

**Aus dem Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der Philipps-Universität  
Marburg**

**Leiter: Prof. Dr. med. T. Gudermann**

**„Zur Resorption von Naringin aus  
Grapefruitsaft bei Mensch und Tier“**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von**

**Andreas Krisp  
aus Wolfenbüttel  
Marburg 2000**



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps Universität am 13.12.00

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. W. Legrum

Koreferent: PD Dr. B. Simon

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1.1 ARZNEIMITTELINTERAKTIONEN MIT GRAPEFRUITSAFT</b>	<b>4</b>
<b>1.2 ELIMINATION VON FREMDSTOFFEN IM ORGANISMUS</b>	<b>5</b>
1.2.1 PHASE-I-REAKTIONEN	6
1.2.2 PHASE-II-REAKTIONEN	7
<b>1.3 FLAVONOIDE</b>	<b>8</b>
1.3.1 VORKOMMEN VON FLAVONOIDEN	8
1.3.2 NOMENKLATUR DER FLAVONOIDE	9
1.3.3 STRUKTUR DER FLAVONOIDE	9
1.3.4 SYNTHESE VON FLAVONOIDEN BEI PFLANZEN	10
1.3.5 FUNKTION DER FLAVONOIDE	11
1.3.6 EIGENSCHAFTEN VON FLAVONOIDEN	12
1.3.7 NARINGIN - EIN FLAVANONGLYKOSID	13
<b>1.4 RESORPTIONSPROZESSE IM GASTROINTESTINALTRAKT</b>	<b>15</b>
1.4.1 VERGLEICH VERSCHIEDENER RESORPTIONSORTE DES GASTROINTESTINALTRAKTES	15
1.4.2 ALLGEMEINES ZUR WIRKSTOFFRESORPTION	16
1.4.2 RESORPTIONSMECHANISMEN	18
<b>1.5 MODELLE ZUR UNTERSUCHUNG VON RESORPTIONSPROZESSEN</b>	<b>19</b>
1.5.1 VERTEILUNGSMODELLE MIT KÜNSTLICHEN MEMBRANEN	20
1.5.2 EXKRETIIONSMESSUNG EINES FREMDSTOFFES ZUR BEURTEILUNG SEINER VERFÜGBARKEIT	20
1.5.3 RESORPTIONSSTUDIEN AM ISOLIERTEN TIERDARM	20
1.5.4 RESORPTIONSSTUDIEN MIT DER „EVERTED SAC“-METHODE	22
1.5.5 RESORPTIONSSTUDIEN MIT DER KAMMER NACH LAUTERBACH	23
1.5.6 RESORPTIONSSTUDIEN AN ZELLKULTUREN	23
<b>1.6 AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
<b>2.1 VERSUCHE ZUR RENALEN ELIMINATION VON NARINGIN BEIM MENSCHEN</b>	<b>25</b>
2.1.1 VERSUCHSPERSON	25
2.1.2 ZUSATZ VON CUMARIN ZU DEN EINGENOMMENEN SUBSTANZEN	25
2.1.3 EINNAHME DER SUBSTANZEN	25
2.1.5 BEHANDLUNG DER URINPROBEN	27
2.1.6 AUFARBEITUNG DER PROBEN ZUR MESSUNG	27
2.1.7 QUANTITATIVE ANALYSE DER URINPROBEN	27
2.1.8 AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE	28
2.1.9 ERRECHNUNG DER NARINGINKONZENTRATION IN DEN PROBEN	28
<b>2.2 RESORPTIONSSTUDIEN AM ISOLIERTEN RATTENJEJUNUM</b>	<b>29</b>
2.2.1 HERSTELLUNG DER LÖSUNG NACH KREBS UND HENSELEIT	29
2.2.2 TIERE UND TIERHALTUNG	30
2.2.3 TÖTUNG DER TIERE UND PRÄPARATION DES JEJUNUMS	31
2.2.4 APPARATUR FÜR DIE RESORPTIONSVERSUCHE	32
2.2.5 METHODEN ZUR BEURTEILUNG DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DES DARMPRÄPARATES	34
2.2.6 VORBEREITUNG DER GRAPEFRUITSÄFTE FÜR DIE RESORPTIONSVERSUCHE AM DARM	36
2.2.6.3 BESTIMMUNG UND EINSTELLUNG DES PH-WERTES DER GRAPEFRUITSÄFTE	36
2.2.7 VERSUCHSABLAUF	36
<b>2.3 BESTIMMUNG DES NARINGINGEHALTES DER FRUCHTSÄFTE</b>	<b>38</b>
<b>2.4 BESTIMMUNG DER PUFFERKAPAZITÄT DES GRAPEFRUITSAFTES</b>	<b>38</b>
<b>2.5 BESTIMMUNG DES VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN OKTANOL/ WASSER FÜR NARINGIN UND GRAPEFRUITSAFT</b>	<b>39</b>
<b>2.6 HYDROLYSE VON NARINGIN MIT 0.1 N SALZSÄURE</b>	<b>39</b>
<b>2.7 STATISTISCHE METHODEN</b>	<b>40</b>
<b>2.7 MATERIALIEN</b>	<b>40</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>

<b><u>3.1 LINEARITÄT BEI DER MESSUNG VON NARINGIN UND NARINGENIN MIT DER HPLC</u></b>	<b>42</b>
<b><u>3.2 DIE RESORPTION DES NARINGINS BEEINFLUSSENDE FAKTOREN</u></b>	<b>43</b>
<u>3.2.1 BESTIMMUNG DER PUFFERKAPAZITÄT DES GRAPEFRUITSAFTES</u>	43
<u>3.2.2 BESTIMMUNG DES VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN OKTANOL/WASSER VON NARINGIN AUS GRAPEFRUITSAFT UND WASSER</u>	44
<u>3.2.3 HYDROLYSE VON NARINGIN DURCH SALZSÄURE</u>	46
<u>3.2.4 ZUSAMMENFASSUNG</u>	46
<b><u>3.3 BESTIMMUNG DES NARINGINGEHALTES DER VERWENDETEN SÄFTE</u></b>	<b>47</b>
<b><u>3.4 VERSUCHE ZUR EXKRETION VON NARINGIN BEIM MENSCHEN (N=1)</u></b>	<b>47</b>
<u>3.4.1 KUMULATION VON NARINGIN NACH 24 STUNDEN</u>	47
<u>3.4.2 PROZENTUALE WIEDERFINDUNG VON NARINGIN, GEMESSEN ALS NARINGENIN IM URIN</u>	49
<u>3.4.3 ELIMINATION VON NARINGENIN MIT GRAPEFRUITSAFT ALS ALLEINIGER FLAVANONQUELLE IN VIVO (N=1)</u>	51
<u>3.4.4 ELIMINATION VON NARINGENIN BEI GABE VON NARINGIN ALS ALLEINIGER FLAVANONQUELLE IN VIVO (N=1)</u>	52
<u>3.4.5 AUSSCHIEDUNG VON NARINGENIN NACH EINNAHME VON 1L GRAPEFRUITSAFT MIT VERSCHIEDENEN NARINGINZUSÄTZEN IN VIVO (N=1)</u>	53
<u>3.4.6 ELIMINATION VON NARINGENIN MIT ORANGENSAFT ALS VEHIKEL IN VIVO (N=1)</u>	54
<u>3.4.7 ZUSAMMENFASSUNG</u>	54
<u>3.4.8 ELIMINATION VON NARINGENIN NACH 1L GRAPEFRUITSAFT ALS ALLEINIGER FLAVANONQUELLE IN VIVO (N=3)</u>	55
<u>3.4.9 ELIMINATION VON NARINGENIN NACH GABE VON 340 MG NARINGIN ALS ALLEINIGER FLAVANONQUELLE IN VIVO (N=3)</u>	55
<u>3.4.10 ELIMINATION VON NARINGENIN NACH GABE VON 1L ORANGENSAFT PLUS 340 MG NARINGIN IN VIVO (N=3)</u>	57
<u>3.4.11 ZUSAMMENFASSUNG</u>	57
<b><u>3.5 RESORPTION VON GRAPEFRUITSAFT AUS DEM JEJUNUM DER RATTE AM BEISPIEL VON NARINGIN</u></b>	<b>58</b>
<u>3.5.1 BEURTEILUNG DES JEJUNALPRÄPARATES WÄHREND DER MESSUNG</u>	58
<u>3.5.2 RESORPTION VON NARINGIN</u>	60
<u>3.5.3 ZUSAMMENFASSUNG</u>	62
<b><u>4. DISKUSSION</u></b>	<b>63</b>
<b><u>4.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR DEN STOFFEIGENSCHAFTEN DES GRAPEFRUITSAFTES</u></b>	<b>63</b>
<u>4.1.1 PUFFERWIRKUNG DES SAFTES</u>	63
<u>4.1.2 VERTEILUNGSKOEFFIZIENT DES NARINGINS</u>	64
<u>4.1.3 HYDROLYSE DES NARINGINS</u>	65
<b><u>4.2 ELIMINATION DES NARINGIN BEIM MENSCHEN</u></b>	<b>66</b>
<b><u>4.3 RESORPTION VON GRAPEFRUITSAFT IM ISOLIERTEN RATTENJEJUNUM</u></b>	<b>67</b>
<u>4.3.1 NACHWEIS VON NARINGIN UND NARINGENIN IM AKZEPTORMEDIUM</u>	67
<u>4.3.2 FAKTOREN, WELCHE DIE RESORPTION DES NARINGIN BEEINFLUSSEN</u>	68
<b><u>4.4 ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN</u></b>	<b>69</b>
<b><u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>75</b>
<b><u>7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u></b>	<b>83</b>
<b><u>8. DANKSAGUNG</u></b>	<b>84</b>
<b><u>9. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</u></b>	<b>85</b>



## **1. Einleitung**

### **1.1 Arzneimittelinteraktionen mit Grapefruitsaft**

Arzneimittelinteraktionen mit Grapefruitsaft wurden zum ersten Mal 1991 von Bailey beschrieben (Bailey et al., 1991):

Damals war es Ziel seiner Untersuchungen Interaktionen zwischen Alkohol und Felodipin (Plendil™), einem Calciumkanalblocker zu untersuchen. Da Bailey als eine ausgeprägte Abneigung gegen den Alkoholgeschmack hatte, wollte er diesen bei den Versuchen überdecken und probierte so einige Mischungen von medizinischem Alkohol und verschiedenen Fruchtsäften aus. Am besten kam seinen Erfordernissen eine Mischung aus Alkohol und einem Grapefruitsaftkonzentrat entgegen. Obwohl in dieser Versuchsserie keinerlei Interaktion mit Alkohol festgestellt wurde, zeigte sich damals jedoch eine deutliche Wechselwirkung des Felodipin mit Grapefruitsaft (The People's Pharmacy 1997).

Spätere Untersuchungen ergaben, daß vielfältige Arten von Arzneimittelinteraktionen des Grapefruitsafts festgestellt werden konnten:

Die Plasmaspiegel von Cyclosporin, einem Immunsuppressivum, waren nach gleichzeitiger Einnahme von Grapefruitsaft erhöht. Durch Ausnutzen dieser Interaktion, wurde eine mögliche Kosteneinsparung von ca. 50% der Arzneimittelkosten, durch niedrigere Dosierungen des Pharmakons bedingt, errechnet (Yee et al., 1995).

Schimmelpilze der Gattung Aspergillus produzieren Aflatoxin B1, welches bei chronischem Kontakt zu Leberzellkarzinomen führt, bedingt durch eine Aktivierung der Substanz im Organismus. Diese ist durch Flavonoide, die im Grapefruitsaft enthalten sind, unter ihnen Naringenin, zu hemmen (Guengerich et al., 1990).

Seit 1982 sind nach Angaben des britischen Committee on Safety of Medicines 14 Patienten nach der Einnahme von Terfenadin-haltigen Antihistaminika gestorben. Dies wurde unter anderem auf die Wechselwirkung mit Grapefruitsaft zurückgeführt. Als Konsequenz wurden Terfenadin-haltige Medikamente in England wieder als verschreibungspflichtig ausgewiesen (Thomas, 1997).

Zu den weiteren Medikamenten, die Wechselwirkungen mit Grapefruitsaft zeigen, gehören Benzodizepine wie Midazolam (Kupferschmidt et al., 1995) und Triazolam (Hukkinen et al., 1995), verschiedene Calciumkanalblocker vom Dihydropyridintyp wie Felodipin (Bailey et al., 1990), Nitrendipin (Soons et al., 1991), aber auch Cumarin (Runkel et al., 1996) und Coffein (Fuhr et al., 1993).

Ducharme et al. (1995) und Kupferschmidt et al. (1995) zeigten, daß diese Hemmung nur nach oraler Einnahme des Medikaments, jedoch nicht nach intravenöser Gabe in Verbindung mit dem Grapefruitsaft zu beobachten war. Dies deutet auf den Magen-Darm-Trakt als wichtigen Ort der Interaktionen hin (Kolars et al., 1992).

Die Interaktionen werden durch Hemmungen von Monoxygenasen vom P450-Typ erklärt (Guengerich et al., 1990). Ein Isoenzym des P450, das für die Interaktionen verantwortlich ist, CYP3A4, wurde von Kolars et al. (1992) auch in den Enterozyten des Darms nachgewiesen. Über dieses und die Isoenzyme CYP2D6 und CYP2C9/19 werden nach Shah et al. (1997) 80- 90% aller Pharmaka metabolisiert.

Als mögliche Bestandteile des Saftes, die für diese Interaktionen verantwortlich sind, werden Flavonoide (Fuhr et al., 1993), und Cumarine (Edwards et al., 1996) vorgeschlagen.

## **1.2 Elimination von Fremdstoffen im Organismus**

Elimination von Fremdstoffen aus einem Organismus (auch als Biotransformation bezeichnet) verfolgt das Ziel, Substanzen von einem lipophilen Zustand in eine wasserlösliche, und damit nierengängige Form zu überführen.

Die Biotransformation wird in zwei Phasen unterteilt, die als Phase-I- und Phase-II-Reaktion bezeichnet werden.

### *1.2.1 Phase-I-Reaktionen*

Zu diesen Reaktionen, die der Bildung neuer funktioneller Gruppen (z.B. OH) oder der Transformation vorhandener (z.B. O- oder N-Dealkylierung) dienen, zählen Oxigenierungs-, Epoxidierungs-, Dealkylierungs-, Reduktions- und Hydrolysierungsreaktionen. Dadurch wird die Zahl freier Elektronenpaare erhöht und die Hydrophilie der auszuscheidenden Substanz verbessert (Forth et al., 1992).

Von dem Aglykon des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Flavonoids Naringin, dem Naringenin, ist eine Hemmwirkung auf CYP3A4 einem Isoenzym der Monoxygenase bekannt (Guengerich et al., 1990).

#### *1.2.1.1 P450-Monoxygenasen*

Diese Enzyme besitzen die Eigenschaft nach Substratbindung durch unterschiedliche Affinitäten der Konformere des Enzymkomplexes zu Kohlenmonoxid Differenzspektren zu bilden. Nach Einleitung von Kohlenmonoxid in eine enzymhaltige Lösung beobachteten Klingenberg et al. (1958) ein solches Differenzspektrum mit einem Maximum bei 450 nm. Da die damals bekannten Cytochrom-CO-Komplexe andere Spektren besaßen, wurde postuliert, daß es sich um das gesuchte Enzym der Fremdstoffoxidation handelt. Es wurde „P-450“ (Pigment 450) genannt und durch nachfolgende Untersuchungen als der Hauptbestandteil der mikrosomalen Monoxygenasen identifiziert. Omura et al. beschrieben es 1964 als Gruppe eisenhaltiger Hämoproteine mit einem Molekulargewicht von 45-60 kDa.

Schon Axelrod et al. postulierten 1955 aufgrund der geringen Substratspezifität des mikrosomalen Monoxygenasesystems mehrere Enzymformen. Dies konnte später durch molekularbiologische Untersuchungen bestätigt werden.

1993 wurden bereits 221 Cytochrom P450-Isoenzyme aufgelistet (Nelson et al., 1993), deren Sequenz und enzymatische Aktivität bestimmt ist. Sie werden 36 Genfamilien zugeordnet. Bei den Säugern sind 12 Genfamilien und 22 Subfamilien bekannt. Der Genlocus des Isoenzym CYP3A4 liegt auf Chromosom 7 (7q21- p22.1) (Brooks et al.,

1988). Von den P450 Isoenzymen sind bis heute 17 bestimmten Chromosomen zugeordnet (D'Arcy et al., 1996).

Mitglieder einer Familie sind durch eine mindestens 40%ige Sequenzidentität und Mitglieder einer Subfamilie durch eine 59%ige Sequenzidentität gekennzeichnet (Pfeiffer et al., 1995).

### *1.2.1.2 Nomenklatur der P450-Monooxygenasen*

Durch die möglich gewordene Gliederung in Familien und Subfamilien ist eine vereinheitlichte Nomenklatur festgelegt worden (Nelson et al., 1993). Danach bezeichnet CYP ein Cytochrom-P450-abhängiges Enzym, die folgende arabische Zahl die Familie, der folgende Großbuchstabe die Subfamilie und eine zweite arabische Ziffer das individuelle Enzym (z.B. CYP3A4 usw.).

### *1.2.1.3 Eigenschaften der P450-Monooxygenasen*

Die maßgeblich am Metabolismus zahlreicher endogener Stoffwechselprodukte (z.B. Steroide, Fettsäuren, biogene Amine, Prostaglandine, Leukotriene) beteiligten Isoenzyme sind relativ substratspezifisch. Dagegen zeigen die durch Fremdstoffe induzierbaren Formen insgesamt eine geringere Substratspezifität, jedoch bestehen zwischen einzelnen Isoenzymen teilweise beachtliche Unterschiede in dem Umsatzraten, in der Regio- und Stereoselektivität (Pfeifer et al., 1995).

### *1.2.2 Phase-II-Reaktionen*

Durch Übertragung körpereigener Stoffe auf die Substrate mit geeigneten funktionellen Gruppen entstehen hydrophile Konjugate.

Sie werden durch Übertragung körpereigener Verbindungen auf ein Substrat bei Vorhandensein von Hydroxy-, Amino-, Thiol-, oder Carboxygruppen bzw. bei Anwesenheit von C=C Doppelbindungen oder Epoxidstrukturen (Verknüpfung mit Glutathion) gebildet; bei vielen Pharmaka muß daher erst eine Phase-I-Reaktion stattfinden, damit diese Voraussetzungen gegeben sind.

Konjugierung mit	Beispiel
Essigsäure oder Hippursäure	Hydralazin
langkettige Fettsäuren	Tetrahydrocannabinol
Schwefelsäure	Steroide
Kohlenhydrate (z.B. Glucuronsäure, Riboside)	Salicylsäure, Phenytoin
Glycin, Glutamin, Taurin	Mescaline
Glutathion	Etacrynsäure, Phenytoin
Methylierung	Methyldopa, Norepinephrin

**Tabelle 1:** Verschiedene Typen von Konjugationsreaktionen (Phase-II-Reaktionen mit Beispielen)

## 1.3 Flavonoide

### 1.3.1 Vorkommen von Flavonoiden

Flavanderivate werden bei Mikroorganismen und Algen nur sporadisch gefunden. Pilze enthalten sie wahrscheinlich nicht. Im Pflanzenreich treten sie bei Moorpflanzen (Bryophyta) und Farnpflanzen (Pteridophyta) häufig auf, bei den Samenpflanzen (Spermatophyta) sind sie vermutlich ubiquitär verbreitet. Der tierische und menschliche Organismus kann sie nicht bilden.

Durch ihre weite Verbreitung bei den Spermatophyta kommt ihnen hier bei der chemotaxonomischen Einordnung eine herausragende Rolle zu.

Flavanderivate können in allen Teilen von Samenpflanzen vorhanden sein. In grünen Teilen scheinen sie immer vorzukommen. Die Glykoside, Sulfate und die freien hydrophilen Vertreter sind im Zellsaft der Vakuole gelöst. Lipophile Vertreter werden auch in ätherischen Ölen, z.B. bei Citrusfrüchten, in Knospenexkreten, z.B. bei der

Kastanie, und als mehrlartige Überzüge auf Laubblättern, z.B. bei Primeln, gefunden (Teuscher 1997).

### *1.3.2 Nomenklatur der Flavonoide*

Nach Teuscher (1997) sind Flavonoide die 4-Oxo-flavanderivate (Flavanone, Flavone, Flavonole). Allerdings können zu dieser Substanzgruppe auch Flavandervate oder alle Phenylchromanderivate gerechnet werden.

