, "Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*", *Biotechnol Lett*, **2005**, 19, 1505-9
- Zheljzkov** VD, Callahan A, Cantrell CL, "Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi", *J Agric Food Chem*, **2008**, 56, 241-5
- Zheng** W, Zhu C, Peng T, Zhang H, „Odorant receptor co-receptor Orco is upregulated by methyl eugenol in male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)" *J Insect Physiol*, **2012**, 58, 8, 1122-7, doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.05.011
- Zhu** B, Bush D, Doss GA, Vincent S, Franklin RB, Xu S, "Characterization of 1'-hydroxymidazolam glucuronidation in human liver

---

# Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits vor deren Niederschrift veröffentlicht:

## Peer-review Artikel

- 1) Cartus AT, Merz KH, Schrenk D, "Metabolism of methylisoeugenol in liver microsomes of human, rat, and bovine origin", *Drug Metab Dispos*, **2011**, 39, 1727-33, doi: 10.1124/dmd.111.038851.
- 2) Groh IA, Cartus AT, Vallicotti S, Kajzar J, Merz KH, Schrenk D, Esselen M, "Genotoxic potential of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites in cultured Chinese hamster V79 cells", *Food Funct*, **2012**, 3, 428-36, doi: 10.1039/C2FO10221H.
- 3) Cartus AT, Herrmann K, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Schrenk D, „Metabolism of Methyleugenol in Liver Microsomes and Primary Hepatocytes: Pattern of Metabolites, Cytotoxicity, and DNA-Adduct Formation“, *Toxicol Sci*, **2012**, 129, 21-34, doi: 10.1093/toxsci/kfs181.
- 4) Groh IA, Chen C, Lüske C, Cartus AT, Esselen M, "Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells", *J nutr metab*, **2013**, Article ID 821082, doi: 10.1155/2013/821082.
- 5) Herrmann K, Engst W, Meinel W, Florian S, Cartus AT, Schrenk D, Appel KE, Nolden T, Himmelbauer H, Glatt H, „Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2“, *Carcinogenesis*, **2014**, 35, 4, 935-41, doi: 10.1093/carcin/bgt408.

## Sonstige Zeitschriftenveröffentlichungen

- 1) Cartus AT, Schrenk D, „Kanzergene Lebensmittelinhaltsstoffe: Phenylpropene – Natürlich riskant“, *labor&more*, **2013**, Ausgabe September/Oktober,  
URL der Zeitschrift: <http://www.laborundmore.de/news/News-Archiv.html>.

## Buchkapitel

- 1) Cartus AT, "D-Amino Acids and cross-linked amino acids as food contaminants" in: Schrenk D, Editor, *Chemical contaminants and residues in food*, **2012**, 235, 286-319, Woodhead Publishing, ISBN: 978-0-85709-058-4, doi: 10.1533/9780857095794.2.286.

## Vorträge

- 1) Cartus AT, Merz KH, Schrenk D, "Identification and quantification of microsomal metabolites of methyleugenol", *Biological Reactive Intermediates VIII*, July, 15.-18., **2010**, Barcelona.
- 2) Cartus AT, Merz KH, Weishaupt LW, Schrenk D, „In vitro Metabolism of Methyleugenol (ME): Identification, Quantification and Cytotoxicity of Hepatic Metabolites“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 383, S12. 77. Jahrestagung der DGPT, 30. März–01. April **2011**, Frankfurt/Main.
- 3) Cartus AT, Herrmann K, Weishaupt LW, Groh IA, Engst W, Merz KH, Esselen M, Glatt H, Schrenk D, „In vitro Metabolismus von Methyleugenol (ME): Identifizierung, Quantifizierung, Zytotoxizität und Gentoxizität hepatischer Metaboliten“. Arbeitstagung des Regionalverbandes der LChG in der GDCh, 5.-6. März, **2012**, Kaiserslautern.
- 4) Groh I, Kajzar J, Cartus AT, Merz KH, Esselen M, „Genotoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten in vitro“. Arbeitstagung des Regionalverbandes der LChG in der GDCh, 5.-6. März **2012**, Kaiserslautern.
- 5) Cartus AT, Stegmüller S, Vallicotti S, Merz KH, Esselen M, Schrenk D, „In vitro Metabolismus ausgewählter Phenylpropanoide: Identifizierung, Quantifizierung, Zytotoxizität und Gentoxizität

---

hepatischer Metaboliten". *Lebensmittelchemie*, 2012, 66, 3, 42–44, 41, doi: 10.1002/lemi.201290087 und *Lebensmittelchemie*, 2012, 66, 6, 151–161, doi: 10.1002/lemi.201290116, Dt. Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September **2012**, Münster.

- 6) Cartus AT, Groh IA, Weishaupt LW, Herrmann K, Vallicotti S, Merz K-H, Esselen M, Glatt H, Schrenk D, "In vitro-metabolism and genotoxicity of phenylpropanoids", PhD-Day, **2012**, Trier.
- 7) Cartus AT, Bischoff R, Berg K, Vallicotti S, Glatt H, Esselen M, Schrenk D, "Phase I metabolism and mutagenicity of phenylpropenes occurring in food: Implications for their carcinogenic mode of action", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 387, Suppl. 1, S6, 80. Jahrestagung der DGPT, 01.–03. April **2014**, Hannover.

