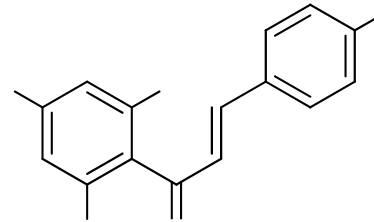
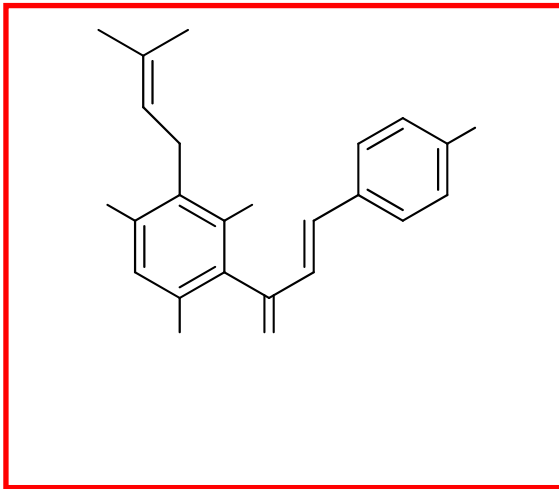
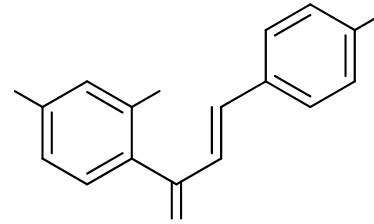
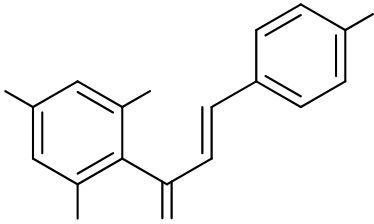


Die Analyse von Xanthohumol in biologischen Matrices

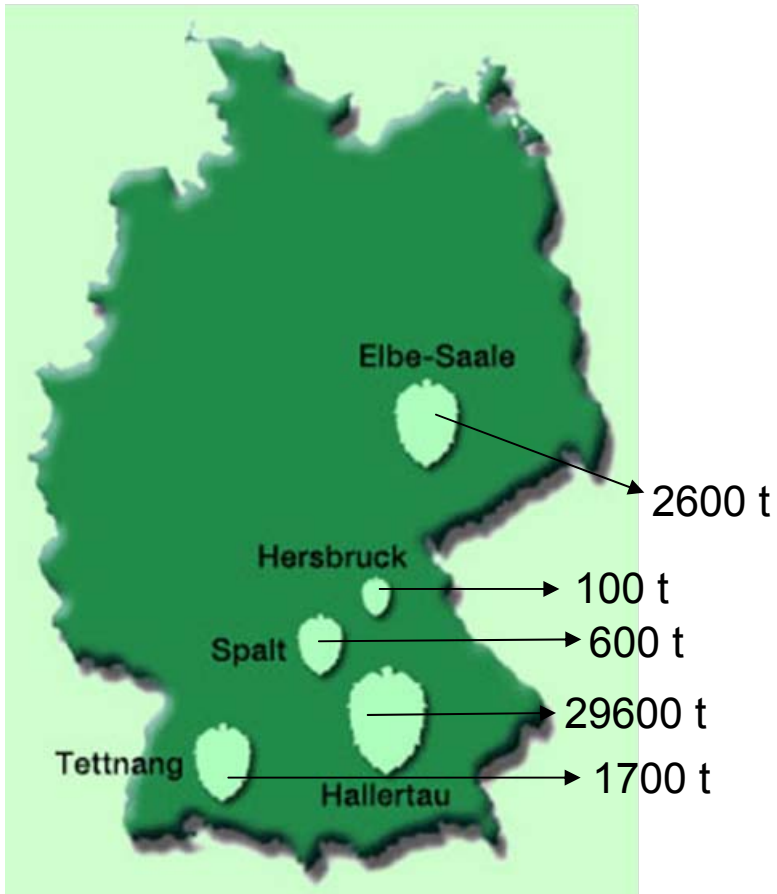
DPHG-Jahrestagung,
Braunschweig, 6.10.2010