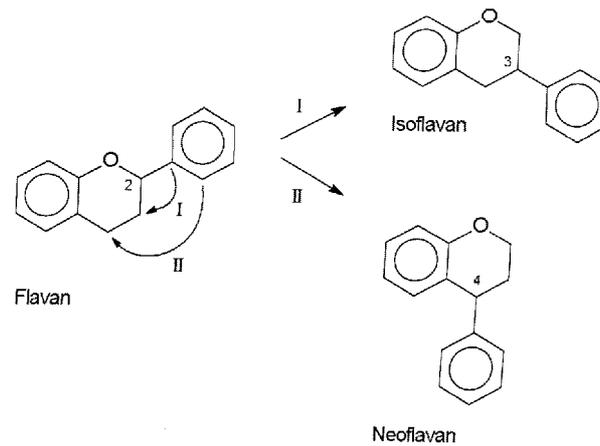
### *1.3.3 Struktur der Flavonoide*

Hypothetischer Grundkörper der wichtigsten biogenetisch eng verwandten Phenylchromanderivate (**Abbildung 1**) sind:

- Flavan (2-Phenyl-chroman)
- Isoflavan (3-Phenyl-chroman)
- Neoflavan (4-Phenyl-chroman)

Je nach Oxidationszustand der C-Atome 2, 3, und 4 des Chromanrings werden die Flavanderivate eingeteilt in:

- Flavanole (3-Hydroxyflavane, Catechine)
- Flavandiole (3,4-Dihydroxyflavane, Leukoanthocyanidine)
- Flavanone (4-Oxo-flavane)



**Abbildung 1:** Grundkörper von Phenylchromanderivaten und ihre biogenetische Verwandtschaft ( nach Teuscher 1997)

- Flavone (3-Oxo-flav-2-ene)
- Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene) und
- Flavyliumsalze (Anthocyanidine)

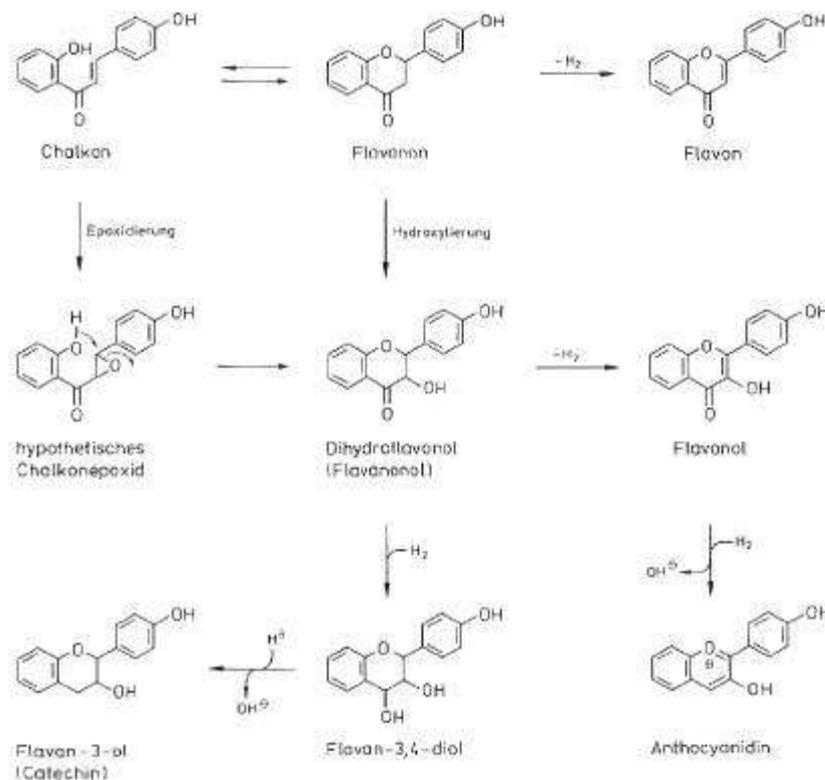
Viele Flavonoide kommen auch als Glykoside vor. Als Zuckerkomponenten dienen hierbei meistens Hexosen: D-Glucose, D-Galaktose und L-Rhamnose, die Pentosen L-Arabinose und D-Xylose sowie die Uronsäuren D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure. Auch C-Alkyl-Derivate (z.B. C-Methyl- oder C-Prenyl-Derivate), C-Glycosylverbindungen und dimere Flavonoide treten auf. Zur Zeit sind über 2000 Glykoside und über 500 Aglyka dieser Gruppe bekannt.

Das Naringin ist z.B. das 7-O-(2-O-rhamnosyl)glykosid seines Aglykons Naringenin. Dieser Zuckerrest wird auch als Neohesperidose bezeichnet (Teuscher 1997).

### 1.3.4 Synthese von Flavonoiden bei Pflanzen

Flavonoide werden durch stufenweise Kondensation einer aktivierten Hydroxyzimtsäure mit drei aktivierten Malonsäuren. Das entstehende Chalkon steht im Gleichgewicht mit den Flavanonen. Diese Kondensation kann mittels einer

Flavanonsynthese auch unmittelbar zum Flavanon führen, so daß das Chalkon keine obligatorische Zwischenstufe darstellt. Vom Flavanon aus sind einerseits die Flavone, andererseits, nach Hydroxylierung mittels einer Flavanonoxidase, die Flavanole zugänglich. Von den Flavanolen schließlich führen Wege zu den Flavan-3-olen (Catechinen) und den Anthocyanidinen (Hänzel 1996).



**Abbildung 2:** Übersicht über die Flavonoidsynthese (nach Hänzel 1996)

### 1.3.5 Funktion der Flavonoide

Obwohl die Bedeutung der Flavonoide unklar ist, werden doch einige mögliche Funktionen diskutiert:

Als Bestandteile von Thylakoidmembranen der Chloroplasten nehmen sie möglicherweise am Elektronentransport der Photosynthese teil. Auch könnte ihnen eine Aufgabe bei der UV-Protektion der Pflanze zukommen. Viele Pflanzen nutzen die gelben oder im UV-Bereich bei 330 bis 350 nm absorbierenden, für Insekten sichtbaren Vertreter, auch als Signalsubstanzen, um so die als Bestäuber in Betracht

kommenden Insekten auf die Nektarquelle aufmerksam zu machen. Eingriffe in den Stoffwechsel von pflanzlichen Wachstumshormonen schreibt man Flavanderivaten ebenfalls zu. Eine weitere Funktion im Ökosystem könnte der virostatistischen, antibakteriellen, fungistatischen und insektiziden Wirkung einiger ihrer Vertreter zukommen (Teuscher 1997).

### *1.3.6 Eigenschaften von Flavonoiden*

Viele Flavonoide üben auf isolierte Enzyme, Mikroorganismen, kultivierte normale oder virusinfizierte eukaryontische Zellen bestimmte Effekte aus:

Eine Enzymhemmung ist von der Aldolreduktase, der alkalischen Phosphatase, der ATPase, der cAMP- Phosphodiesterase, den Arylhydroxylasen, den Arylsulfatasen, der Catechol-O-methyltransferase, der Cyclooxygenase, den DNS-Topoisomerasen, der DOPA-Decarboxylase, den Hyaluronidasen, den Lipasen, der Lipooxygenase, der Proteinkinase C, der Phospholipase A<sub>2</sub> und der reversen Transkriptase bekannt.

Einige Flavonoide sind in der Lage die Histaminfreisetzung aus isolierten Mastzellen zu beeinträchtigen sowie die Reaktionen von Lymphozyten.

Auf Bakterien und Pilze wirken eine Vielzahl von Flavonoiden wachstumshemmend.

Diese in vitro erlangten Ergebnisse sind im lebenden Organismus jedoch nicht so stark ausgeprägt nachweisbar. Ursächlich sollen dafür der partielle Abbau durch die Darmflora, die geringe Resorptionsrate im Gastrointestinaltrakt sowie die Entgiftungsmechanismen verantwortlich sein, die sich im bereits „Milliarden Jahre dauernden, täglichen Kontakt mit diesen Stoffen als Nahrungsbestandteilen“ ausbilden konnten (Teuscher 1997).

Von den therapeutisch genutzten Effekten der Flavonoide ist ihr stabilisierender Effekt auf Blutgefäße hervorzuheben. Pathologisch erhöhte Fragilität von Kapillaren kann durch sie herabgesetzt werden. Einer Veneninsuffizienz kann vorgebeugt werden. Dies beruht vermutlich auf ihrer antiphlogistischen, radioprotektiven Wirkung sowie den unterstützenden Effekten bei der Chemotherapie von Infektionen.

Man subsummiert diese Eigenschaften als Vitamin-P-Effekt. Diese Bezeichnung beruht auf einer früheren Vermutung, Flavonoide und einige Cumarine hätten für den Organismus Vitamincharakter. Begründet wurde dies durch die in vitro beobachtete Hemmung der Eicosanoidsynthese, des vermehrten Hyaluronsäureabbaus, der Histaminausschüttung, der Leukozytenfunktion, dem Abfangen reaktiver Sauerstoffradikale sowie der Stimulation der Kollagenbiosynthese. Als Bezeichnung für die Flavonoide und deren Wirkungen hat er sich jedoch nicht durchgesetzt.

Ein zweiter therapeutisch genutzter Effekt ist durch die milde Relaxationswirkung auf die glatte Muskulatur bedingt. Diese Wirkung kommt durch eine Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase und die Komplexbildung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zustande. Beide Effekte führen zu einer Erniedrigung der intrazellulären Calciumkonzentration und damit zur Erschlaffung der glatten Muskulatur. Daraus folgt:

- Erweiterung der Koronarien und peripherer Blutgefäße, hieraus resultiert eine bessere Versorgung des Herzens mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie eine geringe Blutdrucksenkung und eine gesteigerte Diurese
- eine erhöhte Gallensaftausscheidung
- Spasmolyse im Verdauungstrakt

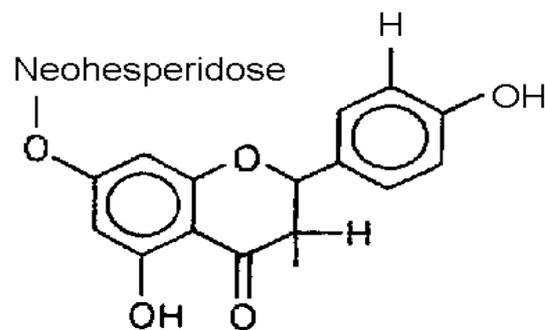
Der daraus resultierende Einsatz der Flavonoide als milde Herz-Kreislaufmittel, bei peripheren Durchblutungsstörungen, als Diuretika, Cholagoga und Carminativa ist jedoch nicht endgültig in seiner Wirkung bestätigt, da die therapeutisch zugeführte Substanzmenge in ihrer Potenz schwer von der mit der Nahrung täglich zugeführten Flavonoidmenge zu trennen ist (Teuscher 1997).

### 1.3.7 Naringin - ein Flavanonglykosid

Naringin ist das 7'-Neohesperidosid des Naringenins, welches die Grundstruktur der Flavanone besitzt. Es hat ein Molekulargewicht von 555,8 und kommt nach Wagner (1992) bei einigen Citrus-Arten in den Früchten mit einem Anteil von bis zu 75% vor (*Citrus grandis*).

Der Grapefruitsaft, der aus den Früchten von *Citrus paradisi Macfad.* gewonnen wird, besitzt einen Naringingehalt, der von verschiedenen Autoren mit 250-900 mg pro Liter Saft angegeben wird. Da das Naringin neben dem Hesperidin den bitteren Geschmack des Grapefruitsaftes bestimmt, setzen manche Hersteller dem Saft die sogenannte Naringinase zu, die aus Pilzen der Gattung *Penicillium* gewonnen wird. So läßt sich der bittere Geschmack des Saftes regulieren.

Als nichtterpenoide Bitterstoffe verfügt das Naringin über die Eigenschaft die Gastrin-, Dünndarm- und Pankreassaftproduktion zu steigern und darüber hinaus über den *N. vagus* die Magensaftsekretion zu erhöhen (Wagner et al., 1992).



**Abbildung 3:** Struktur des Naringin (Naringenin-7-O-Neohesperidosid)

Naringin wird beim Menschen nach oraler Aufnahme nur als Naringenin und dessen Glucuronid im Urin wiedergefunden. Dies weicht von Studien an der Ratte ab, bei der im Urin p-Cumarsäure und ein sulfatierter Ether der p-Benzoessäure ausgeschieden werden (Booth et al., 1958).

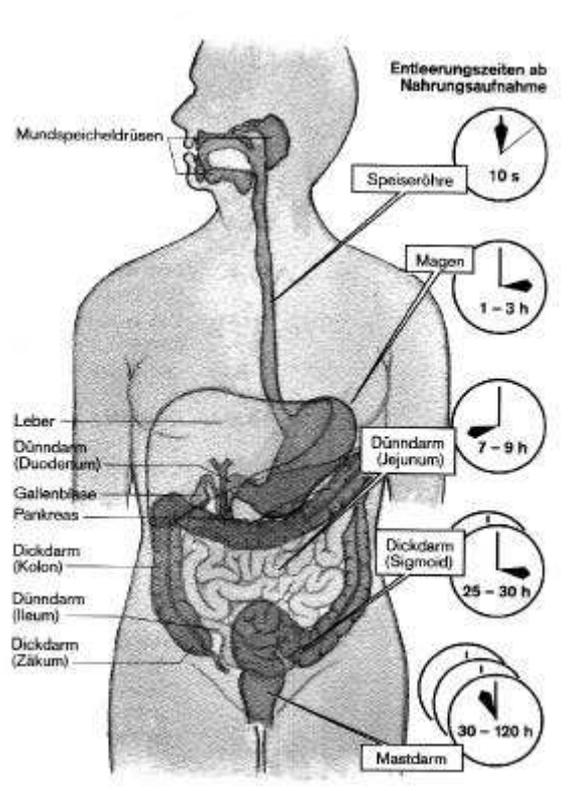
## 1.4 Resorptionsprozesse im Gastrointestinaltrakt

### 1.4.1 Vergleich verschiedener Resorptionsorte des Gastrointestinaltraktes

Im Magen-Darm-Trakt sind aus verschiedenen Gründen (Keimabwehr, Nahrungsverdauung und Resorptionserleichtung) sehr unterschiedliche physiologische Gegebenheiten zu finden. Stricker (1987) beschreibt die physiologischen Bedingungen des Magen-Darm-Traktes beim Menschen wie folgt:

- Magen: pH 1-3 (nüchtern), pH bis zu 6 (nach Nahrungsaufnahme), Fläche 0,15 m<sup>2</sup>
- Duodenum: pH 6-6,5; Länge ca. 25 cm
- Jejunum: pH 6,0-7,5 (Schleimschicht ca. pH 5,3); Länge ca. 150 cm
- Ileum: pH 7-7,8; Länge ca. 150 cm
- Colon: pH wie Ileum

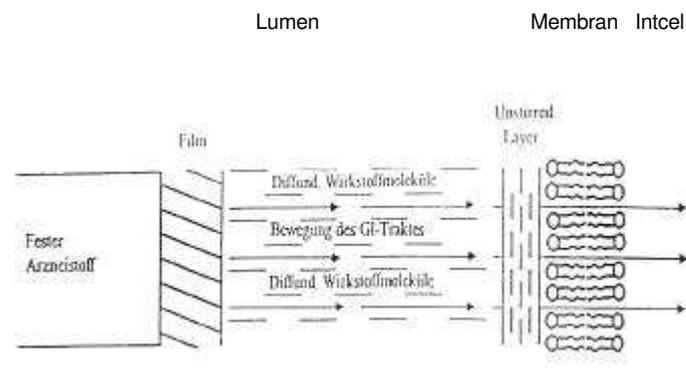
Die gesamte Resorptionsfläche des Dünndarms wird mit 120-300 m<sup>2</sup> angegeben.



**Abbildung 4:** Passagezeiten der Nahrung im Magen-Darm-Trakt des Menschen (nach Klinker & Silbernagl 1994)

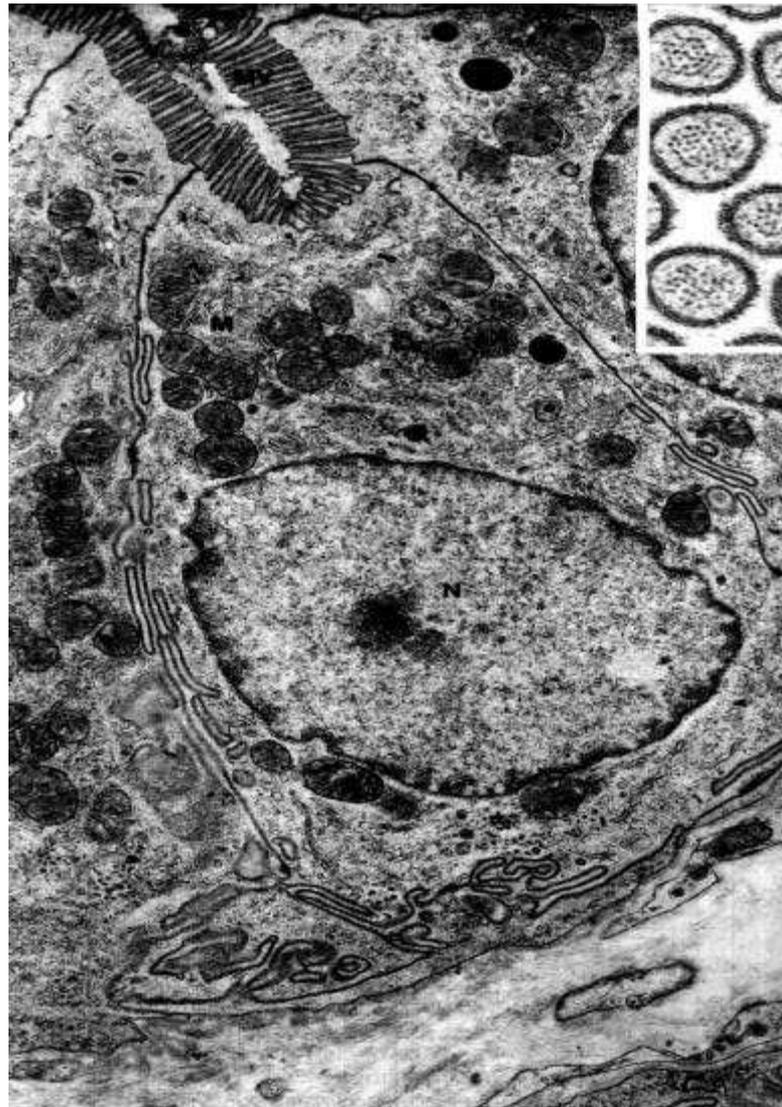
### 1.4.2 Allgemeines zur Wirkstoffresorption

Resorption bedeutet Aufnahme eines Stoffes an einer Körpergrenzfläche, wie z.B. der Haut, den Schleimhäuten des Magen-Darm-Traktes oder einem Gewebe (z.B. Muskelgewebe) in die Blutbahn oder das Lymphsystem mit anschließender Verteilung im ganzen Organismus (Moll 1994). **Abbildung 5** gibt die Barrieren wieder, die von einem Arzneistoff, der nicht durch aktive Transportprozesse aufgenommen wird, bei der Resorption im Darmtrakt überwunden werden müssen.



**Abbildung 5:** Dargestellt sind die Barrieren, die eine zu resorbierende Substanz im Darmtrakt zu überwinden hat. Nähere Erläuterung im Text. (nach Moll 1994) (Intcel) Bezeichnet den Intracellulärraum.

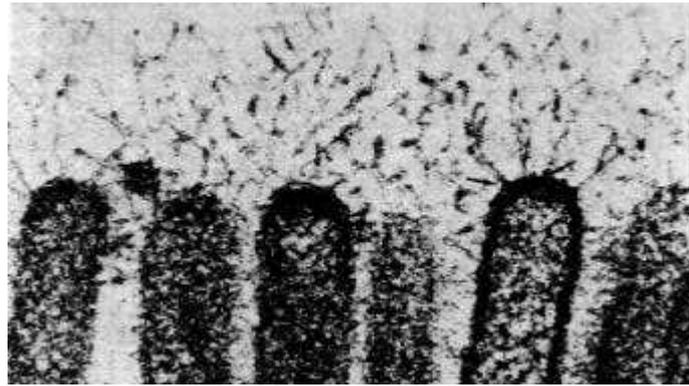
Mechanismen, welche die Lösung und die Verteilung des zu resorbierenden Stoffes im Gastrointestinaltrakt beeinflussen, sind die Diffusion der Wirkstoffmoleküle, die Motilität des Magen-Darm-Traktes sowie die Löslichkeit des Stoffes im wässrigen Medium.



**Abbildung 6:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Enterozyten der Ratte. Rechts oben sind die Mikrovilli mit ihren Aktinfilamenten im Querschnitt dargestellt (nach Junqueira 1991).

Vor dem Übertritt in die Lipidschicht des Enterozyten müssen die zu resorbierenden Substanzen durch den sogenannten „unstirred layer“, eine Wasserschicht diffundieren, dessen Dicke von der Motilität, dem Konzentrationsgradienten zum Interzellularspalt des Epithels und verschiedenen anderen Transportvorgängen an der Oberfläche des Darmlumens abhängig ist. Ihre Dicke beträgt im Rattenjejunum 140- 200  $\mu\text{m}$  (Wilson et al., 1974).

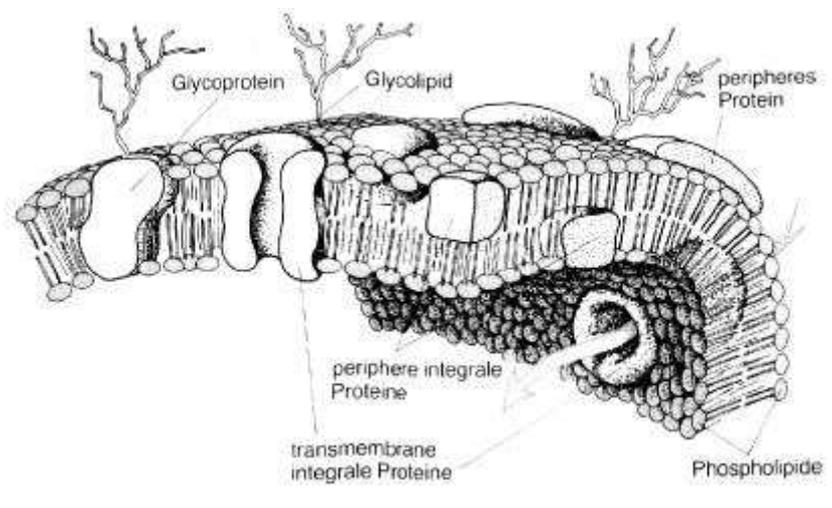
Die Glykokalix und der Mucus des Epithelverbandes stellen nach Lukie (1974) keine Diffusionsbarriere dar.