## Poster

- 1) Cartus AT, Merz KH, Schrenk D, "Identification and quantification of microsomal metabolites of methyleugenol and methylisoeugenol", Biological Reactive Intermediates VIII, July, 15.-18., **2010**, Barcelona
- 2) Cartus AT, Merz KH, Schrenk D. „Identifizierung und Quantifizierung mikrosomaler Metaboliten von Methyleugenol und Methylisoeugenol. *Lebensmittelchemie*, 2011, 65, 81-112, doi: 10.1002/lemi.20129005139, Dt. Lebensmittelchemikertag, 20.–22. September **2010**, Stuttgart.
- 3) Groh IA, Cartus AT, Merz KH, Esselen M. "DNA strand breaking properties of oxidative methyleugenol metabolites in V79 cells". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 383, S87, doi: 10.1007/s00210-011-0617-y, 77. Jahrestagung der DGPT, 30. März–01. April **2011**, Frankfurt/Main.
- 4) Cartus AT, Groh IA, Weishaupt LW, Merz KH, Esselen M, Schrenk D. „In vitro Metabolismus von Methyleugenol (ME): Identifizierung, Quantifizierung, Zytotoxizität und Genotoxizität hepatischer Metaboliten", *Lebensmittelchemie*, 2012, 66, 5, 97–121, doi: 10.1002/lemi.201290110, 40. Dt. Lebensmittelchemikertag, 12.–14. September **2011**, Halle/Saale.
- 5) Vallicotti S, Groh IA, Cartus AT, Esselen M, "DNA-strangbrechendes Potential verschiedener Asarone in V79-Zellen". Regionaltagung der LChG in der GDCh, 5.-6. März **2012**, Kaiserslautern.
- 6) Cartus AT, Groh IA, Weishaupt LW, Merz KH, Esselen M, Schrenk D, „In vitro Metabolism of Methyleugenol (ME) and Methylisoeugenol (MIE): Identification, Quantification and Cytotoxicity of Hepatic Metabolites". 51<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), March 11–15, **2012**, San Francisco, CA, USA.
- 7) Cartus AT, Herrmann K, Groh IA, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Esselen M, Schrenk D, „Toxicological Properties of Methyleugenol and Methylisoeugenol Metabolites". 48<sup>th</sup> EUROTOX Congress, June 17–20, **2012**, Stockholm.
- 8) Cartus AT, Herrmann K, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Schrenk D, "Toxicological Properties of Methyleugenol and Methylisoeugenol Metabolites", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 386, Suppl. 1, S16, 79. Jahrestagung der DGPT, 05.–07. März **2013**, Halle/Saale.
- 9) Cartus AT, Schrenk D, "Microsomal Metabolism of Asarone Isomers", 52<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), March 10–14, **2013**, San Antonio, TX, USA.
- 10) Cartus AT, Schrenk D, "Contribution of Six Human CYP Enzymes to the Metabolism of the Food Constituents Methyleugenol, Methylisoeugenol, Alpha-, Beta-, and Gamma-Asarone", 53<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT), March 23–27, **2014**, Phoenix, AZ, USA.
- 11) Cartus AT, Schrenk D, „Contribution of six human CYP enzymes to the metabolism of the food constituents methyleugenol, methylisoeugenol, alpha-, beta-, and gamma-asarone", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 387, Suppl. 1, S33, 80. Jahrestagung der DGPT, 01.–03. April **2014**, Hannover.

---

# Erklärungen

Hiermit erkläre ich, Alexander Thomas Cartus, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Metabolismus der Phenylpropene Methyleugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron“**

selbstständig verfasst und dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor der Erstellung dieser Dissertation auf Kongressen oder in Printmedien veröffentlicht (siehe Eigene Publikationen).

Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 07. Oktober 1999 ist mir bekannt.

Die vorliegende Dissertation stellt eine thematische Fortführung der zuvor von mir angefertigten Diplomarbeit dar, was zwangsläufig zu Überschneidungen führte. Teilweise in Diplomarbeit und Dissertation analoge Versuchsdurchführungen wurden im „Experimentellen Teil“ in der vorliegenden Dissertation der Vollständigkeit wegen erneut wiedergegeben.

Die im Kapitel „Ergebnisse“ dieser Dissertation dargestellten experimentellen Ergebnisse entstammen, wenn nicht explizit ausnahmsweise anders vermerkt, aus meiner Promotionszeit und die Experimente wurden, wenn nicht anders lautend kenntlich gemacht, von mir persönlich durchgeführt.

Manche Experimente zum Metabolismus von Methyleugenol und Methylisoeugenol, die im Rahmen meiner Diplomarbeit in Einzelexperimenten untersucht wurden ( $n = 1$ ), wurden für die vorliegende Dissertation erneut unter ähnlichen, verbesserten experimentellen Bedingungen in neuen, unabhängigen Experimenten statistisch abgesichert ( $n = 3$ ). Auch wenn die wissenschaftlichen Ergebnisse dabei zum größten Teil bestätigt werden konnten, handelt es sich hierbei ausdrücklich um neue Ergebnisse.

Kaiserslautern, den

2014

---

Alexander Thomas Cartus

---

# Lebenslauf

Alexander Thomas Cartus

## Hochschulbildung

seit Februar 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)
15.01.2010–31.05.2013	Doktorand im AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)
2009	Abschluss als Diplom-Chemiker
2001–2009	Studium der Diplom-Chemie, TU Kaiserslautern
März–Dezember 2009	Diplomarbeit im AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (Lebensmittelchemie und Toxikologie). „Identifizierung und Quantifizierung mikrosomaler Metaboliten von Eugenol, Isoeugenol, Methyleugenol und Methylisoeugenol“.
August–Oktober 2007	Forschungsarbeit im AK Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand (Lebensmittelchemie und Toxikologie in Kooperation mit den Arbeitskreisen der Organischen Chemie): „Totalsynthese von Alternariol und Alternariol-9-methylether“.
Nov. 2006–Feb. 2007	Forschungsarbeit im AK Prof. Hans-Jörg Krüger, PhD. (Anorganische Chemie): „Synthese von Amid-Thiol-Liganden und deren Komplexe mit Nickel und Kupfer als Biomimetika der Acetyl-CoA-Synthase/Kohlenmonoxiddehydrogenase“.
April–August 2006	Forschungsarbeit im AK Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie): „Einfluss von Extrakten aus Grapefruit- und Selleriesaft auf die Cytochrom P450 1A-Aktivität in den Hepatomzelllinien H4IIE (Ratte) und HepG2 (human)“.

## Weiterbildungen

seit 2011	Seit 2011 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der DGPT. <i>Absolvierte Kurse:</i> Lebensmitteltoxikologie (Kaiserslautern, 2011), Versuchstierkunde I (Erfurt, 2012), Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik (Dortmund, 2012), Molekulare Zelltoxikologie (Neuherberg, 2012); Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I (Erfurt, 2013), Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II (Erfurt, 2013), Versuchstierkunde II (Jena, 2013)
-----------	---

## Mitgliedschaften

seit 2011	Gesellschaft für Toxikologie (GT) in der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh) Lebensmittelchemische Gesellschaft (LChG) in der GDCh
-----------	--

---

# DANK E!

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen. Ganz besonders danke ich Ihnen für die vielen Freiheiten die Sie mir während der Durchführung meiner Promotion gewährten, für Ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die Gelegenheiten an zahlreichen Tagungen und Weiter-bildungen aktiv teilnehmen zu dürfen. Nicht zuletzt danke ich Ihnen aber besonders herzlich für Ihr in mich gesetztes Vertrauen, die Betrauung mit lehrreichen „besonderen Aufgaben“, Ihre alles andere als selbstverständliche und unaufwiegbare Förderung in den letzten Jahren sowie für Ihre Geduld.