Chalcone: Vorkommen und Bedeutung

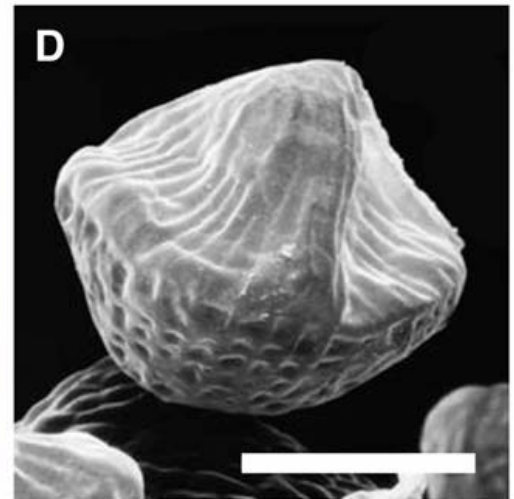
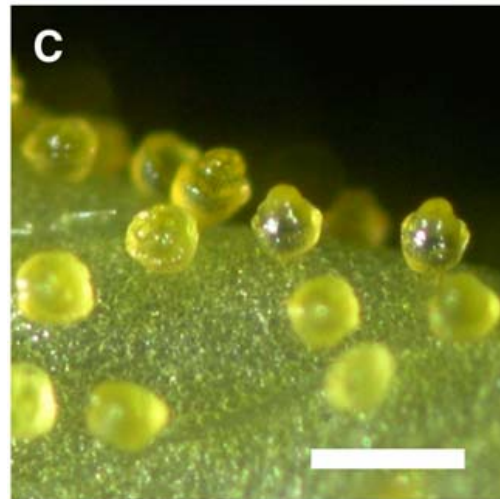
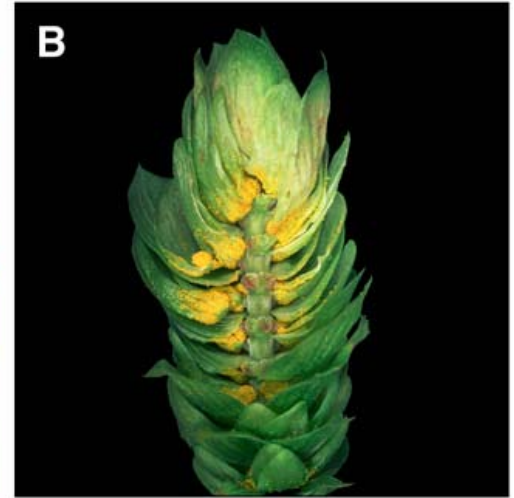


Hopfen (*Humulus lupulus*)

2005

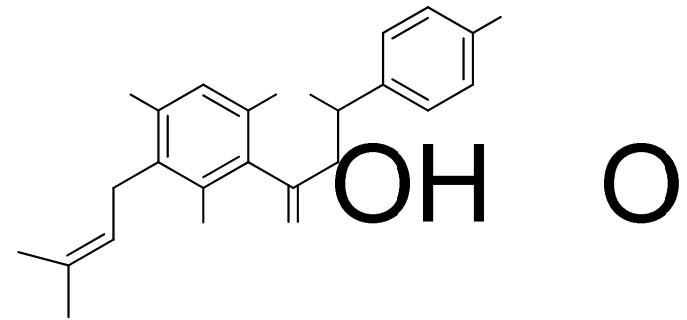
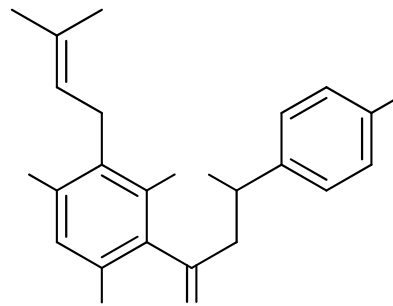
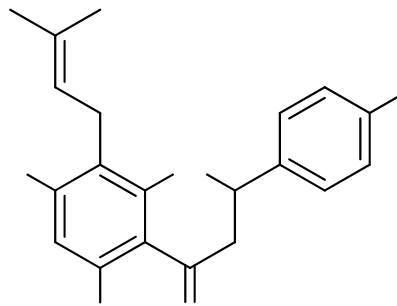
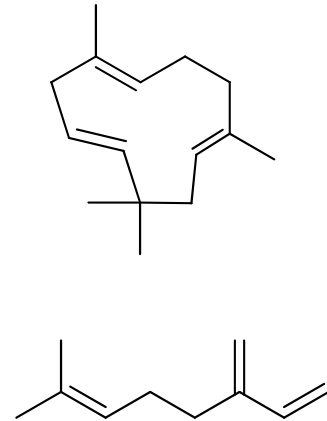
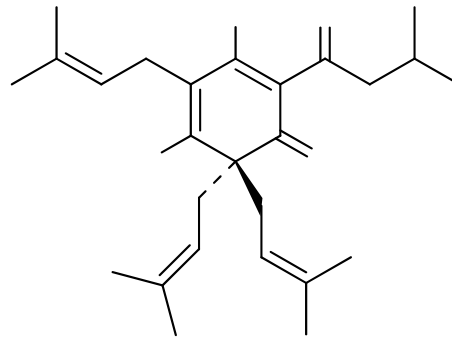
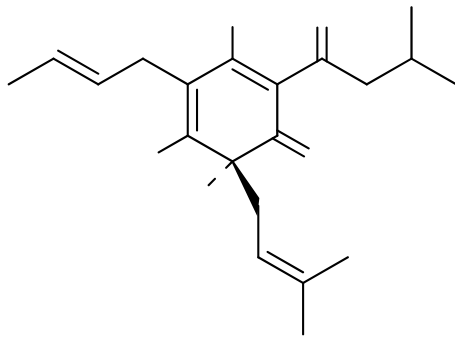