**Abbildung 7:** Glykokalix an der Oberfläche einer Darmepithelzelle. Zu erkennen sind die als *Antenulae microvillares* bezeichneten Polysaccharidketten von Glykoproteinen und Glycolipiden der Zellmembran. Vergr. 200.000fach (nach Junqueira 1991).

#### 1.4.2 Resorptionsmechanismen

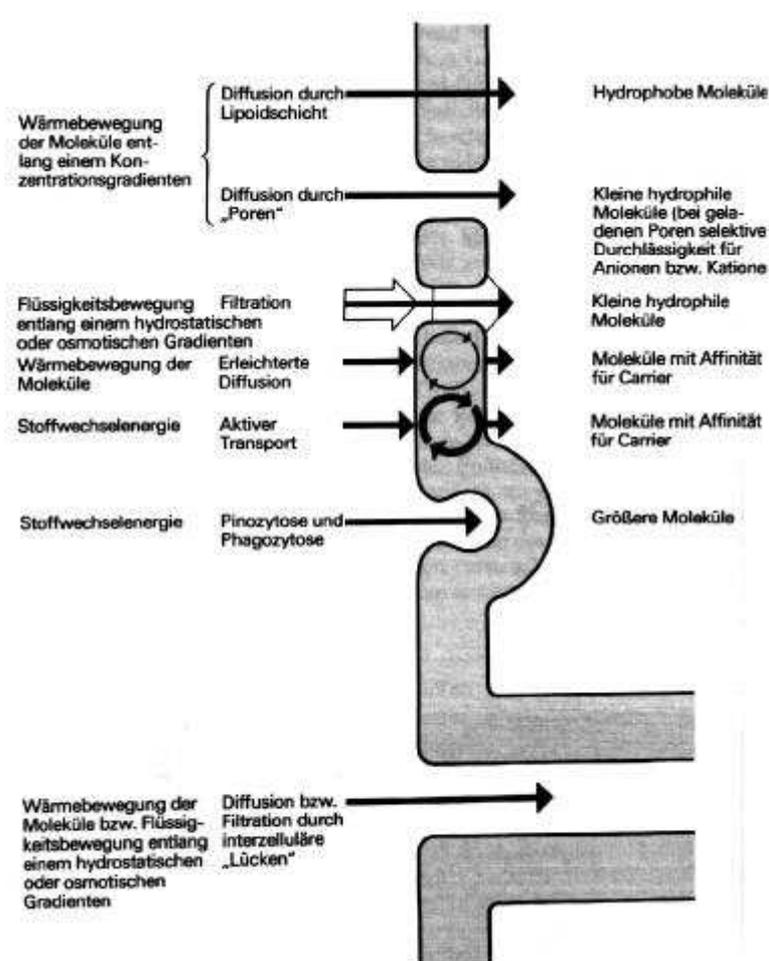
Moll (1994) beschreibt folgende Mechanismen der Resorption gelöster Substanzen: Die Diffusion durch die Epithelzellschicht, die Konvektion durch den Parazellulärspalt, die durch aktiven Carriertransport vermittelte Resorption sowie die Pinozytose.



**Abbildung 8:** Aufbau der Membran der Zelle (nach Hirsch-Kaufmann 1992)

Beim Durchtreten einer Lipidmembran ist außerdem der Ladungszustand des Moleküls von Bedeutung, da Moleküle im ungeladenen Zustand besser durch die Membran wechseln können (Forth et al., 1992). **Abbildung 8** und **Abbildung 9** stellen den

Aufbau einer biologischen Membran, sowie die dort stattfindenden Transportprozesse grafisch dar.



**Abbildung 9:** Verschiedene Durchtrittsmöglichkeiten für Pharmaka durch Membranen (nach Forth et al., 1992)

## 1.5 Modelle zur Untersuchung von Resorptionsprozessen

Durch die kritische Beschreibung verschiedener in-vitro Apparaturen zum Studien der Resorption im Darm soll verdeutlicht werden, weshalb in dieser Arbeit mit der Apparatur nach Norta et al. (1996) gearbeitet wurde.

### *1.5.1 Verteilungsmodelle mit künstlichen Membranen*

Diese Modelle bieten die Möglichkeit die Diffusion von Stoffen durch eine künstliche Membran zu studieren. Hierzu sind verschiedenen Apparaturen (z.B. Dibbern et al., 1966) beschrieben worden. Sie besitzen den Nachteil, daß nur passive, nicht jedoch aktive Prozesse untersucht werden können.

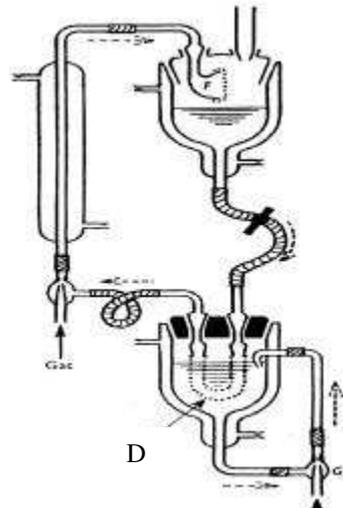
### *1.5.2 Exkretionsmessung eines Fremdstoffes zur Beurteilung seiner Verfügbarkeit*

Als Überblick über die Verfügbarkeit und den Metabolismus einer Substanz kann man seine Ausscheidung im Urin beobachten (Runkel et al., 1996). Dies bietet den Vorteil, mit relativ geringen Aufwand, Informationen über den Stoffwechsel einer nierengängigen Substanz zu erhalten. Dies ist jedoch nur bei Substanzen sinnvoll, bei denen nicht von einer Kumulation im Organismus oder einer extrarenalen Elimination auszugehen ist.

### *1.5.3 Resorptionsstudien am isolierten Tierdarm*

Diese Methoden zeichnen sich dadurch aus, daß einem Tier der Darm entnommen und dann mit physiologischen Lösungen perfundiert wird (Fisher et al., 1949). Die Zirkulation der Donor- und Akzeptorlösungen wird durch einströmendes Gas erreicht.

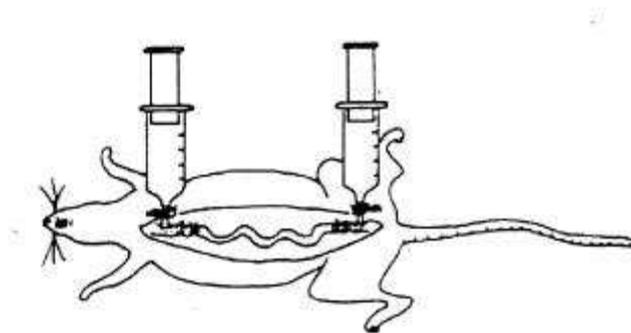
Der Vorteil der Methode liegt in der relativ einfachen Herstellung des Präparates, sowie der Untersuchungsmöglichkeit der Resorptionsvorgänge an einem kompletten Organ.



**Abbildung 10:** Resorptionsapparatur nach Fisher et al. (1949); (D) Darmstück; Die Perfusion wird durch das einströmende Gas gewährleistet

Das von Norta et al. (1996) vorgeschlagene Modell orientiert sich an dieser Methode. Norta's Apparatur besitzt jedoch den Vorteil mit kleineren Volumina arbeiten zu können, was für das Arbeiten mit einer Substanz, die schlecht resorbiert wird, von Vorteil ist.

Von Nachteil ist, wie bei allen isolierten Tierpräparaten, die relativ geringe Überlebensdauer des Präparats, sowie die fehlende Durchblutung des Organs. Dieser Umstand wird durch Perfusion des Darmes einer anästhesierten Ratte, der noch mit der korporalen Blutversorgung verbunden bleibt, verbessert (Delusio et al., 1969).



**Abbildung 11:** Perfusion des Darmes der anästhesierten Ratte nach Delusio (1969a); die Perfusion wird durch Bewegungen der Spritzenkolben gewährleistet (Pendelperfusion)

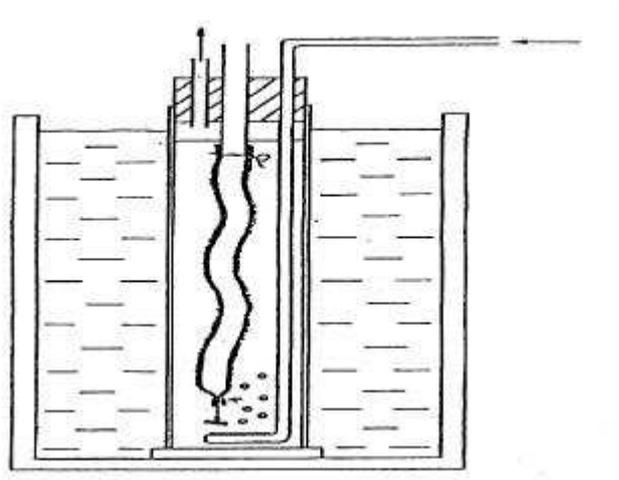
Durch Punktion der *V. porta* kann die resorbierte Stoffmenge aus dem Blut bestimmt werden. Über dauerhaft implantierte Katheter ist diese Technik auch am nicht

anästhesierten Tier demonstriert worden (Diamond 1995). Der Nachteil dieser Methode liegt im möglichen Einfluß der verwendeten Narkotika auf dem Metabolismus, sowie den operativen Maßnahmen, die für das Tier mit einer Störung seiner Integrität (durch Stress) verbunden sind.

#### 1.5.4 Resorptionsstudien mit der „everted sac“-Methode

Bei dieser von Wilson und Wiseman (1954) beschriebenen Methode wird die Mucosa des Darmes, nachdem der Darm vorsichtig von innen nach außen gewendet wurde, von den anderen Wandschichten getrennt (sog. „stripping“). Der Vorteil der Methode besteht darin, die Resorptionsprozesse an den auch in vivo relevanten Wandschichten zu untersuchen.

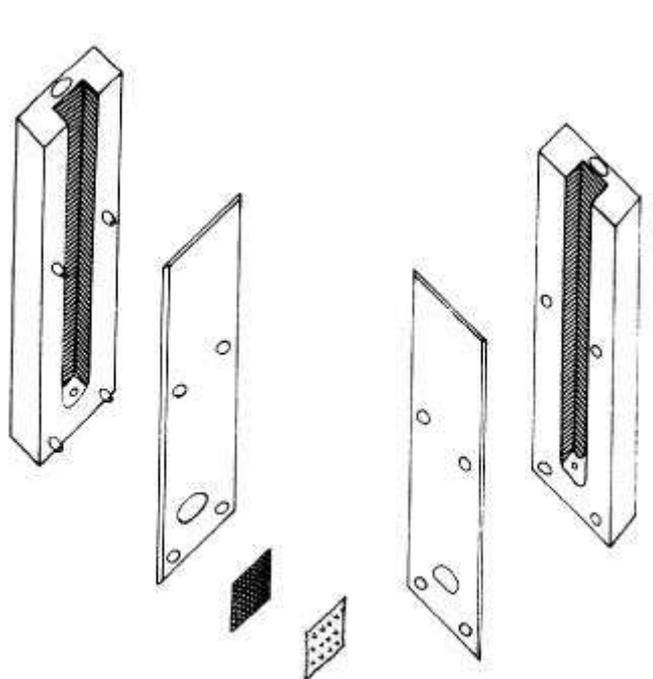
Nachteile dieser Methode liegen in der schwierigen Herstellung der Präparate und deren nur sehr kurzer Überlebensdauer. Schon nach 30 Minuten Versuchsdauer sind nach Levine (1970) 50-75% des Epithels des nicht gestrippten Darmes verschwunden. Für Versuche, die die Resorption von Substanzen, die schlecht resorbiert werden, untersuchen sollen, ist diese Methode daher ungeeignet.



**Abbildung 12:** Schema des Versuchsaufbaus nach der everted-sac- Methode (nach Wilson 1954)

### 1.5.5 Resorptionstudien mit der Kammer nach Lauterbach

Lauterbach (1975) beschreibt eine Methode, die mit sehr kleinem Probenvolumina (0,2 ml) und Präparatgrößen (5 mm Flächendurchmesser) die Untersuchung der Resorption am gestrippten Darm erlaubt. Diese Methode stellt somit eine Weiterentwicklung der everted-sac-Methode dar. Die geringe Resorptionsfläche, die benutzt wird, schränkt dieses Modell jedoch bei der Untersuchung schlecht resorbierbarer Substanzen ein.



**Abbildung 13:** Methode zur Resorptionsuntersuchung nach Lauterbach (1970); Das Präparat wird auf eine Gaze aufgelegt und zwischen den Folien in die Kammer eingesetzt

### 1.5.6 Resorptionsstudien an Zellkulturen

Zellkulturen zur Untersuchung von Resorptionsprozessen bieten den Vorteil die Studien an einer einzigen Zellschicht (Monolayer) durchführen zu können. Die Präparation des Organs entfällt somit.

Eingesetzte Zelllinien sind die Caco-2 Zelllinie (Neef et al., 1996), die sich von einem Coloncarzinom ableitet, und die T<sub>84</sub>-Zelllinie (Dharmasathaphorn et al., 1984), die eine Epithelzelllinie des Dünndarms darstellt.

Nachteile der Zellkultur liegen in der unsicheren Vergleichbarkeit Resorptionsprozesse an Tumorzellen mit den an normalen Darmepithelzellen.

## 1.6 Aufgabenstellung

Grapefruitsaft zeigt seine Wirkung im Sinne einer Blutspiegelerhöhung bestimmter Pharmaka nur, wenn die Substanzen gleichzeitig mit Saft per os eingenommen worden waren. Nach intravenöser Gabe bleibt dieser Effekt jedoch aus. Da derzeit überwiegend deskriptive Arbeiten zu den pharmakologischen Wirkungen des Grapefruitsaftes existieren, sollten diese Untersuchungen dazu dienen, die für die Interaktionen in Frage kommenden Einflussfaktoren besser zu verstehen. Durch Untersuchung der intestinalen Resorption und renalen Elimination des Naringins, einer Substanz, die verantwortlich für die Arzneimittelinteraktionen des Saftes gemacht wird, soll ein tiefgreifendes Verständnis für die Interaktionen erlangt werden.

Die renale Elimination von Naringin, bzw. der seines Glukuronids, sollte am Probanden unter verschiedenen Bedingungen am Menschen untersucht werden, um die Wirkungsqualität des Saftes auf die Resorption und Elimination des Flavonoids beurteilen zu können. Das Beobachtungsintervall der Ausscheidung war auf den relevanten Zeitraum zu beschränken.

Durch Versuche am isolierten Rattenjejenum sollten die Beobachtungen aus den Eliminationsstudien am Probanden analysiert werden. Hierbei sollten die Einflußfaktoren des Alters der Versuchstiere (Einfluß des Darmmetabolismus) und des pH-Wertes der Donorlösung (Einfluß der passiven Resorption) exemplarisch für andere mögliche Einflußfaktoren miteinander verglichen werden.

Diese in vivo Experimente sollten durch verschiedene in vitro Versuche zur Hydrolyse und zur Verteilung in organische Phasen, als Modell für die Membrangängigkeit sowie der Pufferkapazität des Saftes ergänzt werden, um weitere Einflußfaktoren auf anderen Ebenen (hier Resorption) aufzudecken um damit die Abläufe, die zu einer Interaktion führen besser zu verstehen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuche zur renalen Elimination von Naringin beim Menschen**

#### *2.1.1 Versuchsperson*

Um eine möglichst große Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten zu gewährleisten, wurden die folgenden Experimente mit einer Versuchsperson durchgeführt. Es hatte sich in der Vergangenheit bei ähnlichen Studien gezeigt, daß dies nötig ist, da die Ausscheidungskinetiken im Zusammenhang mit Grapefruitsaft von Person zu Person stark schwanken können (Fuhr et al., 1995).

#### *2.1.2 Zusatz von Cumarin zu den eingenommenen Substanzen*

Der Proband erhielt zusammen mit den Säften und Naringin jeweils 10 mg Cumarin (2 Kapseln Venalot®). Dies diente dazu, Interaktionen mit Grapefruitsaft in einer anderen Studie zu vergleichen (Runkel et al. 1996).

#### *2.1.3 Einnahme der Substanzen*

Die Säfte wurden in vier Portionen zu je 250 ml eingenommen. Für den Fall, daß die Menge des Saftes kleiner als 1000 ml war, wurde mit Leitungswasser auf 1000ml ergänzt. Eine Ausnahme stellte dasjenige Experiment dar, in dem 300 ml Grapefruit saft allein getrunken wurden. **Tabelle 2** veranschaulicht die Einnahmeschemata. Die Experimente 3, 6, 7 wurden jeweils dreimal (n=3) wiederholt, um die Reliabilität der ersten Versuchserie besser beurteilen zu können.

Experiment Nr.	Naringin insgesamt (mg)	Volumen des zugegebenen Saftes (ml)	Menge des zugegebenen Naringins (mg)	Volumen an Wasser (ml)	Menge des gegebenen Cumarins (mg)
1	102	300 GP	-	-	10
2	340	300 GP	238	700	10
3	340	1000 GP	-	-	10
4	680	1000 GP	340	-	10
5	1020	1000 GP	680	-	10
6	340	1000 OJ	340	-	10
7	340	-	340	1000	10
8	680	-	680	1000	10
9	340	700 GP	102	300	10
10	711	700 GP	473	300	10

**Tabelle 2:** Einnahmeschemata der Exkretionsversuche von Naringin im Urin des Menschen. (GP) Grapefruitsaft, (OJ) Orangensaft

#### 2.1.4 Zeitlicher Ablauf der Einnahme der Substanzen

Die Experimente begannen jeweils um 9.00 Uhr morgens. Die Säfte wurden in vier Portionen von 250 ml getrunken (jede halbe Stunde eine Portion).

Die Urinproben wurden folgendermaßen gesammelt:

0-2 Stunden: alle 30 min.

2-4 Stunden: stündlich

4- 10 Stunden: alle 2 Stunden

und 13, 22 und 24 Stunden nach Beginn des Experimentes

In der sich anschließenden Versuchsreihe, in der die Experimente 3, 6, 7 dreimal wiederholt wurden, sind die Proben (aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche) in den Intervallen 3-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-13 und 13-22 Stunden ausgewertet worden.

### *2.1.5 Behandlung der Urinproben*

Nach Bestimmung des Volumens der Proben, wurden Aliquote von 20 ml bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren.

### *2.1.6 Aufarbeitung der Proben zur Messung*

Die aliquoten Urinproben wurden im Kühlraum bei 6°C aufgetaut. Nach dem Aufschütteln wurden 500 µl der Probe mit 4,5 ml Aqua dest. verdünnt (Verdünnung 1:10). Zu der Verdünnung wurden 100 µl eines 1 molaren Essigsäure/Acetat (pH 7.5) Puffers gegeben. Nach Zugabe einer 1:10 verdünnten Glucuronidase/Arylsulfatase-Suspension wurden die so vorbereiteten Proben in einem Trockenschrank bei 37°C für 1 ½ Stunden zur Spaltung der Konjugate inkubiert.

Mit Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben 15 min bei 2880 U/min zentrifugiert. Die Zentrifuge stammte von der Firma Stock, Marburg.

### *2.1.7 Quantitative Analyse der Urinproben*

Die Proben wurden mittels HPLC analysiert. Dies ist die Abkürzung für **High Pressure Liquid Chromatography**. Das Prinzip des Meßverfahrens beruht darauf eine Säulenchromatografie mit hohem Druck durchzuführen. Die Detektion erfolgt durch ein UV- oder Fluoreszenzphotometer. Die Meßapparatur für die Vorversuche setzte sich folgendermaßen zusammen:

- **Detektor:** Waters Modell 440 Absorbance Detector
- **Pumpe:** Waters Modell 6000A Solvent delivery System
- **Integrator:** Waters 746 Data module
- **Säule:** Merck LiChrospher 100 RP-8 (5 µm)

Die anschließenden Versuche 3, 6 und 7 wurden mit einer Apparatur ausgewertet, die sich wie folgt zusammensetzte:

- **Detektor:** Waters-Millipore Modell 440 Absorbance Detector
- **Pumpe:** Merck-Hitachi L-6220 Intelligent Pump
- **Integrator:** Shimadzu C-R6A
- **Autosampler:** Merck-Hitachi AS2000A
- **Säule:** Merck LiChrospher 100 RP-8 (5  $\mu\text{m}$ )

Die Bestimmung des Naringingehaltes der Proben erfolgte nach der Methode von Wulf und Nagel (1976). Das Fließmittel bestand in Abwandlung zur geschilderten Methode aus 65% Wasser, 30% Methanol und 5% Essigsäure. Die Flußrate betrug 1,6 ml/min. Es wurde die Absorption von Naringin bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  gemessen. Das Einspritzvolumen betrug 10  $\mu\text{l}$ .

### *2.1.8 Auswertung der Meßergebnisse*

Die Auswertung der Messungen erfolgte anhand einer Eichgeraden (Messbereich  $10^{-4}$ – $10^{-7}$  M) mit Hilfe des Programmes GraphPad InPlot Ver. 4.03, der Firma GraphPad-Software, San Diego, USA.