Frau (Junior-)Professorin Dr. Melanie Esselen danke ich von Herzen für die tolle, freundschaftliche und gewinnbringende Zusammenarbeit während der letzten Jahre, die Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Professor Dr. Dr. Niedner-Schatteburg danke ich herzlich für die bereitwillige Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Karl-Heinz Merz danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit. Ferner gilt Ihnen mein besonderer Dank für die vielen Dinge die ich während meines Forschungspraktikums, meiner Diplomarbeit und bis heute von Ihnen lernen durfte.

Herrn Professor Dr. Hansruedi Glatt, Herrn Dr. Walter Meinl, Herrn Dr. Wolfram Engst und Frau Dr. Kristin Herrmann vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Nuthetal danke ich herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die vielen bereichernden Diskussionen. Ferner gilt Herrn Glatt und Herrn Meinl mein großer Dank für die großzügige Überlassung SULT/CYP-exprimierender V79-Zellen und -Salmonellen.

Frau Monika Groß und Frau Melanie Beckmann danke ich für die Organpräparation und Herrn Dr. Hans-Joachim Schmitz für die Behandlung der Tiere. Herrn Dr. Xinlai Cheng und Herrn Professor Dr. Gerhard Eisenbrand danke ich für die freundliche Überlassung der Rinderlebermikrosomen.

Denise Scherbl und Thomas Seibel danke ich für die Hilfe bei der LC-MS/MS-Analytik. Ebenso danke ich Christiane Müller für die Anfertigung der NMR-Spektren und den Arbeitskreisen der Anorganischen Chemie für die Möglichkeit an deren Geräte IR-Spektren messen zu dürfen.

Herrn Dr. Harald Kelm danke ich für die zeitnahe Messung von Röntgenbeugungsmustern und deren gewissenhafte Strukturanalyse und die z. T. durchaus wissenschaftlichen Plaudereien.

Herrn Rainer Scheuermann und Herrn Aribert Vetter danke ich für deren Hilfestellung bei technischen und organisatorischen Herausforderungen und die Flurgespräche.



Anita Strothauer, Ingrid Hemm, Heike Schramm und Eva Gorgus danke ich herzlich für die Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitskreise der Lebensmittelchemie und Toxikologie für deren Freundschaft und stete Hilfsbereitschaft.

All „meinen“ Forschungspraktikanten und Diplomanden, die ich direkt oder indirekt betreut habe und die mit Ihrem fleißigen Einsatz und gewissenhaften Arbeiten einen Beitrag zum (hoffentlichen) Gelingen dieser Arbeit geleistet haben: Dipl.-LMChem. Lucas W. Weishaupt (Forschungsarbeit 2010, Diplomarbeit 2011), Thomas Schömann (Forschungsarbeit 2010), Dr. Isabel Groh, Dipl.-LMChem. Charlotte Legrum, Dipl.-Chem. Nadine Simson (Forschungsarbeit 2012), Dipl.-LMChem. Simone Stegmüller (Forschungsarbeit 2012, Diplomarbeit 2013), Liubov Melnikova (Forschungsarbeit 2013) und Dipl.-Chem. Roland Bischoff (Diplomarbeit 2013), Max Gerlach und David Feye (Forschungsarbeit 2014) sowie Sven Kercher (Diplomarbeit 2014).

Roland Bischoff gilt ferner mein herzlicher Dank für die Durchsicht des Syntheseteils dieser Arbeit sowie für die wertvollen Tipps bei ~~U~~~~P~~~~O~~~~G~~~~R~~~~A~~~~P~~~~H~~~~I~~~~S~~~~C~~~~H~~~~E~~~~N~~ Fragen. Sarah Werning und Roland Bischoff danke ich weiterhin für die Überlassung der auf dem Umschlag gezeigten Bilder.

Ich danke Bert und seinem großen Bruder Garfield, die trotz ihres besorgniserregend hohen Alkoholkonsums zusammen fast ein halbes Jahr 24/7 ohne größere Probleme oder Ausfälle meine Proben gemessen, d. h. getrennt und analysiert haben und mich dabei nicht im Stich ließen.

Ferner danke ich meinen Schullehrern, die mich bereits früh für Naturwissenschaften begeistern konnten, bzw. meine Begeisterung früh förderten: Herrn Ewald Rothausen, Herrn Thorsten Geist und Frau OStR' Katharina Vogt.

Dr. Christoph Seubert danke ich für viele schöne Stunden am Snooker-Tisch und seine immer kompetenten chemischen Ratschläge.

Meinen Kollegen und Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben: Kevin Kohns und Dorothee Hecker, Eva und Markus Waldecker, Jennifer Schygulla, Dr. Manuela Göttel, Dr. Helena Ufelmann, Sylke Neser, Maike Gähns, Jens Brück, Tom Seibel, Anastasia Messer, Dr. Christiane Lohr, Kerstin Berg und Lucas Weishaupt sowie Peter Lorenz, Stefan Burghardt, Dr. Christoph Weirich, Jürgen und Uwe Zimmer und Dr. Cornelia Eck.

Meiner Familie und Schwiegerfamilie danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind und waren.

Last but not least:

Danke Kathrin!

## **Anhang**

Im Folgenden wird (aus Gründen der Datengröße) lediglich Kapitel **A12 Permissions** des Anhanges reproduziert. Der vollständige Anhang ist auf dem Datenträger (DVD), welcher der Printversion dieser Arbeit beiliegt, zugänglich.