### *2.1.9 Errechnung der Naringeninkonzentration in den Proben*

Nach oraler Gabe von Naringin, wird Naringenin beim Menschen nach Booth (1958) vorwiegend in konjugierter (glukuronidierter) Form ausgeschieden. Deshalb wurde nach Inkubation mit der  $\beta$ -Glukuronidase/Arylsulfatase und anschließender Messung die Menge des ausgeschiedenen Naringenins nach folgender Formel errechnet:

$$m_{\text{Naringenin}} = \frac{c_{\text{gemessen}} \times f_{\text{Verdünnung}} \times V_{\text{Probe}} \times Mm_{\text{Naringenin}}}{10^{-3}}$$

$m_{\text{Naringenin}}$  = Menge des ausgeschieden Naringenins (mg)

$c_{\text{gemessen}}$  = Konzentration des Naringenins (mg/l)

$f_{\text{Verdünnung}}$  = Verdünnungsfaktor der Probe (10,03)

$V_{\text{Probe}}$  = Volumen der Urinprobe (ml)

$Mm_{\text{Naringenin}}$  = Molmasse des Naringenins (g/mol)

## 2.2 Resorptionsstudien am isolierten Rattenjejunum

### 2.2.1 Herstellung der Lösung nach Krebs und Henseleit

In den Versuchen am isolierten Rattenjejunum wurde eine Lösung nach Krebs und Henseleit verwendet. Diese Lösung zeichnet sich gegenüber anderen physiologischen Lösungen (z.B. Ringerlösung) durch den höheren Kaliumgehalt und dem Vorhandensein von Magnesium, Phosphat und Sulfat aus. Die Chloridkonzentration ist höher als im Serum, weil ein Teil der Kationen im Serum an organische Anionen (Eiweiß, Lactat) gebunden ist. Diese werden durch Chloridionen ersetzt. **Tabelle 3** vergleicht Säugetierserum, Ringerlösung und die Lösung nach

Stoff	Säugetierserum (Mittelwert)	Ringerlösung	Lösung nach Krebs und Henseleit
Na <sup>+</sup>	ca. 320 mg-%	355 mg-%	327 mg-%
K <sup>+</sup>	22 mg-%	10,5 mg-%	23 mg-%
Ca <sup>2+</sup>	10 mg-%	8,8 mg-%	10 mg-%
Mg <sup>2+</sup>	2,5 mg-%	0 mg-%	2,9 mg-%
Cl <sup>-</sup>	370 mg-%	466 mg-%	454 mg-%
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	10 mg-%	0 mg-%	11 mg-%
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	11 mg-%	0 mg-%	11,4 mg-%
HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	54 mg-%	56 mg-%	54 mg-%
CO <sub>2</sub> (38°C)	2,5 Vol.-%	2,5 mg-%	2,5 mg-%
pH	7,4	7,4	7,4

**Tabelle 3:** Vergleich von Ringerlösung und Lösung nach Krebs und Henseleit mit Säugetierserum nach Krebs und Henseleit (1932)

Krebs und Henseleit zu Veranschaulichung miteinander.

Die Lösung wurde täglich frisch aus einer Stammlösung angesetzt, die sich aus folgenden Bestandteilen (pro Liter) zusammensetzte:

1. 172 g NaCl
2. 8,85 g KCl
3. 7,4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
4. 4,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
5. 69,5 mg Cholin
6. 9,5 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Die Positionen 1-5 wurden in der angegebenen Reihenfolge in 500 ml Aqua bidest. gelöst und dann mit dem Calciumchlorid, das ebenfalls in 500 ml Aqua bidest. gelöst wurde, vermischt und ergaben die Stammlösung. Dies geschah, um das Ausfallen von Calcium- und Magnesiumsalzen zu vermeiden.

Die gebrauchsfertige Versuchslösung erhielt man, indem man 40 ml dieser Stammlösung, 2 g Glucose und 2,138 g Natriumbicarbonat in 1000 ml Aqua dest. löste. Die Lösung wurde dann mit Carbogen (95% Sauerstoff 5% Kohlendioxid) begast, wodurch sich bei 37°C ein pH-Wert von 7,4 einstellte.

### *2.2.2 Tiere und Tierhaltung*

Alle Versuche wurden mit männlichen Ratten des Auszuchtstammes Wistar aus der Tierzucht des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Karl-von-Frisch Straße, Marburg, durchgeführt. Alle Tiere, die für eine Versuchsreihe benutzt wurden, stammten aus demselben Wurf.

Es wurden 8 Tiere im Alter von 8 Wochen mit einem Gewicht von 230-250 Gramm und 4 Tiere im Alter von 18 Wochen mit einem Gewicht von 320-350 Gramm verwendet.

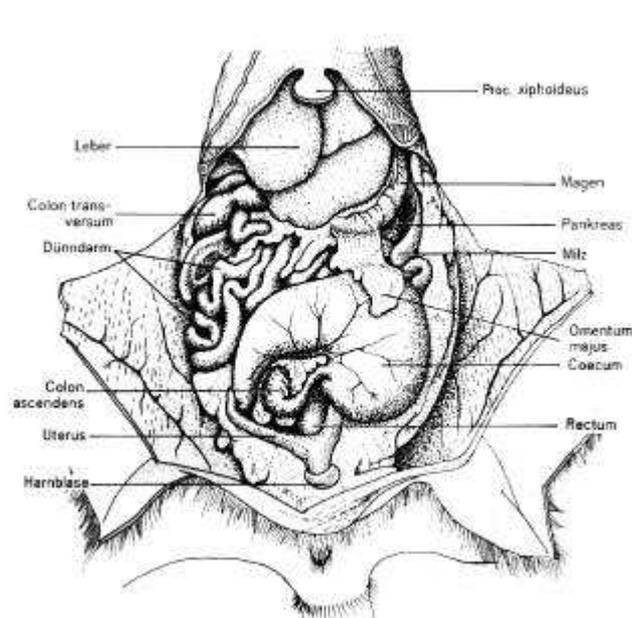
Handelsübliches Futter und Wasser wurde den Tieren bis zur Tötung ad libitum angeboten, weil der Einfluß von Nahrungskarenz auf die Resorptionsleistung des Darmepithels gezeigt werden konnte (Delusio 1969b).

Im klimatisierten Tierstall herrschte eine Raumtemperatur von konstant 22°C sowie ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus. Die Periodik betrug 12 Stunden mit Beginn der Hell-Phase um 6 Uhr morgens.

### 2.2.3 Tötung der Tiere und Präparation des Jejunums

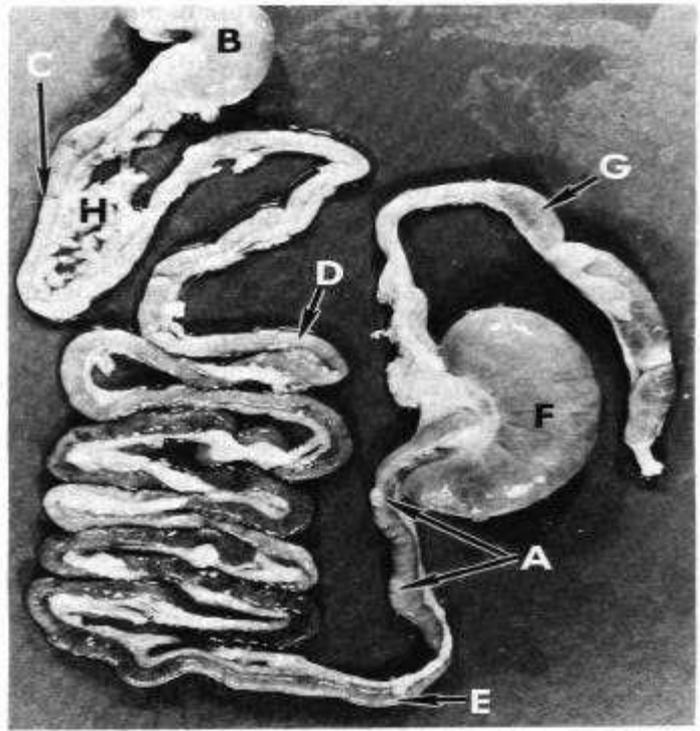
Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und danach die Bauchdecke in Richtung der Linea alba eröffnet.

Nach Aufsuchen des Caecums wurde der gesamte Dünndarm entlang des Mesenteriums von caudal bis zum Beginn des Duodenums freipräpariert und abgesetzt. Der caudale Anteil des Duodenums ergab sich per definitionem aus dem Darmanteil, der sekundär retroperitoneal gelegen ist. Der orale Teil des Präparats wurde mit einem Faden markiert, um später eine orthograde Perfusion zu gewährleisten



**Abbildung 14:** Situs der Ratte nach Eröffnung durch den im Text angegebenen Medianschnitt (nach Storch 1993)

Nach Organentnahme wurde das Präparat sofort in vorher begaste Krebs-Henseleit-Lösung gelegt, um es feucht zu halten. Anschließend wurde vom oralen Anteil des Darmpräparates ein 10 cm langes Stück abgemessen und mit Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Pro Tier wurde jeweils ein Versuch durchgeführt, um mit dem gleichen Darmanteil arbeiten zu können.



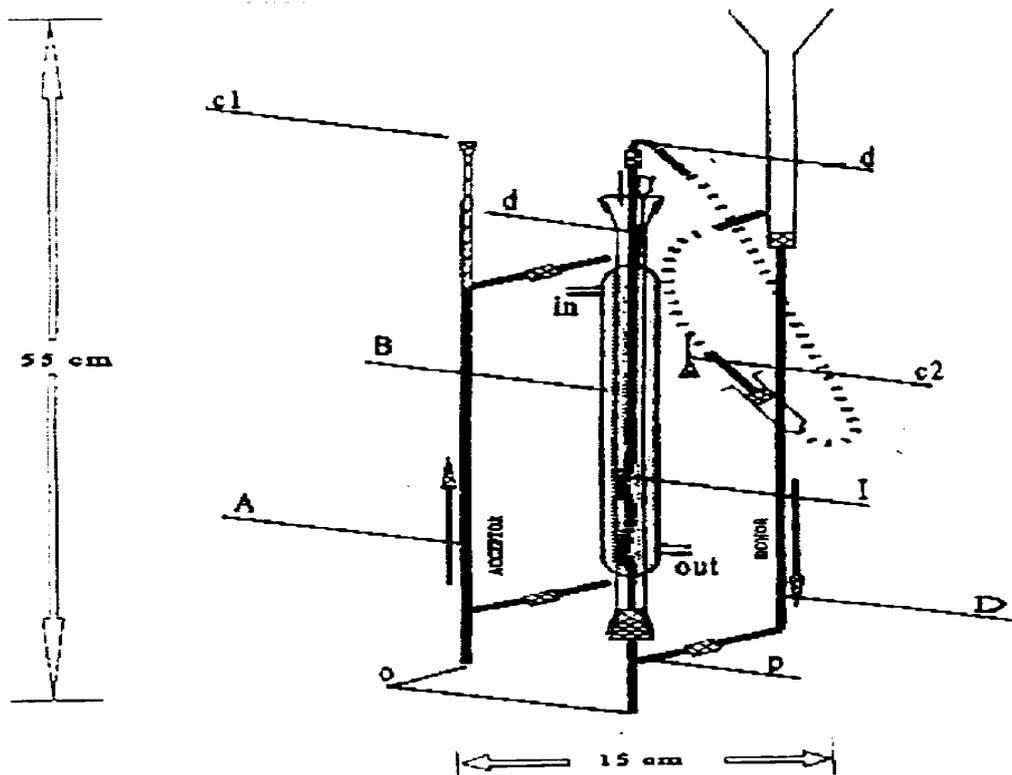
**Abbildung 15:** Anatomie des Gastrointestinaltraktes der Ratte: Die Pfeile (A) zeigen die Peyer-Plaques, (B) Magen, (C) Duodenum, (D) Jejunum, (E) Ileum, (F) Caecum, (G) Colon, (H) Pankreas. Nach Baker (1979)

#### 2.2.4 Apparatur für die Resorptionsversuche

Nach dem Spülen mit Krebs-Henseleit-Lösung wurde das Darmstück in die Resorptionsapparatur nach Norta et al. (1996) eingesetzt, die den Vorteil bietet mit kleinen Volumina sowohl auf der Donor- als auch der Akzeptorseite arbeiten zu können. Der Darm wurde auf die Glaskapillaren mit zwei Pinzetten aufgezogen und mit je zwei vierfach gedrehten Zwirnfäden an jeder Seite befestigt.

Die Apparatur wurde nach Plänen, die von Herrn Martin Norta freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, in der Werkstatt des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie angefertigt.

In **Abbildung 16** ist der Aufbau der Apparatur erläutert.



**Abbildung 16:** Apparatur zur Untersuchung von Resorptionsmechanismen im isolierten Rattendarm nach Norta (1996) Erläuterung im Text

Das Grundprinzip, dieser Apparatur besteht darin, sowohl intraluminal (Donor) als auch extraluminal (Akzeptor) physiologische Lösungen durch einströmendes Carbogen zirkulieren zu lassen.

Der Akzeptorkreislauf (A) wurde über den Zufluß (c1) mit Carbogen begast, wodurch die Zirkulation hergestellt wurde.

Der Donorkreislauf (D) wurde über den Zufluß (c2) ebenso mit Carbogen versorgt und zum Zirkulieren angeregt.

Das System wurde über die mit (in) und (out) bezeichneten Anschlüsse mit 37°C warmen Wasser zur Temperaturregelung umspült. Dazu diente ein Thermostat der Firma Thermomix Modell 1441.

Verbunden wurden die einzelnen Glasteile durch Silikonschläuche bzw. Silikonstopfen. Der Stopfen (d) war zur Vermeidung eines Überdrucks im Akzeptorkreislaufes nur locker eingesetzt.

Die Öffnungen (o) und (p) waren als Abflüsse während des Versuches verschlossen und dienten nach Beendigung des Versuches dem Entleeren der Apparatur.

Mit (l) ist in der Zeichnung der eingesetzte Darm bezeichnet, der nach der unter 2.2.3 beschriebenen Art präpariert und befestigt wurde.

### *2.2.5 Methoden zur Beurteilung des physiologischen Zustandes des Darmpräparates*

Da während des Versuches eine direkte Beurteilung der Intaktheit des Präparates nicht möglich war, wurde entsprechend Heylings (1991) als Parameter für Veränderungen der Durchlässigkeit der tight-junctions die transmurale Potentialdifferenz gemessen.

Ein zweiter Parameter, der zur Orientierung über die Durchlässigkeit der Darmwand und den Zustand der Mucusschicht des Darmstückes diene, ist nach Lange (1994) die Permeation von Evans Blue, welches nach Versuchsende der Donorlösung zugesetzt wurde.

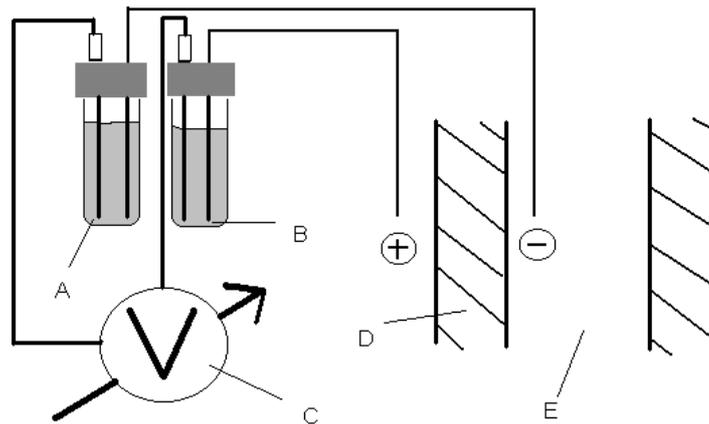
#### *2.2.5.1 Ableitung der transmuralen Potentialdifferenz*

Die transmurale Potentialdifferenz zwischen Donor- und Akzeptorseite wurde mittels zweier in den Werkstätten des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie gefertigter Silberelektroden ermittelt.

Anode und Kathode sind vor Versuchsbeginn durch Eintauchen in 5% KCl- Lösung und dem Anschließen der Elektoden an eine 9 V- Batterie festgelegt worden.

Die Ag/AgCl- Elektroden wurden dann in zwei Reagenzgläsern mit 5% KCl befestigt und zur Verfestigung der Kaliumchloridlösung 2% Agar-Agar zugesetzt. Die Gläser sind mit Schraubverschlüssen verschlossen worden, in die Bananenstecker zum Anschluß an ein Voltmeter eingepasst waren.

Die transmurale Potentialdifferenz ist durch zwei Kupferdrähte von ca. 25 cm Länge zwischen der Donor- und Akzeptorlösung abgeleitet worden (**Abbildung 17**). Aufgezeichnet wurde die Potentialdifferenz mit einem Schreiber der Firma BBC/Goerz Modell Servogor 220.



**Abbildung 17:** Aufbau der Messapparatur zur Ableitung der transmuralen Potentialdifferenz. (A) Ag/AgCl- Elektrode, (B) Kupferdraht in 5% KCl plus 2% Agar- Agar, (C) Voltmeter, (D) Darmwand, (E) Intraluminale (Donormedium) Seite des Darmstückes

### 2.2.5.2 Zusatz von Evans Blue zur Beurteilung der Mucusschicht des Präparats sowie seiner makroskopisch erkennbaren Durchlässigkeit

Evans Blue ist ein Azofarbstoff mit einem Molekulargewicht von 960,83. Nach Saria (1983) wird es im allgemeinen zur Beurteilung der Kapillarpermeabilität genutzt. Es wird nur in sehr geringem Maße durch die Darmmukosa resorbiert. Evans Blue besitzt die Eigenschaft nach i.v.-Injektion innerhalb von Sekunden einen Komplex mit Eiweiß zu bilden (im Plasma vornehmlich mit Albumin). Infundiert man es in die intraluminale Seite des Dünndarms so bildet es Komplexe mit der Mucusschicht des Darmes, die durch Acetylcystein ablösbar sind. Somit ist Evans Blue als makroskopischer Marker für das Vorhandensein der Mucusschicht zu nutzen. Darüberhinaus diente es zur Orientierung über die grobe Dichtigkeit des Präparates (z.B. über Löcher, die bei der Präparation oder der Befestigung in der Apparatur entstanden).

Am Ende jedes Versuches wurden 200 µl einer Evans Blue-Lösung der Donorseite zugesetzt, die 5 mg Evans Blue in 50 ml Aqua dest. enthielt.

## *2.2.6 Vorbereitung der Grapefruitsäfte für die Resorptionsversuche am Darm*

### *2.2.6.1 Herkunft und Aufbewahrung der Grapefruitsäfte*

Die Grapefruitsäfte, die bei den Versuchen eingesetzt wurden stammten von der Firma WeserGold, 31735 Rinteln und wurden in Rinteln, Niedersachsen abgefüllt. Die Säfte wurden bis zum Versuchsbeginn bei 6°C gelagert.

### *2.2.6.2 Aufreinigung der Grapefruitsäfte*

Zu Abtrennung von Fruchtfleisch und anderen größeren Partikeln, die bei der späteren Messung der Proben in der HPLC zu Verunreinigungen der Säule führen würden, wurden die Säfte 15 min lang bei 10000 U/min mit einer Zentrifuge der Firma Sorval, Modell Superspeed RC2-B, zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für die Versuche verwendet.

### *2.2.6.3 Bestimmung und Einstellung des pH-Wertes der Grapefruitsäfte*

Der pH-Wert der Säfte wurde mit einem pH-Meter der Firma Knick, Model Calimatic 761, bestimmt. Die Säfte wurden danach gegebenenfalls mit einer 10 N NaOH auf den gewünschten pH-Wert titriert. Die Natronlauge wurde in dieser Konzentration gewählt, um die Verdünnung des Saftes möglichst gering zu halten.

## *2.2.7 Versuchsablauf*

### *2.2.7.1 Versuchsdauer*

Der Beobachtungszeitraum betrug bei den Resorptionsstudien 1 Stunde. Vor Versuchsbeginn wurde eine 2 minütige Vorlaufphase gesetzt, die dazu diente, nach Befüllen der Apparatur mit der Donorlösung, gegebenenfalls vorhandene Luftblasen aus dem System zu entfernen. Danach wurde die Lösung im Akzeptorkreislauf erneuert und der Versuch begonnen.

### *2.2.7.2 Versuchsbedingungen*

Es wurden 40 ml Grapefruitsaft auf der Donorseite angeboten. Die Akzeptorseite, wurde abhängig vom Muskeltonus des Präparats mit 30-40 ml Krebs-Henseleit'scher Lösung befüllt. Das Volumen des Akzeptors wurde notiert und später in die Formel nach Norta et al. (1996) einbezogen.

Es wurden Versuche mit Därmen von 8 Wochen und 18 Wochen alten männlichen Ratten durchgeführt. Die Präparate der 8 Wochen alten Tiere wurden in zwei Versuchsreihen bei einem pH von 3,2 und 6,2 mit Grapefruitsaft inkubiert. Die Därme der 18 Wochen alten Tiere wurden mit Grapefruitsaft pH 3,2 in den Versuchen eingesetzt.

### *2.2.7.3 Probenentnahme*

Nach Beendigung der Vorlaufphase (5 min.) wurden extraluminal Proben nach 0, 5, 15, 30, 45 und 60 min genommen. Der Zeitpunkt 0 min bezieht sich auf den eigentlichen Versuchsbeginn. Das Probenvolumen betrug 100 µl. Die Proben wurden in 1 ml Eppendorf-Cups gefüllt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

### *2.2.7.4 Probenaufbereitung*

Nach Beendigung eines Versuches wurden die Proben 15 min in einer Beckman Zentrifuge, Modell Microfuge E, zentrifugiert und danach 70 µl vom Überstand abgenommen. Bis zur Messung wurden die Proben bei 6°C aufbewahrt.

### *2.2.7.5 Bestimmung des Naringingehaltes der Proben*

Die Konzentrationsbestimmung von Naringin in den Proben erfolgte mittels HPLC mit der unter 2.1.7 beschriebenen Methode.

### *2.2.7.6 Errechnung der Naringinkonzentration in der Akzeptorflüssigkeit*

Die Konzentrationen in der Akzeptorflüssigkeit wurden ausgehend von den Konzentrationen, die von GraphPad InPlot ermittelt wurden, um die jeweils vorher

aus dem Donor entfernte Flüssigkeitsmenge korrigiert. Dies geschah nach Norta et al. (1996) mit folgender Formel:

$$C_c = \left[ c_{m(n)} + \sum_{l=1}^{l=n-1} c_{m(l)} \times \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Akzeptor}}} \right] \times \frac{V_{\text{Akzeptor}}}{V_{\text{Standard}}} \times \frac{l_{\text{Standard}}}{l_{\text{gemessen}}}$$

$C_c$  = korrigierte Konzentration (mg/l)

$V_{\text{Probe}}$  = Probenvolumen

$V_{\text{Akzeptor}}$  = Volumen des Akzeptors

$V_{\text{Standard}}$  = Standardvolumen des Akzeptors

$l_{\text{Standard}}$  = Standardlänge des Darmsegmentes

$l_{\text{gemessen}}$  = gemessene Länge des Darmsegmentes

### 2.3 Bestimmung des Naringingehaltes der Fruchtsäfte

Zur Bestimmung des Naringingehaltes der Säfte wurde nach Arnao et al. (1990) eine Extraktion mit Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgenommen.

Dazu wurden 2 ml der Säfte 1:1 mit DMSO überschichtet und 2 Stunden in einem Mischgerät der Firma Heidolph gemischt. Die Proben wurden danach 12 Stunden zur Phasentrennung bei 6°C im Kühlraum gelagert.

Aus der wässrigen Phase wurde mit der unter 2.1.7.4 beschriebenen Methode der Gehalt an Naringin bestimmt.

### 2.4 Bestimmung der Pufferkapazität des Grapefruitsaftes

Um einen Eindruck über die Puffereigenschaften des Grapefruitsaftes festzustellen, wurde der Saft mit einer 1 molaren Natronlauge titriert. Der Verdünnungsfaktor der Natronlauge wurde mit einer 1 molaren Standardlösung der Firma Merck bestimmt.

Die pH-Änderungen wurden mit einem pH-Meter der Firma Knick, Modell Calimetic 761 gemessen.

## 2.5 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Oktanol/ Wasser für Naringin und Grapefruitsaft

Um die Resorbierbarkeit einer Substanz aus dem Magen-Darm-Trakt beurteilen zu können, kann nach Hanisch et al. (1979) der Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Wasser bestimmt werden.

Nach Bestimmung des pH-Wertes der Proben wurden diese auf 5 verschiedene pH-Werte von pH 3.2 bis 7.2 in Stufen von jeweils einer pH-Einheit eingestellt. Dies wurde mit einer 10 molaren Natronlauge und einer 1 molaren Salzsäure per Bürette und dem oben beschriebenen pH-Meter der Firma Knick durchgeführt. Ebenso wurde mit einer Naringinlösung, die das Flavanon in gleicher Konzentration wie der Saft in destilliertem Wasser gelöst enthielt, verfahren.

2 ml der Proben wurden 1:1 mit Oktanol überschichtet und 2 Stunden lang in einem Überkopfschüttler der Firma Heidolph gemischt. Danach wurden die Proben zur Phasentrennung 2 Stunden lang im Kühlraum bei 6°C stehengelassen.

Aus der wässrigen Phase wurde mit der unter 2.1.7.4 beschriebenen Methode der Gehalt der Lösung an Naringin bestimmt und die Differenz dieser Messung und der Gesamtmenge im Verhältnis zur eingesetzten Menge angegeben.

$$VK = \frac{c(\text{gesamt}) - c(\text{wässrigePhase})}{c[\text{wässrigePhase}]} = \frac{c(\text{Oktanol})}{c(\text{wässrigePhase})}$$

## 2.6 Hydrolyse von Naringin mit 0.1 N Salzsäure

Ameer et al. (1996) vermuteten die Glykosidspaltung unter Einfluß der Salzsäure des Magens. Um dies zu überprüfen wurde eine  $10^{-3}$  molare Naringinlösung (Lösungsmittel Aqua dest.) mit demselben Volumen einer 0,1 N HCl gemischt und für 30 min inkubiert. Danach wurde das Inkubat 1:1 mit einer Standardlösung des Naringins und des Naringenins, die eine Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l besaßen, versetzt. 10 µl dieser

Lösung wurden dann in der schon beschriebenen Weise (s. Kap. 2.1.7) per HPLC analysiert.

## **2.7 Statistische Methoden**

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Excel 2000, der Firma Microsoft, Richmond, USA, auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer durchgeführt. Als statistische Methode wurde die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung für Gesamtpopulationen und der t-Test nach Student angewandt.

## **2.7 Materialien**

Die zur Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit benötigten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Herstellern in der jeweils höchsten lieferbaren Reinheitsstufe bezogen:

### **Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland:**

$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase

### **Fluka, Buchs, Schweiz:**

Naringin

### **Roth, Karlsruhe, Deutschland:**

Naringenin

### **Schaper & Brümmer, Salzgitter-Ringelheim, Deutschland:**

Venalot<sup>®</sup> Kapseln (enthalten 10 mg Cumarin pro Kapsel)

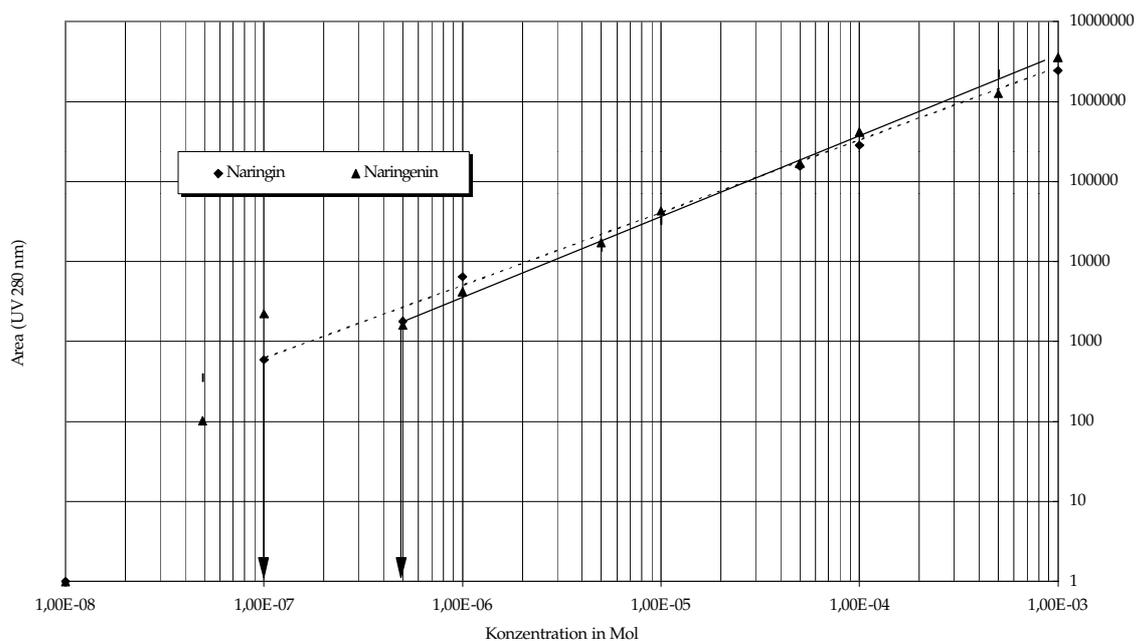
Alle anderen benutzten Chemikalien wurden von der Firma **E. Merck, Darmstadt, Deutschland** in p.a.- Qualität bezogen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Linearität bei der Messung von Naringin und Naringenin mit der HPLC

Um den Beobachtungsraum der HPLC-Messungen beurteilen zu können, wurden ausgehend von einer  $10^{-3}$  molaren Naringin- bzw. Naringeninlösung (als Lösungsmittel diente Methanol), Verdünnungen bis zur Stufe  $10^{-8}$  in folgenden Konzentrationen hergestellt:

$10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  M



**Abbildung 18:** Messfenster von Naringin und Naringenin. Die Pfeile geben die Nachweisgrenze wieder (Korrelationskoeffizient  $r > 0,95$ )

In **Abbildung 18** sind die erhaltenen Meßwerte grafisch dargestellt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und der Mittelwert in die Grafik eingetragen. In der Zeichnung sind die Meßwerte verbunden, für die mit Hilfe von GraphPad InPlot ein über 0,95 liegender Korrelationskoeffizient berechnet werden konnte. Für die Naringinmessung wurden hierzu die Meßwerte von  $10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  in die Berechnung

einbezogen (Korrelationskoeffizient  $r=0,95$ ). Für Naringenin wurde der Beobachtungsbereich von  $5 \times 10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  zur Auswertung herangezogen (Korrelationskoeffizient  $r=0,98$ ).

In niedrigeren Konzentrationen bestand keine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche.

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Naringeninbestimmung im Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  zuverlässig durchführbar ist. Die Naringeninbestimmung ist weniger sensitiv, denn diese Substanz kann nur in einem Bereich von  $10^{-3}$  bis  $5 \times 10^{-7}$  zuverlässig nachgewiesen werden.

## 3.2 Die Resorption des Naringins beeinflussende Faktoren

### 3.2.1 Bestimmung der Pufferkapazität des Grapefruitsaftes

Zur Bestimmung der Pufferkapazität des Grapefruitsaftes (50 ml) wurde eine Titration

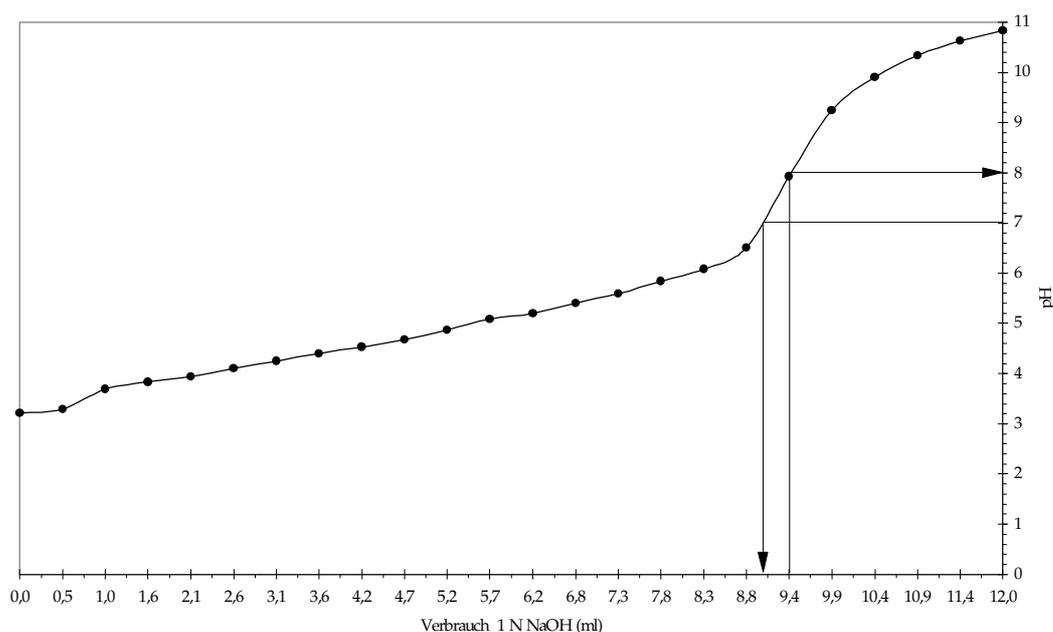


Abbildung 19: Titrierung von 50 ml 100% Grapefruitsaft gegen 1 N NaOH

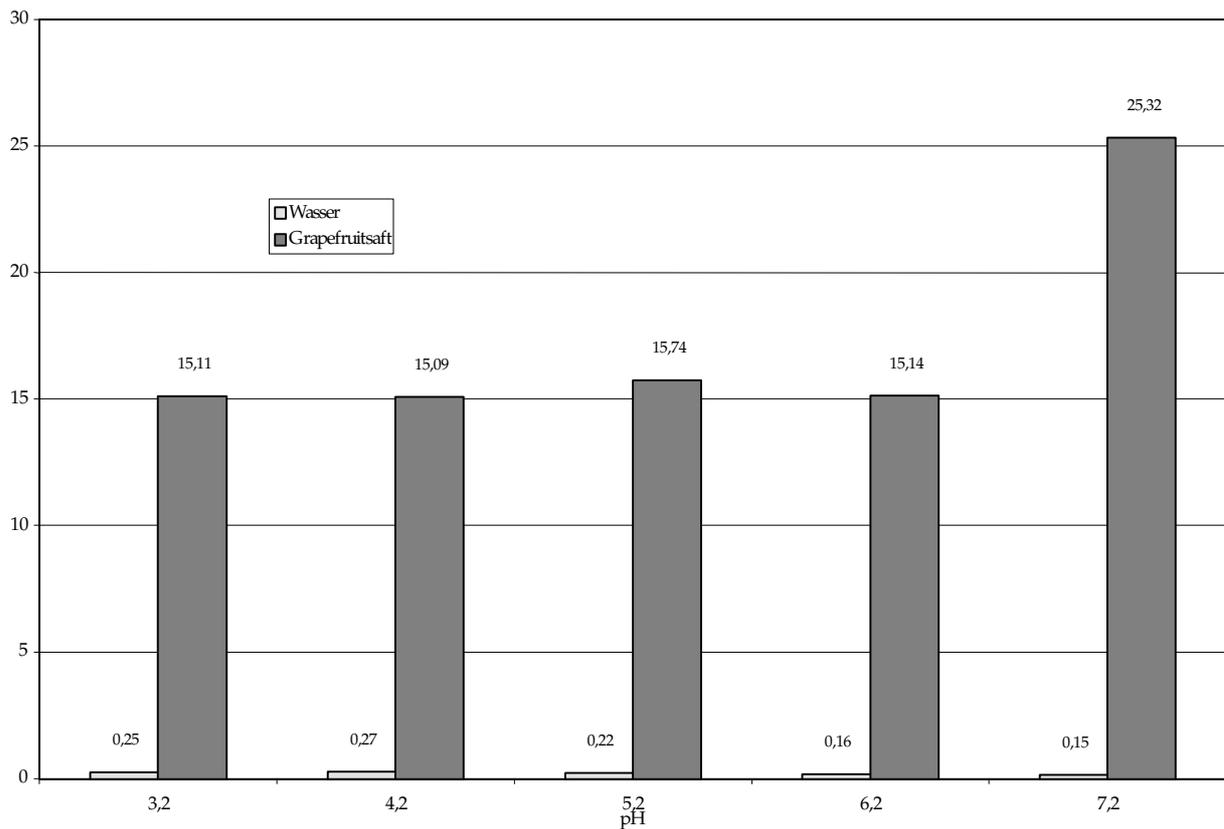
gegen eine 1 N NaOH durchgeführt. Dies ist in **Abbildung 19** dargestellt.

Der Neutralpunkt ist in einer Titration definiert als der Punkt, an dem die Lösung den pH 7 erreicht. Zeichnerisch ließ sich dieser Wert mit 9,04 ml 1 N NaOH-Verbrauch bestimmen. Auf 1000 ml umgerechnet ergibt dies einen Gehalt von 180,8 val saurer Valenzen im Grapefruitsaft.

Der Äquivalenzpunkt einer Lösung, der von der Art der vorliegenden Säure abhängt, ist der Punkt, ab dem der pH der Lösung nur noch von der zugegebenen Lauge bestimmt wird. Es sind also alle Säureäquivalente verbraucht (Wendepunkt). Dieser Wert ließ sich in der Zeichnung bei pH 8 und einem Laugenverbrauch von 9,4 ml bestimmen. Auf 1000 ml Grapefruitsaft umgerechnet ergibt dies einen Gehalt von 188 val saurer Valenzen.

### *3.2.2 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Oktanol/Wasser von Naringin aus Grapefruitsaft und Wasser*

Um die Löslichkeit einer Substanz im Magen-Darm-Trakt beurteilen zu können, wurde der Verteilungskoeffizient des Naringins zwischen Oktanol und wässriger Phase bestimmt (**Abbildung 20**). In einer Versuchsserie wurde die Verteilung unter Einsatz von Grapefruitsaft, in einer anderen die von reinem Naringin, in Wasser gelöst, gemessen.



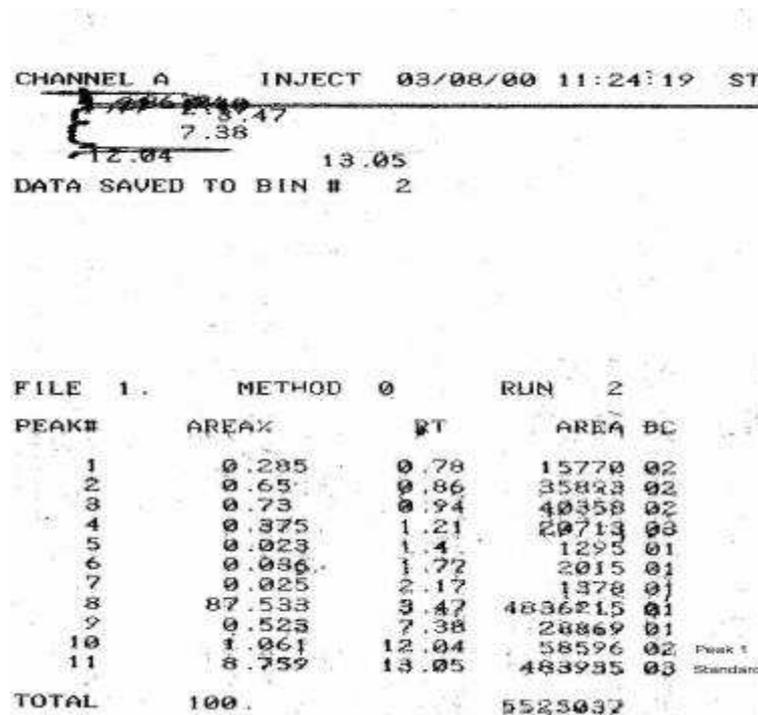
**Abbildung 20:** Verteilungskoeffizient Oktanol/wässrige Phase von Naringin aus Grapefruitsaft und Wasser

Für die Verteilung von Naringin aus Wasser ergab sich ein Verteilungskoeffizient 0.25 bei pH 3.2. Der Verteilungskoeffizient nahm über den pH-Bereich von 3.2 bis 7.2 auf 0.15 ab. Der Mittelwert beträgt 0.21. Das Maximum der Verteilung wird bei pH 4.2 mit einem Verteilungskoeffizienten von 0.27 erreicht.

Bei der Verteilung aus dem Grapefruitsaft ergaben sich unter sonst gleichen Bedingungen Koeffizienten, die um dem Faktor 100 höher liegen. Über dem beobachteten pH-Bereich blieben die Koeffizienten relativ konstant ( im Mittel 15.27). Eine Ausnahme bildet der Meßwert bei pH 7.2, der in diese Beobachtung nicht miteinbezogen wurde. Der Saft verfärbte sich beim Puffern in diesem pH-Bereich braun. Dies kann als Zeichen von verstärkter Phenolbildung aus den organischen Bestandteilen des Saftes gewertet werden. Da hierzu auch das enthaltene Naringin gehört, ist der relativ hohe Verteilungskoeffizient von 25 eventuell mit der Zersetzung des Flavanons zu erklären.

### 3.2.3 Hydrolyse von Naringin durch Salzsäure

Die Analyse einer 30 minütigen Hydrolyse ergab, daß sich ein Metabolit gebildet hatte (Peak 1), der nicht mit dem internen Naringinstandard identisch ist. Da mit einer reversed-phase-Säule gemessen wurde, ist davon auszugehen, daß dieser Metabolit hydrophiler ist als das Naringenin.



**Abbildung 14:** Hydrolyse von Naringin mit 0,1 N HCl. (Peak1 ) ist der neu auf tretende Metabolit, (Standard) der interne Naringeninstandard

### 3.2.4 Zusammenfassung

Der Grapefruitsaft besitzt Pufferkapazitäten, die erst nach Verbrauch von ca. 180.8 val saurer Valenzen erschöpft sind. Es könnte sein, daß nach Einnahme von Grapefruitsaft, der pH-Wert im Magen-Darm-Trakt sich durch die Säurebelastung zunächst auf subphysiologische Werte verschiebt.

Das Verteilungsgleichgewicht von Naringin aus Wasser läßt sich um den Faktor 100 steigern, wenn Grapefruitsaft als Lösungsmatrix dient. Diese stellt einen wesentlichen,

die Verfügbarkeit des Flavonoids für den Organismus beeinflussenden Faktor dar. Beide Phänomene könnten von Einfluß auf die Resorption sein.

### 3.3 Bestimmung des Naringingehaltes der verwendeten Säfte

In den in-vivo-Versuchen zur Elimination des Naringins wurde der Gehalt von 1000 ml Grapefruitsaft, der verwendet wurde, in der benutzten Charge mit 340 mg Naringin bestimmt. Im verwendeten Orangensaft konnte kein Naringin gemessen werden.