# A

# A n h a n g

Der elektronische Anhang dieser Arbeit gliedert sich in einen pdf-Teil und einen Daten-Teil:

## Inhaltsverzeichnis pdf

<b>A1</b>	Tabellen zu den Diagrammen/Abbildungen .....	1
<b>A2</b>	Michaelis-Menten-, Hill- und Eadie-Hofstee-Plots der Inkubationen von Lebermikrosomen und Supersomes <sup>TM</sup> mit <b>1-5</b> .....	12
<b>A3</b>	NMR-Spektren.....	162
<b>A4</b>	Kristallographische Daten von $\beta$ -Asaron ( <b>4</b> ).....	201
<b>A5</b>	CHN-Analyse $\beta$ -Asaron ( <b>4</b> ) .....	209
<b>A6</b>	Massenspektren (Reinsubstanzen) .....	210
<b>A7</b>	Massenspektren (Inkubationen) .....	254
<b>A8</b>	UV-Vis-Spektren .....	274
<b>A9</b>	Chromatogramme- Zeitverlauf.....	289
<b>A10</b>	Chromatogramme- Kinetik .....	341
<b>A11</b>	Datenblätter BD Ultra Pool <sup>TM</sup> HLM und Supersomes <sup>TM</sup> .....	482
<b>A12</b>	Permissions.....	499
<b>A13</b>	Reprints der Erst-Autor Veröffentlichungen .....	515

## Inhaltsverzeichnis Datenträger

- Dissertation + Anhang
  - zitierte Literatur (Dateiname: „Erstautor\_Publikationsjahr“, z. B. „Miller\_1983.pdf“)
-

# A12

Permissions

## Abbildung 4

„Prozentualer Anteil verschiedener Enzyme an Phase-I- und -II-Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus. Aus/From: Evans WE, Relling MV, *Science*, 1999, 286, 5439, 487-91. Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from AAAS; © 1999“

American Association for the Advancement of Science TERMS AND CONDITIONS

Regarding your request, we are pleased to grant you non-exclusive, non-transferable permission, to republish the AAAS material identified above in your work identified above, subject to the terms and conditions herein. We must be contacted for permission for any uses other than those specifically identified in your request above.

"This translation is not an official translation by AAAS staff, nor is it endorsed by AAAS as accurate. In crucial matters, please refer to the official English-language version originally published by AAAS."

### Reproducing AAAS Material in your Thesis or Dissertation

**NOTE:** If you are the Original Author of the AAAS article being reproduced, please refer to your License to Publish for rules on reproducing your paper in a dissertation or thesis. AAAS permits the use of content published in its journals *Science*, *Science Technical Medicine*, and *Science Signaling*, but only provided the following criteria are met.

1. If you are using figure(s)/table(s), permission is granted for use in print and electronic versions of your dissertation or thesis.
2. A full text article may be used only in print versions of a dissertation or thesis. AAAS does not permit the reproduction of full text articles in electronic versions of theses or dissertations.
3. The following credit line must be printed along with the AAAS material: "From [Full Reference Citation]. Reprinted with permission from AAAS."
4. All required credit lines and notices must be visible any time a user accesses any part of the AAAS material and must appear on any printed copies that an authorized user might make.
5. The AAAS material may not be modified or altered except that figures and tables may be modified with permission from the author. Author permission for any such changes must be secured prior to your use.
6. AAAS must publish the full paper prior to your use of any of its text or figures.
7. If the AAAS material covered by this permission was published in *Science* during the years 1974–1994, you must also obtain permission from the author, who may grant or withhold permission, and who may or may not charge a fee if permission is granted. See original article for author's address. This condition does not apply to news articles.
8. If you are an Original Author on the AAAS article being reproduced, please refer to your License to Publish for rules on reproducing your paper in a dissertation or thesis.

Permission covers the distribution of your dissertation or thesis on demand by a third party distributor (e.g. ProQuest / UMI), provided the AAAS material covered by this permission remains in situ and is not distributed by that third party outside of the context of your Thesis/Dissertation.

Permission does not apply to figures/photos/artwork or any other content or materials included in your work that are credited to non-AAAS sources. If the requested material is sourced to or references non-AAAS sources, you must obtain authorization from that source as well before using that material. You agree to hold harmless and indemnify AAAS against any claims arising from your use of any content in your work that is credited to non-AAAS sources.

By using the AAAS Material identified in your request, you agree to abide by all the terms and conditions herein.

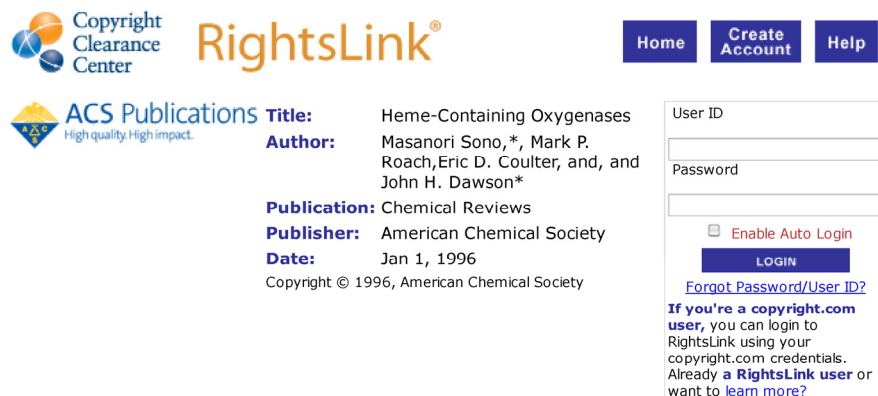
AAAS makes no representations or warranties as to the accuracy of any information contained in the AAAS material covered by this permission, including any warranties of merchantability or fitness for a particular purpose.

Questions about these terms can be directed to the AAAS Permissions department at [permissions@aaas.org](mailto:permissions@aaas.org).

## Abbildung 6

„Verschiedene Cytochrom P450-katalysierte Reaktionen.

Reprinted with permission from Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH, Chem Rev, 1996, 96, 2841-2888. Copyright © 1996 American Chemical Society.“



The screenshot shows the RightsLink interface. On the left, there are logos for Copyright Clearance Center and ACS Publications. The main content area displays the following information:

- Title:** Heme-Containing Oxygenases
- Author:** Masanori Sono,\*, Mark P. Roach, Eric D. Coulter, and, and John H. Dawson\*
- Publication:** Chemical Reviews
- Publisher:** American Chemical Society
- Date:** Jan 1, 1996
- Copyright © 1996, American Chemical Society

On the right, there is a login form with fields for 'User ID' and 'Password', an 'Enable Auto Login' checkbox, and a 'LOGIN' button. Below the form are links for 'Forgot Password/User ID?' and a note: 'If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?' Navigation buttons 'Home', 'Create Account', and 'Help' are located at the top right.

### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2013 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

## Abbildung 7

„Katalytische Triade zum Mechanismus der enzymatischen Epoxidhydrolyse am Beispiel von Oxiran durch mEH sowie Energiediagramme der katalysierten Reaktion (schwarz) und der nicht-katalysierten Reaktion (grau). Aus/mit freundlicher Genehmigung von: Arand *et al.*, EXCLI J, 2003, 2, 22-30.“

**Gesendet:** Montag, 09. Dezember 2013 um 13:00 Uhr

**Von:** "Peter Roos" <roos@ifado.de>

**An:** "Alexander Cartus" <djschemika@gmx.de>

**Betreff:** AW: Permission request

Lieber Herr Cartus,

soweit ich weiß ist es für Dissertationen nicht notwendig eine Genehmigung zur Verwendung einer Zeitschriften-Abbildung einzuholen. Die Quelle muss nur klar und deutlich zitiert werden. Da Sie jetzt auch noch angefragt haben und ich da kein Problem sehe, sind Sie auf der sicheren Seite.

Schöne Grüße,  
Peter Roos

**Von:** Alexander Cartus [mailto:djschemika@gmx.de]

**Gesendet:** Sonntag, 1. Dezember 2013 18:14

**An:** roos@ifado.de

**Betreff:** Permission request

Lieber Herr Dr. Roos,

ich wende mich an Sie in Ihrer Funktion als Editor des EXCLI Journals.

Für die Niederschrift meiner Dissertation würde ich gerne Abbildung 2 unverändert aus folgendem Artikel verwenden:

- **Arand M, Herrero Plana ME, Hengstler JG, Lohmann M, Cronin A, Oesch F.**  
[Detoxification strategy of epoxide hydrolase the basis for a threshold in chemical carcinogenesis.](#)  
EXCLI J 2003;2:22-30

Die Arbeit erscheint wahrscheinlich/hoffentlich im ersten Quartal 2014, wird gedruckt und unbeschränkt online verfügbar sein und ist natürlich zu 100 % *non-profit* (Arbeitstitel "Hepatischer Metabolismus in der Nahrung vorkommender kanzerogener Phenylpropanoide").

Da ich keine Angaben zur Handhabung des Copyrights gefunden habe, frage ich Sie hiermit, ob ich die genannte Abbildung für den genannten Zweck verwenden darf und falls ja, ob es eine bestimmte Nomenklatur für die *Credits* gibt?

Herzliche Grüße aus Kaiserslautern,

Alexander Cartus

\*\*\*\*\*

Alexander T. Cartus  
chemist (Dipl. Chem.)

landline: +49 (0)631 205 4557  
mobile: + 49 (0)176 223 66 784  
fax: +49 (0)631 205 4398  
e-mail: cartus@rhrk.uni-kl.de  
Building 52, office 309, lab 311

Group of Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk  
Food Chemistry and Toxicology  
University of Kaiserslautern  
Erwin-Schrödinger-Str. 52  
67663 Kaiserslautern  
Germany

\*\*\*\*\*

## Abbildung 10

„Oben: Leberlobuli (Wildchwein (*Sus scrofa*); Schnitt; HE-Färbung; 10-fache Vergrößerung).  
Unten: Schematische Darstellung des Segmentes eines Leberläppchens. Nähere Erläuterungen im Fließtext.

Mit freundlicher Genehmigung von: Oben/top: © 2007 Sarah Werning. Used with permission.  
Unten/bottom: Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, Adams and Eksteen, 2006, 6, 246, © 2006.”

---

### Re: Permission for use the Photo 0000 0000 0807 0777

**Von:** "Sarah Werning" <swerning@berkeley.edu>  
**An:** "Alexander Cartus" <djschemika@gmx.de>  
**Datum:** 25.11.2013 01:32:07

---

Hi Alexander,

You can just say, "Copyright © 2007 Sarah Werning. Used with permission." It is ok to use it online and in the print version of your dissertation.

Congrats on the near-completion of your dissertation!

If you need to contact me in the future, please use the email address [sarah.werning@stonybrook.edu](mailto:sarah.werning@stonybrook.edu)

Best regards,  
Sarah Werning

On Sun, Nov 24, 2013 at 6:53 PM, Alexander Cartus <djschemika@gmx.de> wrote:  
Dear Dr. Werning,

I'm writing you to ask for your permission to use the photo (ID: 0000 0000 0807 0777 (2007-08-14); pig liver hepatic lobules) in full size (768 x 511 pixels) provided from the CalPhotos Database for my doctoral thesis (University of Kaiserslautern, Department of Chemistry, Division of food chemistry and toxicology).

The thesis will be published appr. until March 2014 (print and online) for non-profit use in german language (translated title: "Hepatic Metabolism of Methyleugenol, Methylisoeugenol, alpha-, beta- and gamma-Asarone").

If i can do so, please tell me, if there is a special nomenclature for the credit or if the following wording is ok:  
"Photo reprinted with permission from [CalPhotos](#) Database, University of California, Berkeley. Copyright © 2007 Sarah Werning."

Thank you for your reply.

Kind regards,  
Alexander Cartus

\*\*\*\*\*

Alexander T. Cartus  
chemist, toxicologist (Dipl. Chem.)

landline: +49 (0)631 205 4557  
mobile: + 49 (0)176 223 66 784  
fax: +49 (0)631 205 4398  
e-mail: [cartus@hrk.uni-kl.de](mailto:cartus@hrk.uni-kl.de)  
Building 52, office 309, lab 311

Group of Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk  
Food Chemistry and Toxicology  
University of Kaiserslautern  
Erwin-Schrödinger-Str. 52  
67663 Kaiserslautern  
Germany

\*\*\*\*\*

--  
Sarah Werning  
Department of Integrative Biology, Museum of Paleontology,  
and Museum of Vertebrate Zoology  
University of California, Berkeley  
1101 Valley Life Sciences Bldg  
Berkeley, CA 94720-4780  
<http://www.sarahwerning.com>



## NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 24, 2013

This is a License Agreement between Alexander T Cartus ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3275591453823
License date	Nov 24, 2013
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease
Licensed content author	David H. Adams and Bertus Eksteen
Licensed content date	Mar 1, 2006
Volume number	6
Issue number	3
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	no
Figures	Fig. 1: Three-dimensional structure of a liver lobule.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	Metabolismus der Phenylpropanoide Methyleugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron (translated: "Metabolism of Methyleugenol, Methylisoeugenol; alpha-, beta-, and gamma-Asarone")
Expected completion date	Mar 2014
Estimated size (number of pages)	300
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a

whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)  
For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

**Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.**

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

**Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

**Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.**

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

**If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501166658.**

**Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.**

**Make Payment To:  
Copyright Clearance Center  
Dept 001**

**P.O. Box 843006  
Boston, MA 02284-3006**

**For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

---

---

# Abbildung 11

„Klassisches Drei-Stufen-Modell der chemischen Kanzerogenese.