Der für die in-vitro-Resorptionsversuche verwendete Grapefruitsaft enthielt 313.6 mg Naringin in einem Liter Saft.

### 3.4 Versuche zur Exkretion von Naringin beim Menschen (n=1)

#### 3.4.1 Kumulation von Naringin nach 24 Stunden

**Abbildung 21** stellt das Wiederfinden von Naringin, gemessen als Naringenin kumulativ für 24 Stunden Versuchsdauer dar. Die Ausscheidung ist nach 13 Stunden abgeschlossen. Die Ausscheidungsmenge erreicht den höchsten Wert (39.59 mg Naringenin) in demjenigen Experiment, in dem 1000 ml Grapefruitsaft mit 680 mg Naringin (340+680 mg Naringin) eingenommen wurden (s. **Tabelle 4**).

Die Elimination von Naringenin konnte durch Zusätze von Naringin zum Grapefruitsaft gesteigert werden. In dem Experiment, in dem die einfache Dosis Naringin, die in einem Liter Grapefruitsaft enthalten ist, der 1l Dosis aufgestockt wurde (340+340 mg Naringin), konnte die Ausscheidungsmenge verglichen mit dem puren Saft von

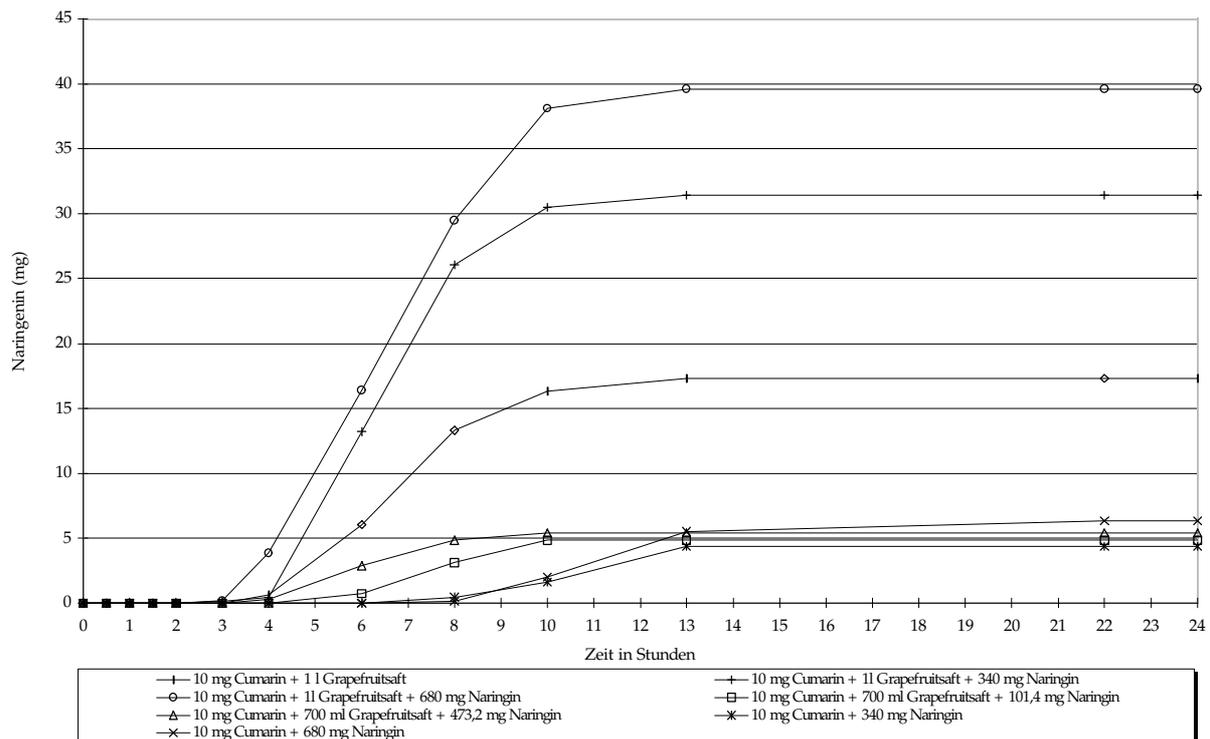


Abbildung 21: Kumulation von Naringin im Urin gemessen als Naringenin

17.32 mg auf 31.42 mg gesteigert werden. Wenn man dem Saft die doppelte Menge seines Naringingehaltes zusetzt, was der dreifachen Naringinkonzentration entspricht, läßt sich dieser Wert noch auf 39.59 mg steigern. Die Steigerung der Ausscheidung ist jedoch nicht so groß wie im Experiment, in dem die einfache Dosis an Naringin dem Saft zugesetzt wurde.

Nach Einnahme von 300 ml Grapefruitsaft findet man die geringste Ausscheidung von 0.61 mg Naringenin im Urin (in der Abbildung nicht aufgeführt).

In den Experimenten, in denen die verminderte Saftmenge durch eine entsprechende Menge von Leitungswasser und Naringin ersetzt wurde, zeigt sich, daß die Ausscheidung im Vergleich zum 1000 ml Grapefruitsaft-Experiment geringer ist (siehe **Tabelle 4**). Die Ausscheidung scheint mehr von der eingesetzten Saftmenge als von der Naringinmenge abhängig zu sein. Nach Einnahme von Naringin ohne Saftzusatz sind die kumulativen Ausscheidungen in einem ähnlichen Bereich (6.39 mg im Experiment mit additiven 680 mg Naringin und 4.37 mg im Experiment mit Additiven von 340 mg Naringin).

Experiment	ausgeschiedene Naringeninmenge
10 mg Cumarin + 1 l Grapefruit Saft	17.32 mg
10 mg Cumarin + 700 ml Grapefruit Saft + 102 mg Naringin	4.84 mg
10 mg Cumarin + 700 ml Grapefruit Saft + 473 mg Naringin	5.39 mg
10 mg Cumarin + 680 mg Naringin	6.34 mg
10 mg Cumarin + 340 mg Naringin	4.38 mg
10 mg Cumarin + 1l Grapefruit Saft + 680 mg Naringin	39.59 mg
10 mg Cumarin + 1 l Grapefruit Saft + 340 mg Naringin	31.42 mg
10 mg Cumarin + 1 l Orangensaft + 340 mg Naringin	6.28 mg
10 mg Cumarin + 300 ml Grapefruit Saft	0.61 mg
10 mg Cumarin + 300 ml Grapefruit Saft + 237 mg Naringin	3.13 mg

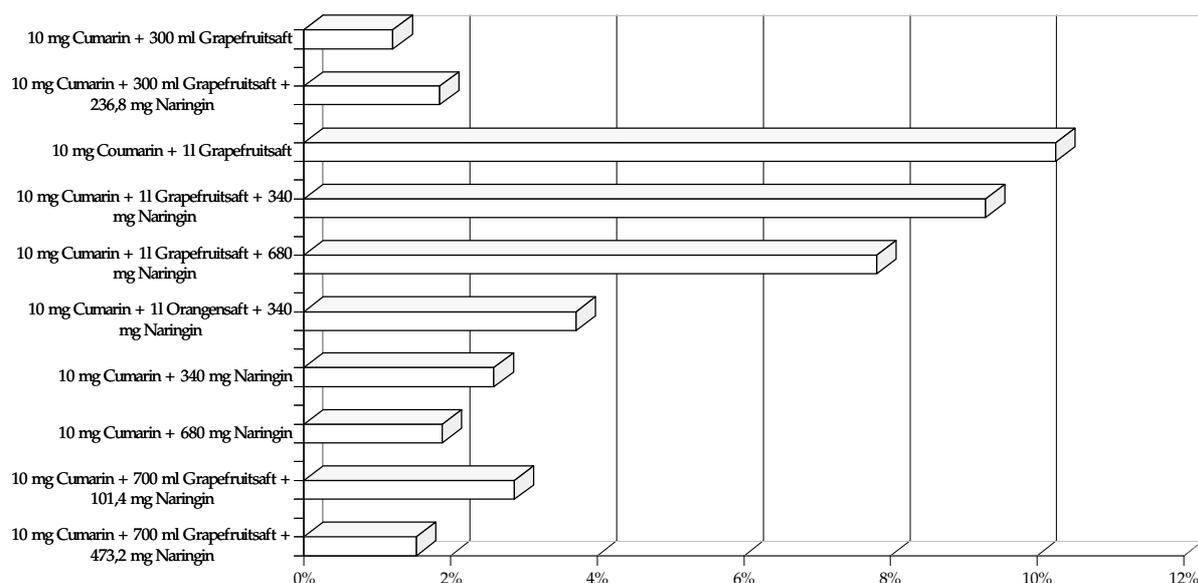
**Tabelle 4:** Auflistung der durchgeführten Ausscheidungsversuche mit der wiedergefundenen Naringeninmenge in Milligramm

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß sich die Gesamtmenge des Naringin durch Naringinzusätze zum Grapefruitsaft bis auf ca. das Doppelte steigern lässt. Dagegen führt der Einsatz von Orangensaft und Wasser als Lösungsmatrix zu einer verminderten relativen Elimination im Vergleich mit Grapefruitsaft als Lösungsmatrix.

#### 3.4.2 Prozentuale Wiederfindung von Naringin, gemessen als Naringenin im Urin

**Abbildung 22** zeigt, daß die prozentuale Wiederfindung von Naringin, gemessen als Naringenin im Urin kleiner als 11 Prozent ist.

Der Höchstwert der prozentualen Wiederfindung wird erreicht, wenn 1000 ml Grapefruitsaft ohne weitere Naringinzusätze eingenommen wurden. Hinzufügen weiteren Naringins zu der in 1000 ml Grapefruitsaft enthaltenen Dosis kann die Wiederfindung von Naringin im Urin nicht verbessern (9.3% im Experiment mit 1000 ml Grapefruitsaft und additiven 340 mg Naringin und 7.81% im Experiment mit 1000 ml Grapefruitsaft und additiven 680 mg Naringin).



**Abbildung 22:** Prozentuale Wiederfindung von Naringin, gemessen als Naringenin im Urin des Menschen

Die prozentuale Wiederfindung von Naringin scheint in erster Linie von der eingesetzten Saftmenge abhängig zu sein. Dies ist daran zu erkennen, daß durch Ersatz von Grapefruitsaft durch Leitungswasser und Substitution des fehlenden Naringins, die Wiederfindung nicht die Ausscheidung der vollständigen Säfte erreicht (2.87% im Experiment mit 700 ml Grapefruitsaft plus 101.4 mg Naringin und 1.85% im Experiment mit 300 ml Grapefruitsaft plus 236.8 mg Naringin).

Auch Zusätze zu kleineren Saftmengen reduzieren die Wiederfindung von Naringin (1.5% in dem Experiment, in dem 700 ml Grapefruitsaft 473.2 mg Naringin zugesetzt wurden und 1.85% in dem Experiment mit 300 ml Grapefruitsaft plus 236.8 mg Naringin).

Die Einnahme von Naringin als einzige Flavanonquelle zeigt, daß die Wiederfindung kleiner ist verglichen zur Einnahme von 1000 ml Saft, in dem die gleiche Naringinmenge enthalten ist (2.59% im 340 mg Naringin-Experiment und 1.88% im Experiment, in dem 680 mg Naringin eingenommen wurden).

Im Vergleich zur Wiederfindung nach der Einnahme der 340 mg Naringin-Dosis in Wasser (2.59%) ist die Wiederfindung von 1000 ml Orangensaft zugesetztem Naringin (340 mg) auf 3.71% erhöht.

#### *3.4.3 Elimination von Naringenin mit Grapefruitsaft als alleiniger Flavanonquelle in vivo (n=1)*

**Abbildung 23** stellt den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung von Naringenin nach Einnahme von 1000 ml und 300 ml Grapefruitsaft dar.

Nach Einnahme von 1000 ml Grapefruitsaft zeigt die Ausscheidung von Naringenin zwei Maxima, von denen das erste im Intervall von 4-8 Stunden mit einem Peak 6-8 Stunden nach Einnahme (222 mmol/min Naringenin) liegt. Ein zweites Maximum ist 10- 13 Stunden (Peak: 20.1 mmol/min) nach Beginn des Experimentes zu erkennen. Im Bereich von 13-22 Stunden ist die Ausscheidung von Naringenin nur noch gering

**Abbildung 23:** Ausscheidung des Naringenins nach Einnahme von 300 ml bzw. 1000 ml Grapefruitsaft

(0.52 mmol/min Naringenin). Nach Einnahme von 300 ml Grapefruitsaft läßt sich Naringenin im Intervall von 3-10 Stunden nachweisen (Peak: 4-6 Stunden mit 10.2 mmol/min).

#### *3.4.4 Elimination von Naringenin bei Gabe von Naringin als alleiniger Flavanonquelle in vivo (n=1)*

**Abbildung 24** zeigt, daß nach Einnahme von purem Naringin alleine (gelöst in 1000 ml Leitungswasser) die Ausscheidung von 6 bis 22 Stunden nach Einnahme der Substanzen erfolgt. Die maximale Naringeninelimination fand sich im Intervall von 10- 13 Stunden (56.1 mmol/min bei 340 mg Naringingabe bzw. 71.6 mmol/min nach Gabe von 680 mg Naringin). Im Intervall zwischen 4-8 Stunden liegt kein früher Ausscheidungspeak, wie er beim Experiment mit 1L Grapefruitsaft allein zu

beobachten ist. Für den unmittelbaren Vergleich wurde das Experiment, bei dem 1L Grapefruitsaft ohne Zusätze getrunken wurde, mit in die Abbildung aufgenommen.

**Abbildung 24:** Vergleich der zeitliche Ausscheidung von Naringenin zwischen 1L Grapefruitsaft und Naringin als alleiniger Naringinquelle

#### *3.4.5 Ausscheidung von Naringenin nach Einnahme von 1l Grapefruitsaft mit verschiedenen Naringinzusätzen in vivo (n=1)*

In diesen Experimenten wurde einem Liter Grapefruitsaft (natürlicherweise 340 mg Naringin ethaltend) die einfache (340 mg) und die doppelte Dosis Naringin (680mg) zugesetzt, um zu sehen ob die Maxima der Naringinelimination noch zu steigern waren.

**Abbildung 25:** Zeitliche Ausscheidung von Naringenin mit 1000 ml Grapefruitsaft als Basis sowie verschiedenen Naringinzusätzen

Nach Gabe von 1l Grapefruit mit 340 mg Naringin fand sich ein Eliminationsmaximum zwischen 6 und 10 Stunden (390 bzw. 393 mmol/min). Dies ließ sich im Experiment, bei dem 1l Grapefruitssaft mit 680 mg Naringin eingenommen wurden, nicht wesentlich steigern (383 bzw. 401 mmol/min zwischen 6 und 10 Stunden). Im Vergleich zum 1l Grapefruitsaftexperiment ohne Zusatz von Naringin, läßt bei diesen Experimenten eine vermehrte Exkretion in den späten Meßintervallen feststellen. Nach Gabe von 1l Grapefruitsaft plus 680 mg Naringinzusatz beträgt die Elimination zwischen 10 und 13 Stunden noch 176 mmol/min Naringenin.

#### *3.4.6 Elimination von Naringenin mit Orangensaft als Vehikel in vivo (n=1)*

Durch den Ersatz von Grapefruitsaft durch Orangensaft als Lösungsmatrix, läßt sich feststellen, daß nun die maximale Naringinelimination zwischen 6-10 Stunden zu finden ist (max: 102 mmol/min).

**Abbildung 26:** Ausscheidung von Naringenin nach Einnahme von 1l Orangensaft plus 340 mg Naringin. Zum Vergleich sind die Experimente, in denen 1l Grapefruitsaft ohne Zusatz und Wasser mit 340 mg Naringin eingenommen wurde, ebenfalls abgebildet.

### 3.4.7 Zusammenfassung

In diesen Versuchen zeigte sich, daß der Beginn der Naringinelimination von der zugegebenen Grapefruitsaftmenge abhängig ist. Die Anwesenheit von Saft fördert vor allem die Ausscheidung im Intervall von 3-10 Stunden. Nach alleiniger Einnahme von Naringin findet sich die Hauptmenge der Elimination erst nach 6-22 Stunden. Durch Erhöhung der Naringindosis (mit Wasser als Solvens) erhöhte sich die Gesamtmenge des eliminierten Naringinins, eine Ausscheidung im Intervall zwischen 3-10 Stunden ließ sich jedoch nicht beobachten. Verwendet man anstatt Wasser Orangensaft als Solvens, beginnt die Elimination schon nach 4 Stunden.

### 3.4.8 Elimination von Naringenin nach 1l Grapefruitsaft als alleiniger Flavanonquelle *in vivo* (n=3)

In diesen Versuchen sollte die Wiederholbarkeit der in den ersten Versuchen erhaltenen Ergebnisse geprüft werden.

**Abbildung 27:** Dargestellt ist die Elimination von Naringenin nach Einnahme von 1 l Grapefruitsaft ohne weitere Zusätze (n=3) Auf der y-Achse ist die Naringinmenge in nmol/min aufgetragen

**Abbildung 27** zeigt, daß die Experimente sich in der quantitativen Ausscheidung voneinander unterscheiden. Bei allen Experimenten erfolgt jedoch die Elimination im Intervall von 3-10 Stunden.

### 3.4.9 Elimination von Naringenin nach Gabe von 340 mg Naringin als alleiniger Flavanonquelle *in vivo* (n=3)

Auch diese Experimente unterschieden sich in der quantitativen Ausscheidung voneinander. Gemeinsam mit der ersten Versuchsreihe ist hier jedoch wieder die Lage der

**Abbildung 28:** Elimination von Naringenin nach Gabe von 340 mg Naringin in Wasser gelöst (n=3). Auf der y-Achse ist die Naringinelimination in nmol/min aufgetragen.

Elimination im Intervall von 6 -22 Stunden (**Abbildung 28**).

#### *3.4.10 Elimination von Naringenin nach Gabe von 1l Orangensaft plus 340 mg Naringin in vivo (n=3)*

**Abbildung 29:** Elimination von Naringenin nach Gabe von 1 l Orangensaft plus 340 mg Naringin (n=3). Auf der y-Achse ist die Naringinmenge in nmol/min aufgetragen.

Auch in den Wiederholungen dieses Experimentes fand sich die maximale Naringinelimination im Intervall von 4-13 Stunden (**Abbildung 29**). In Experiment Nr. 1 war Naringenin schon nach 3 Stunden nachweisbar. Das Maximum war jedoch erst im Intervall von 6-8 Stunden zu finden. In Experiment Nr. 2 erfolgte die Elimination lediglich zwischen 4 und 10 Stunden, mit einem Maximum im Intervall 4-6 Stunden. In Experiment Nr. 3 fand die Elimination von 4 bis 13 Stunden (Maximum im 4-6 Stunden Intervall) statt.

#### *3.4.11 Zusammenfassung*

Die Wiederholung der Experimente zeigte, daß die Ergebnisse der Vorversuche in Bezug auf die Eliminationsintervalle, mit einer frühen Ausscheidung in Anwesenheit von Grapefruitsaft oder auch Orangensaft, reproduzierbar waren. Es fanden sich jedoch Unterschiede in der Ausscheidungsintensität.

### **3.5 Resorption von Grapefruitsaft aus dem Jejunum der Ratte am Beispiel von Naringin**

In der Versuchsreihe, in der Grapefruitsaft mit Rattenjejunum inkubiert wurde, konnte in einigen Experimenten im extraluminalem Medium Naringenin als Peak in der HPLC nachgewiesen werden (innerhalb des linearen Messbereiches war nur Naringin

nachweisbar). Da die Ergebnisse der Messungen außerhalb der Beobachtungsgrenze lagen und somit eine Auswertung nicht möglich war, sind sie hier nicht aufgeführt.

### *3.5.1 Beurteilung des Jejunalpräparates während der Messung*

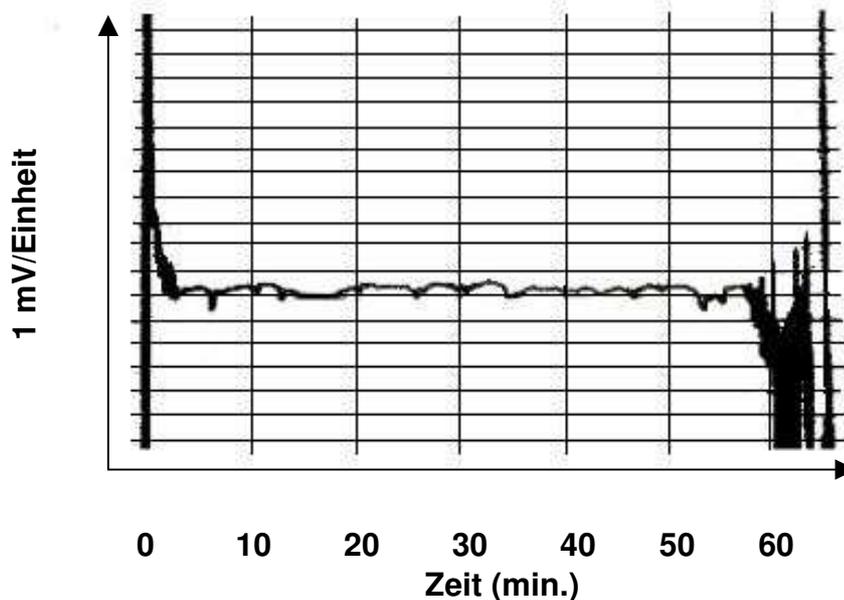
#### *3.5.1.1 Makroskopische Beurteilung des Jejunalpräparats während der Messung*

Das frisch in die Apparatur eingesetzte Darmstück zeigte während der Versuchsdurchführung deutlich eine Gefäßzeichnung. Erst nach ca. 2 Stunden in der Apparatur verblasst diese Zeichnung. Dies gilt nach Norta et al. (1996) als Indiz für die Funktionstüchtigkeit des Präparats. Ihr Verschwinden wird auf die einsetzende Hämolyse zurückgeführt.