Abbildung modifiziert nach/figure adapted from: Radford et al., Int J Mol Sci, 2013, 14, 19416-33. Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from: MDPI - Open Access Publishing.”

MDPI | Open Access Information

<http://www.mdpi.com/about/openaccess>

MDPI Journals A-Z For Authors For Editors For Librarians About Open Access Policy Submit My Manuscript Login Register

 OPEN ACCESS

Title / Keyword	Journal	all	Volume	
Author	Section	--	Issue	
Article Type	Special Issue	--	Page	

Clear Search

## MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of all articles published in MDPI journals, and
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given.
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low Article Processing Charge (APC) for accepted articles.

### External Open Access Resources

MDPI is a RoMEO green publisher — RoMEO is a database of Publishers' copyright and self-archiving policies hosted by the University of Nottingham

Those who are new to the concept of open access might find the following websites or 'Open Access 101' video informative:

- [Wikipedia article on 'Open Access'](#)
- [Peter Suber's 'Open Access Overview'](#)
- [Information Platform Open Access \[in English, in German\]](#)
- [SHERPA's 'Authors and Open Access'](#)

### Meaning of Open Access

In accordance with major definitions of open access in scientific literature (namely the Budapest, Berlin, and Bethesda declarations), MDPI defines open access by the following conditions:

- peer-reviewed literature is freely available without subscription or price barriers,
- literature is immediately released in open access format (no embargo period), and
- published material can be re-used without obtaining permission as long as a correct citation to the original publication is given.

Until 2008, most articles published by MDPI contained the note: "© year by MDPI (<http://www.mdpi.org>). Reproduction is permitted for noncommercial purposes". During 2008, MDPI journals started to publish articles under the Creative Commons Attribution License. All articles published by MDPI before and during 2008 should now be considered as having been released under the post-2008 Creative Commons Attribution License.

This means that all articles published in MDPI journals, including data, graphics, and supplements, can be linked from external sources, scanned by search engines, re-used by text mining applications or websites, blogs, etc. free of charge under the sole condition of proper accreditation of the source and original publisher. MDPI believes that open access publishing fosters the exchange of research results amongst scientists from different disciplines, thus facilitating interdisciplinary research. Open access publishing also provides access to research results to researchers worldwide, including those from developing countries, and to an interested general public. Although MDPI publishes all of its journals under the open access model, we believe that open access is an enriching part of the scholarly communication process that can and should co-exist with other forms of communication and publication, such as society-based publishing and conferencing activities.

**Important Note:** some articles (especially *Reviews*) may contain figures, tables or text taken from other publications, for which MDPI does not hold the copyright or the right to re-license the published material. Please note that you should inquire with the original copyright holder (usually the original publisher or authors), whether or not this material can be re-used.

### Advantages of Open Access for Authors

**The High Availability and Visibility** of our open access articles is guaranteed through the free and unlimited accessibility of the publication over the Internet. Everyone can freely access and download the full text of all articles published with MDPI: readers of open access journals, *i.e.*, mostly other researchers, do not need to pay any subscription or pay-per-view charges to read articles published by MDPI. Open access publications are also more likely to be included in search engines and indexing databases.

**The Higher Citation Impact** of open access articles results from their high publicity and availability. Open access publications are demonstrably more frequently cited [1,2].

**Lower Publishing Costs:** Open access publishers cover their costs for editorial handling and editing of a paper by charging authors' institutes or research funding agencies. The cost of handling and producing an article is covered through the one-time payment of an **article processing charge (APC)** for each accepted article. The APCs of open access publishers are only a fraction of the average income per paper earned by traditional, subscription-based publishers. MDPI's **article processing charge (APC)** is the same, irrespective of article length, because we wish to encourage publication of long papers with complete results and full experimental or computational details [3].

**Faster Publication** in MDPI's open access journals is achieved by online-only availability. Accepted articles are typically published online more rapidly in MDPI journals than those of traditional, subscription-based and printed journals are [4].

### Links and Notes

1. Open access citation impact advantage: [http://en.wikipedia.org/wiki/Open\\_access#Authors\\_and\\_researchers](http://en.wikipedia.org/wiki/Open_access#Authors_and_researchers). For example, a standard research paper "Shutalev, A.D.; Kishko, E.A.; Sivova, N.V.; Kuznetsov, A.Y. *Molecules* **1998**, *3*, 100-106" has been cited 51 times, the highest number among all the papers published so far by the same author.
2. Lin, S.-K. *Editorial: Non-Open Access and Its Adverse Impact on Molecules*. *Molecules* **2007**, *12*, 1436-1437 (PDF format 16 K, HTML format).
3. Recently a research paper of 30 pages has been published: *Molecules* **2008**, *13*(5), 1081-1110.
4. Some well written papers have been peer reviewed and published in less than two weeks from manuscript submission, see e.g.: *Molecules* **2006**, *11*(4), 212-218.

[Terms & Conditions](#) [Privacy Policy](#) [Contact MDPI](#) [Payment Information](#) [Jobs at MDPI](#)

© 1996-2013 MDPI AG (Basel, Switzerland) unless otherwise stated

### SPARC Open Access 101 Video



## Abbildung 12

„An der Aktivierung von Fremdstoffen beteiligte Enzyme. A: Alle Enzyme (n = 713 Reaktionen), B: Anteil der verschiedenen CYP-Enzyme (n = 473 Reaktionen). C: Analyse der an der Aktivierung beteiligten Reaktionstypen (n = 799 Reaktionen). Abkürzungen: FMO: Flavin-abhängige Monooxygenase; NAT: N-Acetyltransferase; SULT: Sulfotransferase; AKR: Aldo-Keto-Reduktase; COX: Cyclooxygenase (Prostaglandin-H-Synthase); P450 = CYP: Cytochrom P450.

Mit freundlicher Genehmigung von/Reprinted with permission from: Rendic and Guengerich, Chem Res Toxicol, 2012, 25, 1316-83. © 2012 American Chemical Society“



RightsLink®

Home

Create Account

Help



ACS Publications  
High quality. High impact.

**Title:** Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism  
**Author:** Slobodan Rendic and F. Peter Guengerich  
**Publication:** Chemical Research in Toxicology  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Jul 1, 2012  
Copyright © 2012, American Chemical Society

User ID

Password

Enable Auto Login

LOGIN

[Forgot Password/User ID?](#)

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2013 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

## Abbildung 17

„A: Vermutliche Strukturen der in vivo gebildeten DNA-Addukte nach Gabe von 1'-Hydroxyestragol (i. p., Maus, Leber); B: Mögliche Reaktionen von 1'-Sulfoxyestragol mit DNA bzw. Nukleosiden (Phillips et al., 1981a; Miller und Miller, 1983). dR: Desoxyribose; dGuo: Desoxyguanosin; dAdo: Desoxyadenosin. Adapted from/Abbildungen aus: Cancer Research, 1981(a), 41, 176-186, Phillips DH, Miller JA, Miller EC, Adams B, „Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole“, with permission from/mit freundlicher Genehmigung von American Association for Cancer Research (AACR).

### Review Order

May 27, 2014

This is a License Agreement between Alexander T Cartus ("You") and American Association for Cancer Research ("American Association for Cancer Research") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Association for Cancer Research, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3332010887917
License date	Feb 18, 2014
Order Content Publisher	American Association for Cancer Research
Order Content Publication	Cancer Research
Order Content Title	Structures of the DNA Adducts Formed in Mouse Liver after Administration of the Proximate Hepatocarcinogen 1'-Hydroxyestragole
Order Content Author	David H. Phillips, James A. Miller, Elizabeth C. Miller et al.
Order Content Date	January 1, 1981
Volume number	41
Issue number	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
Will you be translating?	yes
Number of languages	1
Languages	German
Circulation	6
Title of your thesis / dissertation	Metabolismus der Phenylpropanoide Methyl Eugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron (translated: "Metabolism of Methyl Eugenol, Methylisoeugenol; alpha-, beta-, and gamma-Asarone")
Expected completion date	Mar 2014
Estimated size (number of pages)	300
<b>Total</b>	<b>0.00 EUR</b>
Terms and Conditions	

## Tabelle 10

„Im <sup>32</sup>P-Postlabelling-Assay detektierte DNA-Addukte in Lebern von mit Phenylpropenen behandelten adulten, weiblichen CD1-Mäusen“

Reprinted with permission by/Mit freundlicher Genehmigung von: Copyright © 1984 Oxford University Press from /aus: Randerath K, Haglund RE, Phillips DH, Reddy MV, „<sup>32</sup>P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice“, Carcinogenesis, 1984, 5, 12, 1613-22.

Rightslink® by Copyright Clearance Center

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>



# RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)

**Title:** 32P-Post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice:

Logged in as:  
Alexander Cartus  
Account #:  
3000722861

[LOGOUT](#)

**Author:** David H. Phillips, M. Vijayaraj Reddy, Kurt Randerath

**Publication:** Carcinogenesis

**Publisher:** Oxford University Press

**Date:** 12/01/1984

Copyright © 1984, Oxford University Press

### Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Alexander T Cartus ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3316230676843
License date	Jan 25, 2014
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Carcinogenesis
Licensed content title	32P-Post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice:
Licensed content author	David H. Phillips, M. Vijayaraj Reddy, Kurt Randerath
Licensed content date	12/01/1984
Volume number	5
Issue number	12
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic/Educational institute
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Author of this OUP article	No
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	Metabolismus der Phenylpropanoide Methyleugenol, (E)-Methylisoeugenol sowie alpha-, beta- und gamma-Asaron (translated: "Metabolism of Methyleugenol, Methylisoeugenol; alpha-, beta-, and gamma-Asarone")
Expected completion date	Mar 2014
Estimated size(pages)	300
Publisher VAT ID	GB 125 5067 30
Total	0.00 EUR

[ORDER MORE...](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2014 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)





## Proprietary Rights Notice for *Drug Metabolism and Disposition*

Copyright © 1998-2010, *Drug Metabolism and Disposition* by American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

1. The person using *Drug Metabolism and Disposition Online* may view, reproduce or store copies of articles comprising the journal provided that the articles are used only for their personal, non-commercial use. Uses beyond that allowed by THE "FAIR USE" LIMITATIONS (sections 107 and 108) of the U.S. Copyright law require permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.
2. For permissions to copy beyond that permitted by the U.S. Copyright Law, contact the [Copyright Clearance Center](#). The fee code for users of the Transactional Reporting Service appears in each abstract and full text article. Classroom photocopying is permitted at no fee, provided that students are not charged more than the cost of duplication. This consent does not extend to other kinds of copying.
3. Reproduction of any portion of an article for subsequent republication requires permission of the copyright owner. Please use our [Online Permissions Request Form](#). Requests must include a statement of intended use as well as explicit specifications of the materials to be reproduced.
4. Any uses and or copies of this journal in whole or in part must include the customary bibliographic citation, including author attribution, date, article title, *Drug Metabolism and Disposition Online*, and the URL <http://www.dmd.aspetjournals.org/> and MUST include a copy of the copyright notice.
5. Personal accounts and/or passwords may not be shared.

---

## Disclaimer of Warranties

The statements and opinions contained in the articles of *Drug Metabolism and Disposition* are solely those of the individual authors and contributors and not of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. The appearance of advertisements in the journal is not a warranty, endorsement, or approval of the products or their safety. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics disclaims responsibility for any injury to persons or property resulting from any ideas or products referred to in the articles or advertisements.

This publication is an online version of the printed version of *Drug Metabolism and Disposition*. It contains all of the information and material contained in the printed version plus additional material that may not appear in print such as videos and large data sets. The information it contains may be more current than the printed version. Where noted, the online version has been corrected in departure from the printed version. The online version of *Drug Metabolism and Disposition* officially published by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics is the definitive version and, to the extent any difference exists, will prevail over the print version.

In no event shall the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics or Stanford University be liable for any special, incidental, indirect or consequential damages of any kind, or any damages whatsoever resulting from loss of use, data or profits, whether or not advised of the possibility of damage, and on any theory of liability, arising out of or in connection with the use or performance of this information.