Dieses Kriterium ist jedoch eingeschränkt aussagefähig, da in einem Präparat, in dem die Gefäße nicht mehr erkennbar sind, dies auch mit einer Verdünnung des Inhalts der Kapillaren zusammenhängen kann. In der von Norta veröffentlichten Arbeit wurde nicht mit einer physiologischen Lösung gearbeitet, sondern mit einem Tris-Puffer als Lösung für Donor und Akzeptor. Daher kann dieses Kriterium der Vitalität des Präparats in Frage gestellt werden.

#### *3.5.1.2 Veränderungen der transmuralen Potentialdifferenz während der in vitro Resorptionsmessung*

Nach Norta (1996) ist die Stabilität der transmuralen Potentialdifferenz über die Dauer eines Versuches als Indikator für die Stabilität des Epithelverbandes unter besonderer Berücksichtigung der Tight-junctions zu werten.



**Abbildung 30:** Aufzeichnung der transmuralen Potentialdifferenz über eine Stunde am Rattenjejunum. Sowohl Donor als auch Akzeptor erhielten 40 ml physiologische Lösung nach Krebs und Henseleit. Auf der x-Achse ist die Zeit in 10 min Abschnitten, auf der y-Achse die transluminale Potentialdifferenz in Millivolt aufgetragen.

In Kontrollversuchen, bei denen sowohl die Donor- als auch Akzeptorlösung aus physiologischer Lösung nach Krebs-Henseleit bestand, blieb die transmurale Potentialdifferenz über die Dauer des Versuches konstant. **Abbildung 30** zeigt den Verlauf der Potentialdifferenz über eine Stunde.

Um festzustellen, ob sich das Epithel am Ende des Versuches durch Grapefruitsaft als Donorlösung (z.B. durch Nekrosen) verändert hat, wurde nach Beendigung der Versuche der Grapefruitsaft von der Donorseite entfernt und durch physiologische Lösung nach Krebs-Henseleit ersetzt. Die Potentialdifferenz stellte sich in allen Versuchen wieder auf denjenigen Ausgangswert ein, der zu Versuchsbeginn ermittelt wurde.

Nach Beendigung des Versuches wurde mit Krebs-Henseleit'scher Lösung gespült. Danach blieb die transmurale Potentialdifferenz über weitere zwei Stunden stabil, um dann erst nach insgesamt drei Stunden Beobachtungsdauer zusammenzuberechnen.

Die Veränderungen der transmuralen Potentialdifferenzen während der Experimente sind aus **Tabelle 5** zu entnehmen. Wie zu dort zu sehen ist, fällt die Potentialdifferenz bei den 8 Wochen alten Tieren in ähnlicher Weise ab (2.5 bzw. 2.25 mV ). In den Versuchen, in denen die 18 Wochen alten Tiere verwendet wurden, ist der Abfall der Potentialdifferenz mit 3.5 mV größer als bei den jüngeren Tieren.

Versuchsart	0 min.	60 min.	Differenz	Mittelwert der Differenzen
8 Wochen pH 3,2				
Versuch 1	8 mV	6 mV	2 mV	2.5 mV
Versuch 2	8 mV	4 mV	4 mV	
Versuch 3	10 mV	8 mV	2 mV	
Versuch 4	8 mV	6 mV	2 mV	
18 Wochen pH 3,2				
Versuch 1	14 mV	10 mV	4 mV	3.5 mV
Versuch 2	12 mV	8 mV	4 mV	
Versuch 3	14 mV	10 mV	4 mV	
Versuch 4	10 mV	8 mV	2 mV	
8 Wochen pH 6,2				
Versuch 1	8 mV	6 mV	2 mV	2.25 mV
Versuch 2	10 mV	8 mV	2 mV	
Versuch 3	8 mV	6 mV	2 mV	
Versuch 4	8 mV	5 mV	3 mV	

**Tabelle 5:** Transmurale Potentialdifferenzen in den Versuchen am isolierten Rattenjejunum

### 3.5.2 Resorption von Naringin

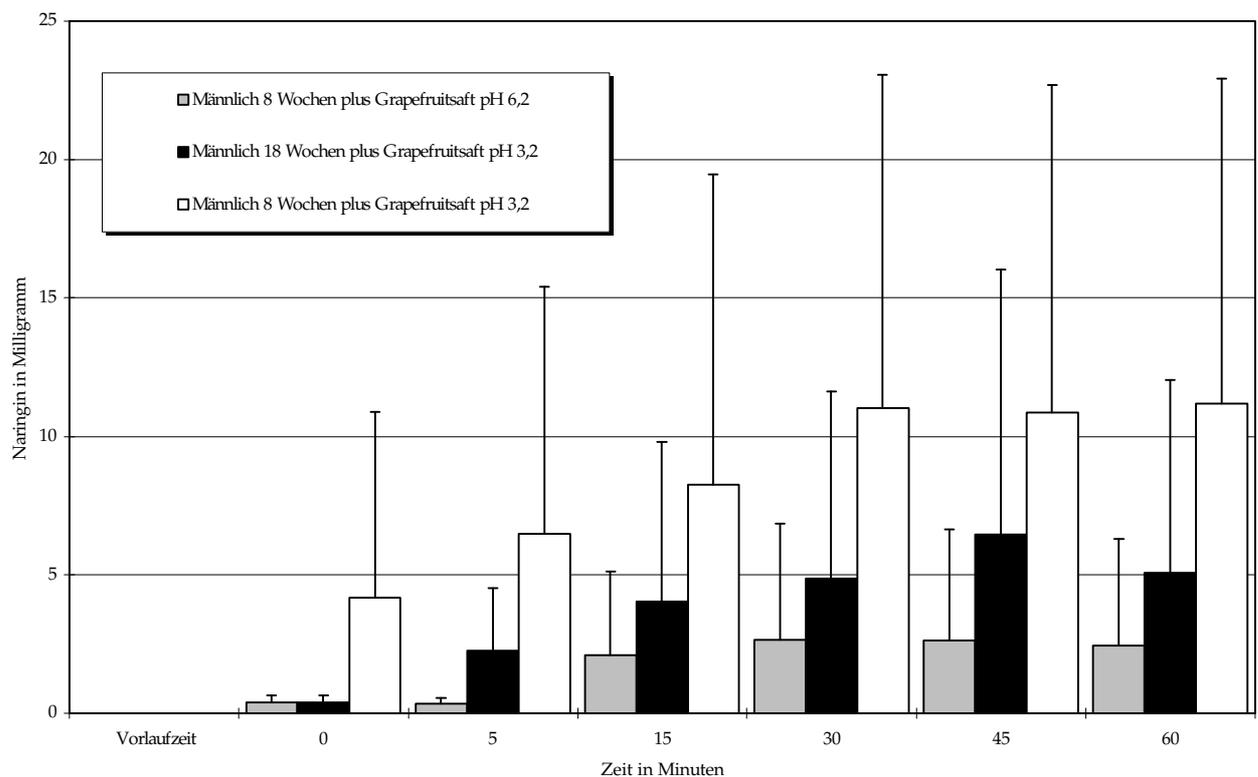
An Därmen von acht Wochen alten Tieren, die mit Grapefruitsaft pH 3.2 durchströmt wurden, ist die Resorption von Naringin am größten. Die extraluminale Konzentration erreicht nach 30 Minuten einen Wert von 11.03 mg Naringin (Gemäß der Formel von Norta et al. bezogen auf 40 ml Akzeptormedium). Die kumulative Menge beträgt nach 60 Minuten 11.20 mg Naringin.

	Männlich 18 Wochen plus Grapefruitsaft pH 3,2	Männlich 8 Wochen plus Grapefruitsaft pH 3,2	Männlich 8 Wochen plus Grapefruitsaft pH 6,2
Vorlaufzeit			
0 min	0.41 mg	4.17 mg	0.40 mg
5 min	2.26 mg	6.48 mg	0.35 mg
15 min	4.05 mg	8.27 mg	2.10 mg
30 min	4.86 mg	11.03 mg	2.65 mg
45 min	6.46 mg	10.86 mg	2.63 mg
60 min	5.08 mg	11.20 mg	2.44 mg
<b>Gesamt(%)</b>	<b>40.49%</b>	<b>89.29%</b>	<b>19.45%</b>

**Tabelle 6:** Es sind die Mittelwerte der auf der Akzeptorseite (extraluminal) gefundenen Mengen an Naringin aufgeführt. Jede Messung wurde viermal ausgeführt. Der Mittelwert der Messungen ist aufgeführt. Siehe dazu auch **Abbildung 30**

Durchströmt man Därme von Tieren des gleichen Alters (8 Wochen) mit Grapefruitsaft mit einem pH von 6,2, was den physiologischen Verhältnissen im Jejunum entspricht, so werden nach einer Stunde Inkubation nur noch 2.44 mg Naringin auf der Akzeptorseite gefunden.

Die Jejunalabschnitte der 18 Wochen alten Tiere, die mit Grapefruitsaft pH 3,2 durchströmt werden, zeigen nach einer Stunde eine Resorptionsleistung von 5.08 mg Naringin. Bei diesen Versuchen schien die Naringinmenge mit Dauer der Inkubationszeit wieder abzunehmen (5.08 mg). Der Höchstwert wurde mit 6.46 mg nach 45 Minuten bestimmt.



**Abbildung 31:** Resorption von Naringin aus dem Grapefruitsaft bei unterschiedlichen pH-Werten, in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Angegeben ist die mit der Formel nach Norta et al. (1996) berechnete Naringinmenge im Akzeptormedium (extraluminal) bezogen auf 40 ml Ausgangsvolumen. Dauer der Vorlaufphase: 5 min.

### 3.5.3 Zusammenfassung

Naringin wird von den Därmen junger Tiere bei einem pH-Wert von 3.2 erheblich besser resorbiert als bei pH 6.4 ( $p < 0.002$ ). Das Alter scheint einen Einfluß auf die Resorptionsleistung zu haben ( $p < 0.01$ ).

Die transmurale Potentialdifferenz verändert sich bei den jungen Tieren nach Inkubation mit Grapefruitsaft pH 3.2 und 6.2 in ähnlicher Weise (Abfall um 2.25 bzw. 2.5 mV).

Den größten Abfall der transmuralen Potentialdifferenz konnte man bei den 18 Wochen alten Tieren beobachten. Die Resorptionsleistung erreicht jedoch nicht die von jungen Tieren bei pH 3.2.

## **4. Diskussion**

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich die Interaktionen von Grapefruitsaft mit Arzneimitteln nicht durch alleinige Wirkung des Naringenins (oder seiner Prodrug Naringin) erklären lassen. Es konnten verschiedene Einflußfaktoren aufgezeigt werden, die sowohl auf die Resorption als auch auf die Elimination der Substanz Einfluß nehmen können.

### **4.1 Untersuchungen zur den Stoffeigenschaften des Grapefruitsaftes**

#### *4.1.1 Pufferwirkung des Saftes*

Da der Grapefruitsaft einen starken Puffer darstellt, wird dies im Dünndarm (insbesondere im Jejunum) dazu führen, daß dort, nach Genuß größerer Mengen Grapefruitsaft (z.B 1 Liter), subphysiologische pH-Werte herrschen. Diese betragen, laut Lentner (1977), im oberen bis mittleren Abschnitt des Dünndarms je nach Lokalisation und Stimulationszustand zwischen pH 5 und pH 8.

Beim Gesunden (Lentner 1977) beträgt die Bikarbonatsekretion des exokrinen Pankreas nach Stimulation durch Secretin (2 I.E. i.v./kg KG) im Mittel bei 76 mmol/l (1 h Sammelzeit). Die maximale Sekretionsrate ist ca. 140 mmol/l bei einer maximalen Bikarbonatausschüttung von 0.9-1.2 mmol/min. Die in einem Liter Grapefruitsaft enthaltenen 180.8 mval Protonen zu neutralisieren, würde also bei maximaler Sekretionsrate des gesunden Pankreas ca. 1½ Stunden dauern. Somit ist also während der Resorption des Naringins in Anwesenheit von Grapefruitsaft als Lösungsmatrix von einem pH-Wert deutlich unter 7 auszugehen.

#### 4.1.2 Verteilungskoeffizient des Naringins

Die Verteilung des Naringin ändert sich je nach verwendetem Trägermedium: mit Saft ist der Verteilungskoeffizient um den Faktor 100 höher als mit Wasser (mit 1-Octanol als Lipidphase). Grapefruitsaft als Träger führt zu einer vermehrten Naringinresorption in die Enterozyten des Darmes. Danach könnte sich eine enzymatische Spaltung in die Wirkform des Naringins, den CYP3A4-Hemmstoff Naringenin oder einen ähnlich wirkenden Metaboliten anschließen (s. 4.1.3 Hydrolyse im Magen).

Teuscher (1997) berichtet, daß sich die Interaktionen und anderen Wirkeigenschaften der Flavonoide nicht allein mit ihrer Hemmwirkung auf den Xenobiotikastoffwechsel (Cytochrom P450) erklären lassen. Eine Hemmung des Metabolismus der Zelle könnte auch an anderen Stellen ansetzen, z. B. ATPase, cAMP-Phosphodiesterase oder der Transkription (s. Abb. 31).

**Abbildung 31:** Dargestellt sind die möglichen Angriffspunkte des Naringenins bzw. des bei der Hydrolyse im Magen entstehenden Metaboliten (MetX) auf die Stoffwechselprozesse des Enterozyten im Dünndarm. DrugX steht für ein gleichzeitig gegebenes, resorbierbares Pharmakon; Pgp steht für P-Glykoprotein, das eventuell am Auswärtstransport von Xenobiotika (DrugX) beteiligt ist; cAMP-PDE für cAMP-Phosphodiesterase

Bourian et al. (1999) vermuten, daß Naringenin auch das P-Glykoprotein, einen unspezifischen Transporter der Darmzelle hemmen könnte, über den der Organismus verschiedenste Xenobiotika eliminiert. Durch einen lösungsvermittelnden Faktor im Saft könnten diese Wirkungen auf Basis der vermehrten Resorption des Flavonoids verstärkt werden.

#### 4.1.3 Hydrolyse des Naringins

Durch die Hydrolyseversuche konnte gezeigt werden, daß Naringin unter dem Einfluß von Salzsäure in einen Metaboliten gespalten wird, der in der HPLC dem Naringenin ähnliche Elutionseigenschaften besitzt. Eine Reaktion dieser Art wird wahrscheinlich im sauren Milieu des Magen ablaufen.

Der dabei entstehende Metabolit könnte mit dem von Ameer et al. (1996) nachgewiesenen identisch sein, obwohl er, verglichen mit Naringin, eine kürzere Retentionszeit besitzt, da in vitro Stoffwechselprozesse fehlen (Glukuronidierung, Sulfatierung), welche die renale Ausscheidung fördern. Ameer beschreibt vier mögliche Metaboliten, die sich in vivo im Urin des Menschen finden lassen: Isokuranetin, Dihydroxy-Monomethoxyflavanon, Monohydroxy-Dimethoxyflavanon sowie das Dihydroxy-Dimethoxyflavanon. Diese Metaboliten können sowohl aus der Metabolisierung von Naringin als auch der von Hesperidin entstammen, was beim Menschen jedoch einen Methylierungsschritt in der Phase-I voraussetzt, der von den Autoren mit einer niedrigen Umsetzungsrate charakterisiert wird. Wie groß die Menge des in vivo methoxylierten Flavons ist und welche Bedeutung dieser Stoffwechselschritt im Rahmen der in anderen Studien beobachteten Arzneimittelinteraktionen ist, bleibt unklar. Erschwert wird die differenzierte Analyse dieses Prozesses durch die Anwesenheit aller vier beschriebenen Metaboliten im Grapefruitsaft, so daß derzeit nur qualitative Aussagen über mögliche Stoffwechselwege getroffen werden können.

#### **4.2 Elimination des Naringin beim Menschen**

Diese Versuche wurden mit einem Probanden durchgeführt, um interindividuelle Variationen, die sich durch divergierende Enzymmuster verschiedener Versuchspersonen ergeben, auszuschalten (Runkel 1996).

Naringin wird beim Menschen als Glukuronid des Naringenins ausgeschieden. Nach Einnahme von 1 Liter Grapefruitsaft zeigt sich eine biphasische Elimination. Die erste Phase im Zeitraum von 4-8 Stunden ist wahrscheinlich für die in der Literatur beschriebenen pharmakologischen Effekte von Bedeutung. Als Beispiel seien hier nur die Erhöhung der Plasmaspiegel besonders in diesem Intervall genannt, die Bailey et al. (1991) bei der gleichzeitigen Einnahme von Felodipin beobachteten.

Nach Einnahme von Naringin in Wasser gelöst, findet die Ausscheidung erst im Intervall von 8-22 Stunden, der zweiten Phase, statt. Dies läßt darauf schließen, daß das Flavonoid entweder langsamer vom Organismus resorbiert oder aber zu einem späteren Zeitpunkt verstoffwechselt wird.

Die frühe Elimination könnte durch die oben (Kap. 4.1.1 und 4.1.2) beschriebenen chemischen Eigenschaften des Saftes zustande kommen. Es liegt nahe, daß auch der Orangensaft partiell solche Eigenschaften besitzt, denn durch Zusatz von Orangensaft konnte ebenfalls die Elimination von Naringenin in ein frühes Intervall von 4-10 Stunden nach Einnahme verschoben werden. Verantwortlich für die Verbesserung der Resorption des Naringins könnten z.B. Derivate sein, die sich von Terpenen oder Saponinen ableiten (Teuscher 1997).

Für das Zustandekommen der zweiten Eliminationsphase gibt es zwei Möglichkeiten: Umverteilungsvorgänge des unkonjugierten Naringenins in verschiedene Kompartimente des Organismus, könnten für eine Verzögerung der Elimination in Form der zweiten Phase verantwortlich sein. Ameer et al. (1996) beschreiben die Anwesenheit von unkonjugiertem Naringenin auf der Erythrozytenmembran in vivo, eine Fraktion, die zunächst dem Metabolismus entzogen wäre.

Die zweite Phase der Naringinelimination, könnte aber auch, bei ausgebliebener Resorption im Jejunum durch bakterielle Zersetzung des Flavanoglykosids während der Dickdarmpassage zustande kommen. Fuhr et al. (1995) beschreiben verschiedene Stämme von Darmbakterien mit der Fähigkeit, die Glykosidbindung des Naringins zu spalten. Der Einfluß der Darmflora auf die Glykosidspaltung von Flavonoiden wurde ebenfalls von Kim et al. (1998) beschrieben. Vor allem die alpha-Rhamnosidase-Aktivität der Darmflora würde hier für eine erhöhte Bioverfügbarkeit des Naringenin sorgen.

Eine Kombination aus beiden Möglichkeiten scheint ebenso denkbar.

### **4.3 Resorption von Grapefruitsaft im isolierten Rattenjejunum**

#### 4.3.1 Nachweis von Naringin und Naringenin im Akzeptormedium

In den Versuchen wurde die Resorption des Naringin nach Inkubation im Rattenjejunum über eine Stunde geprüft. Bei der analytischen Auswertung konnte hauptsächlich eine Resorption von Naringin beobachtet werden. Das in einigen Versuchen im Akzeptormedium in winzigen Konzentrationen beobachtete Naringenin, konnte aufgrund der zu erwartenden Meßungenauigkeit nicht zu Auswertung herangezogen werden. Die in den Versuchen ermittelten hohen Standardabweichungen kamen wahrscheinlich durch unterschiedliche Phänotypen des Enzymmusters der Versuchstiere zustande.

Da Naringenin nur in Spuren nachweisbar war, könnte dies zu einen auf einen glykosidischen Stoffwechselschritt mit geringer enzymatischer Umsatzrate in der Darmwand hinweisen. Denkbar, aber unwahrscheinlich, wäre auch ein sehr schneller Abbau von Naringenin im Enterozyten der Ratte mit der Folge, daß kaum Substanz im Akzeptormedium erscheint.

Am wahrscheinlichsten ist im Zusammenhang mit der (Booth et al., 1958) bei der Ratte beschriebenen renalen Ausscheidung (nach Gabe von Naringenin bzw. Naringin) von p-Cumarsäure und sulfatierter p-Hydroxybenzoesäure, daß das Flavonoid schon im Jejunum einer Phase-I-Metabolisierung unterliegt. Daß auch Ort der Glukuronidierung und Sulfatierung (Phase II) im Jejunum zu finden ist, dafür sprechen Daten über den Stoffwechsel des Quercetin von Crespy et al. (1999). In dieser Arbeit konnten die Phase-I-Metaboliten des Quercetins sowohl nach in situ Perfusion als auch nach Inkubation mit Mikrosomenfraktionen aus jejunalen Enterozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus berichten die Autoren über einen erheblichen Efflux ins Darmlumen der konjugierten Metabolite des Quercetins (64% der glukuronidierten und 36% der sulfatierten Formen). Dies würde den fehlenden Nachweis von Naringenin im Akzeptormedium erklären.

Eine im Enterozyten stattfindende Phase-I-Metabolisierung würde eine weitere Erklärung, für die bei der renalen Ausscheidung in vivo beobachtete (s. Kap. 4.2) frühe Eliminationsphase darstellen.