This publication is provided "as is" without warranty of any kind, either expressed or implied, including, but not limited to, the implied warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, or non-infringement.

*Drug Metabolism and Disposition Online* is under development and changes may be made in these publications and programs at any time.

---

[Oxford Journals](#) [Access & Purchase](#) [Publication Rights Policies](#)

## PUBLICATION RIGHTS POLICIES

### What is our policy?

For the majority of journals<sup>1</sup> published by Oxford University Press, we have a policy of acquiring a sole and exclusive licence for all published content, rather than asking authors to transfer ownership of their copyright, which has been common practice in the past. We believe this policy more carefully balances the interests of our authors with our need to maintain the viability and reputation of the journals through which our authors are accorded status, recognition and widespread distribution. In developing this policy we have been guided by the following principles:

- As a university press and not-for-profit academic publisher, we rely heavily on the good relationships we have with our authors. Having a licensing policy which enables an author to be identified as the owner of the copyright in an article is one of the key ways of demonstrating how highly we value these relationships.
- An exclusive licence enables the centralised and efficient management of permissions and licencing, ensuring the widest dissemination of the content through intermediaries;
- Exclusive rights also enable OUP to take measures on behalf of our authors against infringement, inappropriate use of an article, libel or plagiarism;
- At the same time, by maintaining exclusive rights, in all media for all published content, we can monitor and uphold the integrity of an article once refereed and accepted for publication to be maintained;

### Where to get a copy of the Licence to Publish

OUP cannot publish your article until a completed licence form has been received. You should receive a form as soon as your article is accepted for publication.

### Footnotes to this section

1. A small number of OUP Journals still have a policy of requesting a full Assignment of Copyright. If unclear about the policy of the Journal concerned, please contact the Editorial office to clarify.

### Government employees

- If you are or were a UK Crown servant and the article has been written in that capacity, we have an arrangement with HMSO to enable us to publish it while acknowledging that it is Crown Copyright. Please inform the Editorial office or Oxford University Press at the time of acceptance or as soon as possible that the article is Crown Copyright, so that we can ensure the appropriate acknowledgement and copyright line are used, as required by our arrangement with HMSO.
- If you are a US Government employee and the article has been written in that capacity, we acknowledge that the Licence to Publish applies only to the extent allowable by US law.

### Re-use of third party content as part of your Oxford Journals article

- As part of your article, you may wish to reuse material sourced from third parties such as other publishers, authors, museums, art galleries etc. To assist with this process, we have a Permission Request form and accompanying Guidelines that specifies the rights required in order for third party material to be published as part of your Article. For a copy of this form, please [email](#).
- Responsibility for clearing these third party permissions must be borne by the Author, and this process completed as soon as possible - preferably before acceptance of the manuscript, but if not possible, before the Article reaches the Production stage of the process.

### Rights retained by ALL Oxford Journal Authors

- The right, after publication by Oxford Journals, to use all or part of the Article and abstract, for their own personal use, including their own classroom teaching purposes;
- The right, after publication by Oxford Journals, to use all or part of the Article and abstract, in the preparation of derivative works, extension of the article into book-length or in other works, provided that a full acknowledgement is made to the original publication in the journal;
- The right to include the article in full or in part in a thesis or dissertation, provided that this not published commercially;

For the uses specified here, please note that there is no need for you to apply for written permission from Oxford University Press in advance. Please go ahead with the use ensuring that a full acknowledgement is made to the original source of the material including the journal name, volume, issue, page numbers, year of publication, title of article and to Oxford University Press and/or the learned society.

The only exception to this is for the re-use of material for commercial purposes, as defined in the information available via the above url. Permission for this kind of re-use is required and can be obtained by using Rightslink:

With Copyright Clearance Center's Rightslink® service it's faster and easier than ever before to secure permission from OUP titles to be republished in a coursepack, book, CD-ROM/DVD, brochure or pamphlet, journal or magazine, newsletter, newspaper, make a photocopy, or translate.

- Simply visit: [www.oxfordjournals.org](http://www.oxfordjournals.org) and locate your desired content.
- Click on (Order Permissions) within the table of contents and/ or at the bottom article's abstract to open the following page:
- Select the way you would like to reuse the content
- Create an account or login to your existing account
- Accept the terms and conditions and permission is granted

For questions about using the Rightslink service, please contact Customer Support via phone 877/622-5543 (toll free) or 978/777-9929, or email [Rightslink customer care](#).

### Preprint use of Oxford Journals content

For the majority of Oxford Journals, prior to acceptance for publication, authors retain the right to make a pre-print [A preprint is defined here as *un-refereed author version of the article*] version of the article available on your own personal website and/or that of your employer and/or in free public servers of preprints and/or articles in your subject area, provided that where possible.

- You acknowledge that the article has been accepted for publication in [Journal Title] ©: [year] [owner as specified on the article] Published by Oxford University Press [on behalf of xxxxxx]. All rights reserved.
- Once the article has been published, we do not require that preprint versions are removed from where they are available. However, we do ask that these are not updated or replaced with the finally published version. Once an article is published, a link could be provided to the final authoritative version on the Oxford Journals Web site. Where possible, the preprint notice should be amended to:
- This is an electronic version of an article published in [include the complete citation information for the final version of the Article as published in the print edition of the Journal.]

Once an article is accepted for publication, an author may not make a pre-print available as above or replace an existing pre-print with the final published version. **NB** there are some Oxford Journals such as the Journal of the National Cancer Institute, which do not permit any kind of preprint use. For clarification of the preprint policy for any journal please contact the [Rights and New Business Development Department](#).

[Log in here to manage your account](#)

### Keeping you Updated

[Changes to our list](#)  
New launches, new acquisitions, and titles changing frequency

### Frequently asked questions

[What is your policy on perpetual access?](#)  
[What is your policy on digital preservation?](#)  
[Why am I having registration problems?](#)  
[Who should I contact about online access problems?](#)

### Full list of FAQs

### Contact

[Technical & customer support](#)

[Collection sales enquires](#)



TECHNISCHE UNIVERSITÄT  
KAISERSLAUTERN

Fachbereich Chemie  
Technische Universität Kaiserslautern  
67653 Kaiserslautern  
Tel: +49 631 205-2754  
Fax: +49 631 205-2187  
Internet: [www.chemie.uni-kl.de](http://www.chemie.uni-kl.de)