#### 4.3.2 Faktoren, welche die Resorption des Naringin beeinflussen

Es muß bedacht werden, ob Erkenntnisse über die Elimination einer Substanz Rückschlüsse auf seine Resorption zulassen. Sicherlich gilt das Postulat, daß die eliminierte Substanzmenge auch resorbiert wurde. Eine geringe Resorptionsmenge könnte aber auch durch Verstoffwechslung des Naringin vorgetäuscht werden. Dies könnte eine Begründung für die stark voneinander abweichenden Wiederfindungsquoten von ca. 90% in vitro und <11% in vivo beim Menschen sein. Diese Feststellung wird jedoch relativiert durch folgende Beobachtungen:

Die Auswertung der Naringinresorption am isolierten Darm ergab, daß die Resorption um so größer war, je niedriger der pH-Wert im Donormedium war. Dies könnte, unter anderem, an einer mukosaschädigenden Eigenschaft des Grapefruitsaftes liegen. Eine Mukosaschädigung, aufgrund der im Saft enthaltenen Substanzen, könnte auf einer Chelatorwirkung beruhen. Substanzen aus dem Grapefruitsaft (z.B. Flavonoide) sind offensichtlich in der Lage, den tight junctions der Epithelschicht Calciumionen zu entziehen. Die Eigenschaft der Flavonoide Calciumionen binden zu können, beschreiben Wagener et al. (1992). Der Abfall der transmuralen Potentialdifferenzen ist nach Norta et al. (1996) ein wichtiges Indiz für diese Vermutung, da diese nur bei intakter Enterozytenwand aufrecht erhalten werden kann.

Da der Abfall der transmuralen Potentialdifferenzen jedoch bei den 8 Wochen alten Tieren trotz unterschiedlicher Resorptionsleistungen ähnlich war, muß es noch ein weiteres Prinzip der Resorptionsbeeinflussung im Grapefruitsaft geben.

Es könnte in einer Substanz bestehen, die abhängig vom pH-Wert im Darmlumen in der Lage ist, dem Naringin eine günstigere Konformation (Micellenbildung) zu geben, so daß dieses, oder sein resorbierbarer Metabolit, die Mucosa des Darms leichter überwinden kann. Nach Martin (2000) beträgt der pKs-Wert des Naringenins 6.79. Im sauren Millieu, welches sich durch die Anwesenheit von Grapefruitsaft als Lösungsmatrix ergibt, wären die Bedingungen für die Resorption des nur in kleinen Mengen im Grapefruitsaft enthaltenen Naringenins eingeschränkt.

Da der pKs-Wert des Naringins nach Martin (s.o.) aufgrund der alkoholischen Funktionen der zusätzlich im Molekül vorhandenen Rhamnoglucose niedriger als 6.79

zu vermuten ist, dürfte dessen Resorptionbedingungen im Dünndarm gegenüber dem Naringenin günstiger sein.

Eine weiterer, die parazelluläre Resorption des Naringin beeinflussender Faktor ist das Alter der Versuchstiere. In diesem Zusammenhang muß beachtet werden, daß in Anbetracht der normalen Lebenserwartung einer Ratte von ca. 2 Jahren ein 8 Wochen altes Tier unter Umständen noch nicht die volle Kapazität zur Metabolisierung von Fremdstoffen erlangt hat. An Präparaten von 18 Wochen alten Tieren war trotz stärkerem Abfall der transmuralen Potentialdifferenz die Resorptionsmenge im Vergleich zu der von 8 Wochen alten Tieren geringer, was mit einer stärkeren Ausprägung des Fremdstoffmetabolismus begründet werden könnte. Nach Booth et al. (1958) ist der Organismus der Ratte in der Lage, Naringin zu den Metaboliten p-Cumarsäure und zu sulfatierter p-Hydroxybenzoesäure abzubauen, was nicht weiter verfolgt wurde.

#### **4.4 Abschließende Bemerkungen**

Auch im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Interaktionen von Grapefruitsaft mit Arzneimitteln nicht durch alleinige Wirkung des Naringenins oder seines Prodrug Naringin erklärt werden können. Die Untersuchung der Resorption des Flavonoids im Magen-Darm-Trakt in vitro sowie seine renale Elimination in vivo zeigten Merkmale des Grapefruitsaftes, die bis jetzt noch nicht in klinischen Studien berücksichtigt wurden. Diese, die Resorption des Flavonoids vermittelnden Faktoren (Hydrolyse im Magen, pH-Wert der Lösungsmatrix, Einfluß auf die Permeabilität in organische Phasen sowie Einfluß der Matrix auf die Integrität des Darmepithels), müssen jedoch zur Beschreibung einer geeigneten galenischen Umgebung berücksichtigt werden, damit sich die inhibitorische Potenz des Naringins im Organismus (Leber) optimal nutzen läßt. Die durchgeführten Studien, welche die Wirkpotenz von Naringin mit Grapefruitsaft als Lösungsmatrix mit der von in Wasser gelöstem Naringin (Bailey et al., 1991) verglichen, vernachlässigen die Notwendigkeit eines solchen galenischen Einflusses auf die Resorption des Flavonoids. Aber auch die Verwendung Gelatine kapseln zur Verbesserung der Resorption (Bailey et al., 1992), vernachlässigt die Zwangsläufigkeit der hydrolytischen Spaltung des Prodrugs

Naringin im sauren Milieu des Magens. Durch die Untersuchungen zur Elimination des Naringins in vivo zeigte sich, daß die von manchen Autoren in vivo erwarteten Interaktionen mit verschiedenen Pharmaka wahrscheinlich deshalb ausblieben, weil das Flavonoid zum Zeitpunkt der erwarteten Wechselwirkung noch nicht im Körper verfügbar war. Dies könnte die Erklärung für die aus der Literatur bekannten in-vitro-Interaktion mit P450 (Guengerich et al., 1990) und der fehlenden Interaktion (Bailey 1998) in vivo sein.

**Abbildung 32:** Dargestellt sind die in der Diskussion erläuterten Vorgänge, die zu den Wechselwirkungen von Grapefruitsaft mit Medikamenten führen könnten. Die metabolische Interaktion ergibt sich, wenn das mit Drug bezeichnete Pharmakon sowie Naringenin oder sein unbekannter Metabolit (MetX) gleichzeitig in der Leberzelle vorliegen oder zusammentreffen. Dies verstärkt nochmals die erhöhte Nettoaufnahme des Pharmakons (Drug) infolge gerichteter Ausschleusung von Naringenin/MetX über das P-Glykoprotein (PGP). Dient statt Grapefruitsaft Wasser als Lösungsmatrix werden Naringenin/MetX infolge fehlender Bestandteile der resorptionsfördernden Matrix des Saftes (keine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen) langsamer resorbiert. Die spätere Resorption bedingt die spätere Elimination des Flavonoids. Dies und die mäßige Nettoresorption bedingt das Ausbleiben der metabolischen Interaktionen.

## 5. Zusammenfassung

Das Flavonoid Naringin ist ein Bestandteil des Grapefruitsaftes, dessen biologische Funktion nicht genau bekannt ist. Von seinem Aglykon, dem Naringenin, wurden Hemmwirkungen auf die Enzyme der Phase-I-Reaktionen (insbesondere des Isoenzym CYP4A4 ) beschrieben.

Vorkommen, Nomenklatur, Synthese und Funktion der Flavonoide werden unter besonderer Berücksichtigung des Naringins erläutert. Des weiteren wird auf die, die Resorptionsprozesse im Gastrointestinaltrakt beeinflussende Faktoren und deren Mechanismen eingegangen. Da in der Vergangenheit publizierte Studien hauptsächlich aus Berichten über Interaktionen des Grapefruitsaftes mit verschiedenen Pharmaka bestanden, sollte eine nähere Betrachtung, der für die Interaktion in Betracht kommenden Aspekte, Aufschluß über den möglichen Mechanismus geben.

Die Aufgabenstellung der Arbeit deshalb bestand darin, die Resorption des Grapefruitsaftes in vitro und seine renale Elimination in vivo zu untersuchen, um die Diskrepanz zwischen den in-vitro beobachteten Interaktionen und deren Ausbleiben in vivo zu klären.

Aus den Untersuchungen ließen sich verschiedene Faktoren ermitteln, die die Bioverfügbarkeit des Naringins beeinflussen:

Der Grapefruitsaft besitzt Puffereigenschaften, die eine Einstellung eines subphysiologischen pH-Wertes im Darmtrakt nach Einnahme größerer Mengen des Saftes ermöglichen. Unter Berücksichtigung des pKs-Wertes des des Naringins ist dies der Resorption des Flavonoids förderlich.

Hinzu kommt eine lösungsvermittelnde, pH-unabhängige Eigenschaft des Grapefruitsaftes. Durch Ermittlung des Verteilungskoeffizienten zwischen Grapefruitsaft bzw. Wasser in ein organisches Lösungsmittel (Oktanol) konnte dies aufgezeigt werden.

Naringin wird beim Menschen vorwiegend als Naringeninglukuronid ausgeschieden. Nach Einnahme von purem Grapefruitsaft wird das Flavonon in zwei Eliminationsphasen im Urin gefunden. Die erste Phase (>10 Stunden nach Einnahme) die durch intrinsische Faktoren des Saftes zu entstehen scheint, ist nach solitärer Einnahme von Naringin nicht zu beobachten und wahrscheinlich für das Ausbleiben der Interaktion zwischen den in verschiedenen Pharmaka und in Wasser gelöstem Naringin verantwortlich.

Durch Zusätze von Naringin zum Grapefruitsaft, läßt sich zwar die quantitative Flavononausscheidung vergrößern, die frühe Ausscheidungsphase jedoch nicht. Auch sind niedrigere Saftmengen, denen das zur 1l Dosis fehlende Naringin zugesetzt wurde, nicht dazu in der Lage die Elimination des Flavonoids in der frühen Phase zu bewirken.

Durch Versuche am isolierten Rattenjejunum konnte gezeigt werden, daß der Grapefruitsaft die Eigenschaft besitzt, die transmurale Potentialdifferenz zu senken, was für eine Wirkung an den tight-junctions und somit eine primär parazelluläre Resorption spricht. Dies muß jedoch nicht der einzige Resorptionsweg sein.

Ein weiterer Einflußfaktor für die Naringinresorption war das Alter der Tiere, da die älteren Tiere weniger Flavonon als die jungen Tiere resorbierten. Dies könnte mit der weiteren Ausreifung des Fremdstoffmetabolismus der alten Tiere zusammenhängen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden, daß die Resorption ein wichtiger Faktor zu Beurteilung der pharmakologischen Potenz einer Substanz ist, der in der vorklinischen Beurteilung durch geeignete Untersuchungsmethoden mehr Rechnung getragen werden sollte.

## **6. Literaturverzeichnis**

Arnao MB, Casas JL, del Rio AJ, Acosta M, Garcia- Canovas F (1990)  
An enzymatic colorimetric method of measuring naringin using 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS) in the presence of peroxidase  
Anal. Biochem., 185, 335-338

Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rousseff RL (1996)  
Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration  
Clin. Pharm. Ther., 60, 34- 40

Axelrod J (1955)  
The enzymatic demethylation of epinehrine  
J. Pharm. Exp. Ther., 114, 430- 438

Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JMO (1991)  
Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine  
Lancet, 337, 268- 269

Baker HJ, Lindsey JR, Wisbroth SH (1979)  
The digestive System  
The Laboratory Rat. Volume I: Biology and Deseases  
Academic Press, 77- 83

Booth AN, Jones FT, DeEds F (1958)  
Metabolic and glucosuria studies on Naringin and Phloridzin  
J. Biol. Chem., 233, 280- 282

Brooks BA, McBride OW, Dolphin CT, Farrall M, Scambler PJ, Gonzalez FJ, Idle JR (1988)  
The gene CYP3a encoding p45CN1 (nifedipine oxidase) is tightly linked to the gene COLIA2 encoding collagen type I alpha on /q21-p22.1  
Am. J. Hum. Genet., 43, 280-284

Ciba-Geigy AG (1982)

Wissenschaftliche Tabellen Geigy

Teilband Somatometrie und Biochemie

Ciba-Geigy Limited, Basel, 8.Auflage

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C (1999)

Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen

Am. J. Physiol., 277(1 Pt 1):G120-6

D'Arcy PF, McEllnay JC, Welling PG (1996)

Mechanisms of drug interactions

Handbook of Pharmacology, 122, Springer Verl. Berlin

Diamond JM (1995)

How to be physiological

Nature, 376, 117-118

Delusio JT, Billups NF, Dittert LW, Sgita ET, Swintowsky JV (1969a)

Drug absorption I: An in situ gut technique yielding realistic absorption rates

Pharm. Sci., 36, 1200-1202

Delusio JT, Tan GH, Billups NF, Diamond L (1969b)

Drug absorption II: Effect of fasting on intestinal drug absorption

Pharm. Sc., 58, 1196-1200

Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H (1984)

A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport

Am. J. Physiol., 246, G204-G208

Dibbern HW (1966)

Versuche mit einem in vitro-Modell zur Bestimmung der gastroenteralen Resorptionsquote  
Drug Res., 16, 177

Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ (1995)

Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice  
Clin. Pharmacol. Ther., 57, 485-491

Edwards DJ, Bellevue FH, Woster PM (1996)

Identification of 6',7'- dihydroxybergammin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice  
Drug Metab. Dispos., 24, 1287-1290

Fisher RB, Parsons DS

A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption  
J. Physiol., 110, 36-46

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1992)

Pharmakologie und Toxikologie  
Wissenschaftsverlag Mannheim, 6. Auflage

Fuhr U, Klittich K, Staib H (1993)

Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man  
Br. J. Clin. Pharm. 35: 431-436

Fuhr U, Kummert AL (1995)

The Fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice- drug interactions ?  
Clin. Pharm. Ther., 58 , 365-373

Guengerich FP, Kim DH (1990)

In vitro inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B 1 activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids

Carcinogenesis 11, 2275-2279

Hansch, L (1979)

Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology

John Wiley, New York

Heylings JR (1991)

Gastrointestinal absorption of Paraquat in the isolated mucosa of the rat

Tox. Appl. Pharm., 107, 482-493

Hirsch- Kaufmann M, Schweiger M (1992)

Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler

Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage

Hukkinen SK, Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ (1995)

Plasma concentrations of triazolam are increased by concomitant ingestion of grapefruit juice

Clin. Pharm. Ther., 58, 127-131

Junqueira LC, Carneiro J (1991)

Histologie

Springer Verlag Berlin, 3. Auflage

Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (1998)

Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities

Arch. Pharm. Res, 21(1):17-23

Klingenberg M (1958)

Pigments of rat liver microsomes

Arch. Biochem. Biophys., 75, 376-386

Klinke R, Silbernagl S (1994)

Lehrbuch der Physiologie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Kolars JC, Awni WM, Merion RM, Watkins PB (1991)

First- pass metabolism of cyclosporine by the gut

Lancet, 338, 1488-1499

Kolars JC, Schmiedlin- Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB (1992)

Identification of rifampin- inducible P450III<sub>A4</sub> in human small bowel enterocytes

J. Clin. Invest., 90, 1871-1878

Krebs HA, Henseleit K (1932)

Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper

Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem., 210, 33-66

Kupferschmidt HHT, Ha HR, Ziegler WH, Meier PJ, Krähenbühl S (1995)

Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans

Clin. Pharm. Ther., 58, 20-28

Lange S, Delbro DS, Jennische E (1994)

Evans Blue Permeation of Intestinal Mucosa in the Rat

Scand. J. Gastroenterol., 29, 38-46

Lauterbach F (1975)

Resorption und Sekretion von Arzneistoffen durch die Mukosaepithelien des

Gastrointestinaltraktes

Drug Res., 25, 479-488

Levine RR, McNary WF, Kornguth PJ, LeBlanc R (1970)

Histological reevaluation of everted gut technique for studying intestinal absorption

Eur. J. Pharm., 9, 211-219

Lukie BE, Westergaard H, Dietschy JM (1974)

Validation of a chamber that allows measurement of both tissue uptake rates and unstirred layer thickness in the intestine under conditions of controlled stirring

Gastroenterology, 67, 652

Omura T, Sato R (1964)

The carbon-monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for hemoproteine nature.

J. Biol. Chem., 239, 2370-2377

Moll F (1994)

Biopharmazeutische Untersuchungsverfahren

Wiss. Verl. Ges. Stuttgart

Neef H, Augustijns P, Declercq P, Lackeman G (1996)

Inhibitory effects of galega officinalis on glucose transport across monolayers of human intestinal epithel cells (Caco- 2)

Pharm. Pharmacol. Lett, 6, 86-89

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, GuengerichFP, Estabrook RW, Feyereisenr, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW (1993)

The P450 superfamliy: update on new sequences, gene mapping, avversion numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature

DNA Cell biol., 12, 1-51

Norta M, Schöpke T (1996)

An in vitro perfusion model for the determination of absorption properties of drugs in isolated rat small intestine

Pharmazie, 51, 101-103

The People's Pharmacy (1997)  
The Power of Grapefruit  
<http://www.homearts.com/depts/health/kfpeop54.htm>

Pfeifer S, Pfliegel P, Borchert HH (1995)  
Biopharmazie: Pharmakokinetik- Bioverfügbarkeit- Biotransformation  
Ullstein Mosby Berlin- Wiesbaden, 3. Auflage

Runkel M, Tegtmeier M, Legrum W (1996)  
Metabolic and analytical interactions of grapefruit juice and 1,2- benzopyrone  
(coumarin) in man  
Eur. J. Clin. Pharm., 50, 225-230

Saria A, Lundberg JM (1983)  
Evans Blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular  
permeability in animal tissues  
J. Neurosci. Methods, 8, 41-49

Shah RR (1997)  
The regulatory importance of identifying variability in drug metabolising enzymes in  
the clinical evaluation and registration of new chemical entities  
ISSX Proceedings, 11, 30

Soons PA, Vogels APM, Poosemalen MCM, Schoemaker HC, Uchida E, Boo E,  
Lundahl J, Cohen AF, Breimer DD (1991)  
Grapefruit juice and cimetidine inhibit stereoselective metabolism of nitrendipine in  
humans  
Clin. Pharm. Ther., 50, 394-403

Storch V, Welsch U (1993)  
Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum  
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 21. Auflage, 381-393

Stricker H (1987)

Physikalische Pharmazie

Wiss. Verl. Ges. Stuttgart

Teuscher E (1997)

Biogene Arzneimittel

Wiss. Verl. Ges. Stuttgart, 5. Auflage

Thomas K (1997)

Terfenadin-haltige Antihistaminika wieder verschreibungspflichtig

Deutsches Ärzteblatt, 94, 928

Wagener H. (1992)

Pharmazeutische Biologie Band 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe

Wiss. Verl. Ges. Stuttgart , 5. Auflage

Wilson FA, Dietschy JM (1974)

The intestinal unstirred layer: its surface area and effect on active transport kinetics

Biochem. Biophys. Acta, 363, 112

Wilson H, Wiseman G, (1954)

A new possibility to study drug absorption

J. Physiol. 123, 116

Wulf LW, Nagel CW (1976)

Analysis of phenolic acids and flavonoids by high- pressure- liquid chromatography.

J. Chromatogr., 116, 271-279

Yee GC, Stanley DL, Pessa KLJ, Dalla Cista T, Beltz SE, Ruiz J, Lownthal DT (1995)

Effect of grapefruit juice on blood ciclosporin concentration

Lancet, 345: 955-956

## **7. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Zur Resorption von Naringin aus Grapefruitsaft bei Mensch und Tier“ im Institiut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung Prof. Dr. Wolfgang Legrum ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Der Einfluß von Grapefruitsaft und Orangensaft auf die renale Elimination von Naringin beim Menschen

Krisp A, Runkel M, Legrum W

Archives of Pharmacology Supp 357 No 4 (1998) R172

Renal elimination of naringin in human in vivo and its absorption in the isolated rat jejunum in vitro

Krisp A, Bourian M, Runkel M, Legrum W

Archives of Pharmacology Supp 2 Vol 358 No 1 (1998) R496

Naringenin and interindividual variability in interaction of coumarin with grapefruit juice

Bourian M, Runkel M, Krisp A, Tegtmeier M, Freudenstein J, Legrum W

Exp Toxic Pathol 1999; 51: 289-293

Marburg, den

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich bei Prof. Legrum für die Überlassung des Themas und seine ständige Bereitschaft Probleme und Ideen zu diskutieren bedanken. Herrn Weng Tan danke für seine Unterstützung bei der Methodenverfeinerung der Resorptionsversuche am Rattendarm. Herrn Dr. Michael Runkel danke ich für seine Anleitung zur Messung der Proben mittels HPLC. Herrn Priv. Doz. Edmund Maser danke dafür, daß ich einen Teil der Probenauswertung mit den Geräten seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Herrn Dr. Hans Jörg Martin danke ich für die Auskunft über den pKs-Wert des Naringins. Ich bedanke mich bei meinen Eltern Ursula und Martin Krisp und meinem Bruder Mathias für die Unterstützung während der Studienzeit. Mein größter Dank gilt jedoch meiner Frau Andrea, dem wunderbarsten Menschen in meinem Leben.

**9. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Arnold, Baum, Barth, Basler, Doss, Effendy, Engel, Feuser, Gotzen, Grzeschik, Griss, Happle, Hartmann, Hesse, Joseph, Hoffmann, Junge, Kern Klenk, Klose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Krause, Kuhn, Lennartz, Lippert, Löffler, Maisch, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Noll, Oertel, Remschmidt, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schüffel, Schnabel, Schulz, Seybert, Steiniger, Vohland, Voigt, Wiechert, Werner, Wolf