Hopfenanbaugebiete in Deutschland

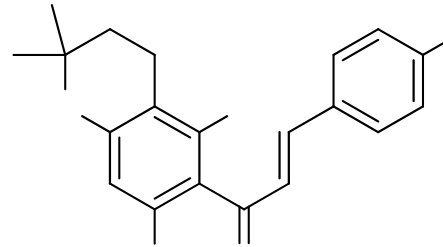
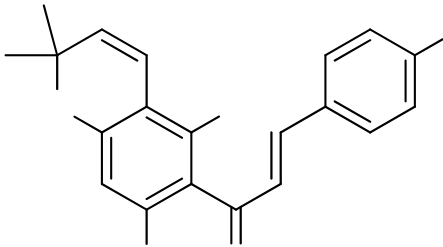
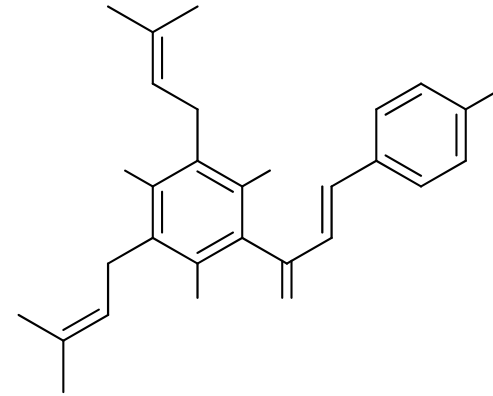
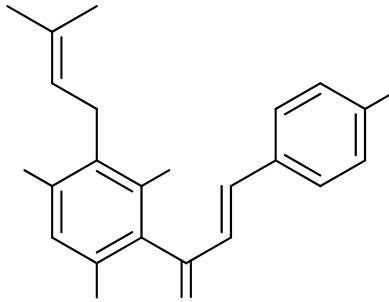
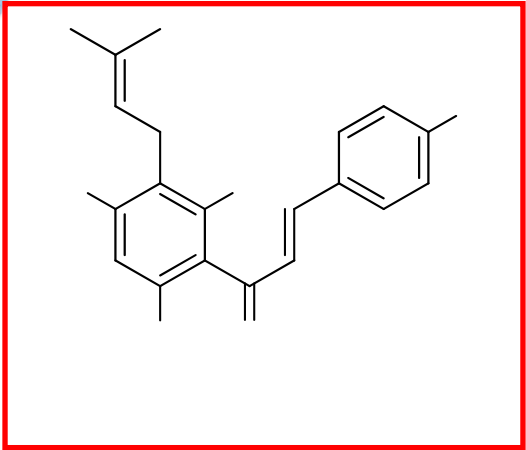


Nagel *et al.*, 2008

Sekundärstoffe in Hopfen I



Sekundärstoffe in Hopfen II



1.) In-vitro Toxizität und Induktion von Apoptose in Tumorzellen

IC₅₀ Werte:

Koloncarcinom:	~ 4 µM
Brustkrebszellen:	~ 20 µM
Prostatakrebszellen:	~13 µM

2.) Hemmung von Transkriptionsfaktoren: NF-κB

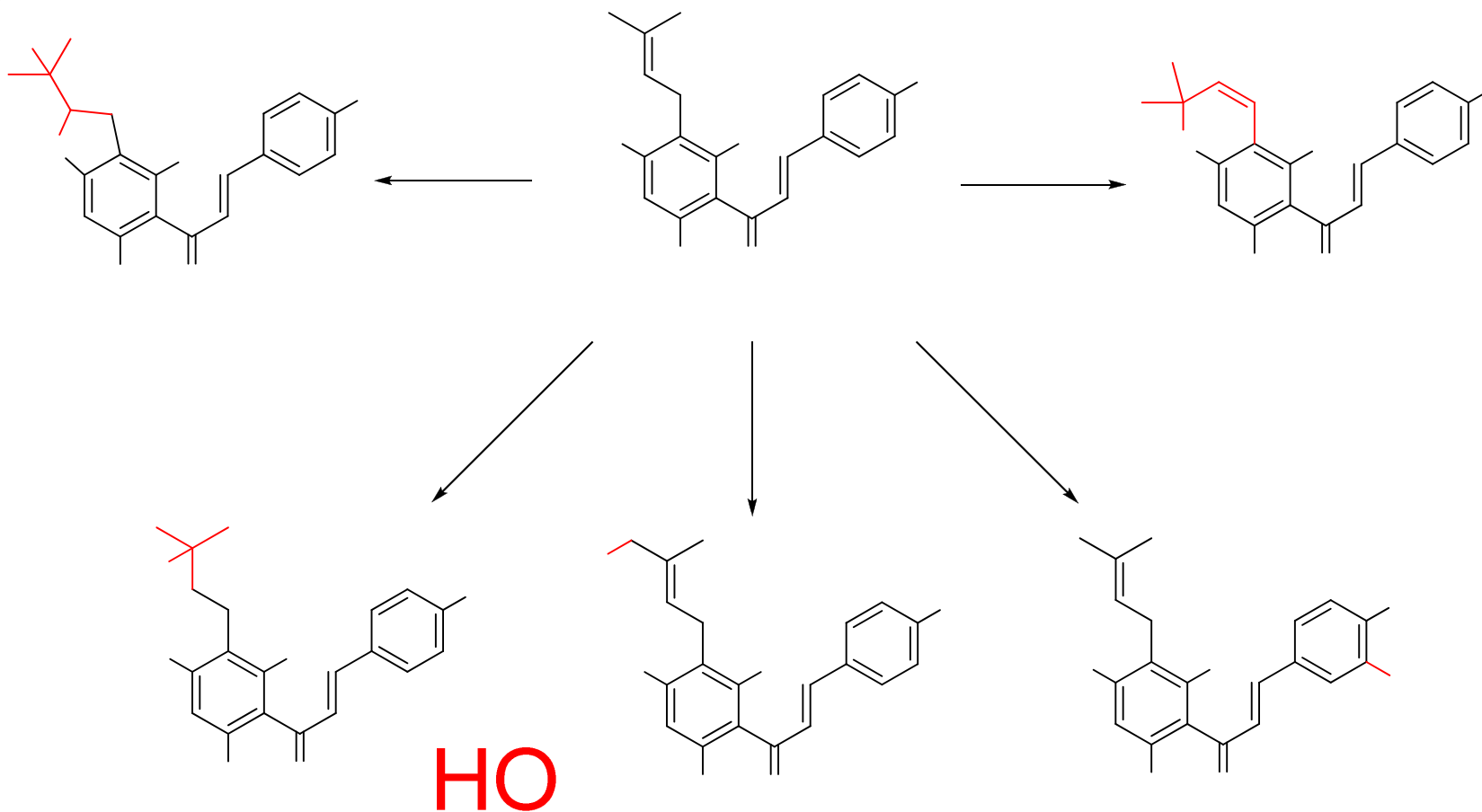
3.) Chemopreventive Effekte (*in vivo* und *in vitro*)

Chalkon- und Flavonoidgehalt in Bier

Prenylflavonoid contents in hops and beer measured by LC-MS/MS [adapted from (Stevens et al., 1999b)]

	Xanthohumol	Isoxanthohumol	8-Prenylnaringenin	Desmethylxanthohumol
Hop cones (% dry wt):	0.48 ^a	0.008	0.002	0.12
Beer (µg/L) ^b :	Xanthohumol	Isoxanthohumol	8-Prenylnaringenin ^d	Total ^e
US major brand				
Lager/pilsner	34	500	13	590
Lager/pilsner	9	680	14	750
Lager/pilsner	14	400	17	460
Lager/pilsner	–	–	–	–
Northwest/US microbrews				
American porter	690	1330	240	2900
American hefeweizen	5	300	8	330
Strong ale	240	3440	110	4000
India pale ale	160	800	39	1160
Imported beers				
European stout	340	2100	69	2680
European lager	2	40	1	43
European pilsner	28	570	21	680
European pilsner	12	1060	8	1100
Other				
Non-alcohol beer	3	110	3	120

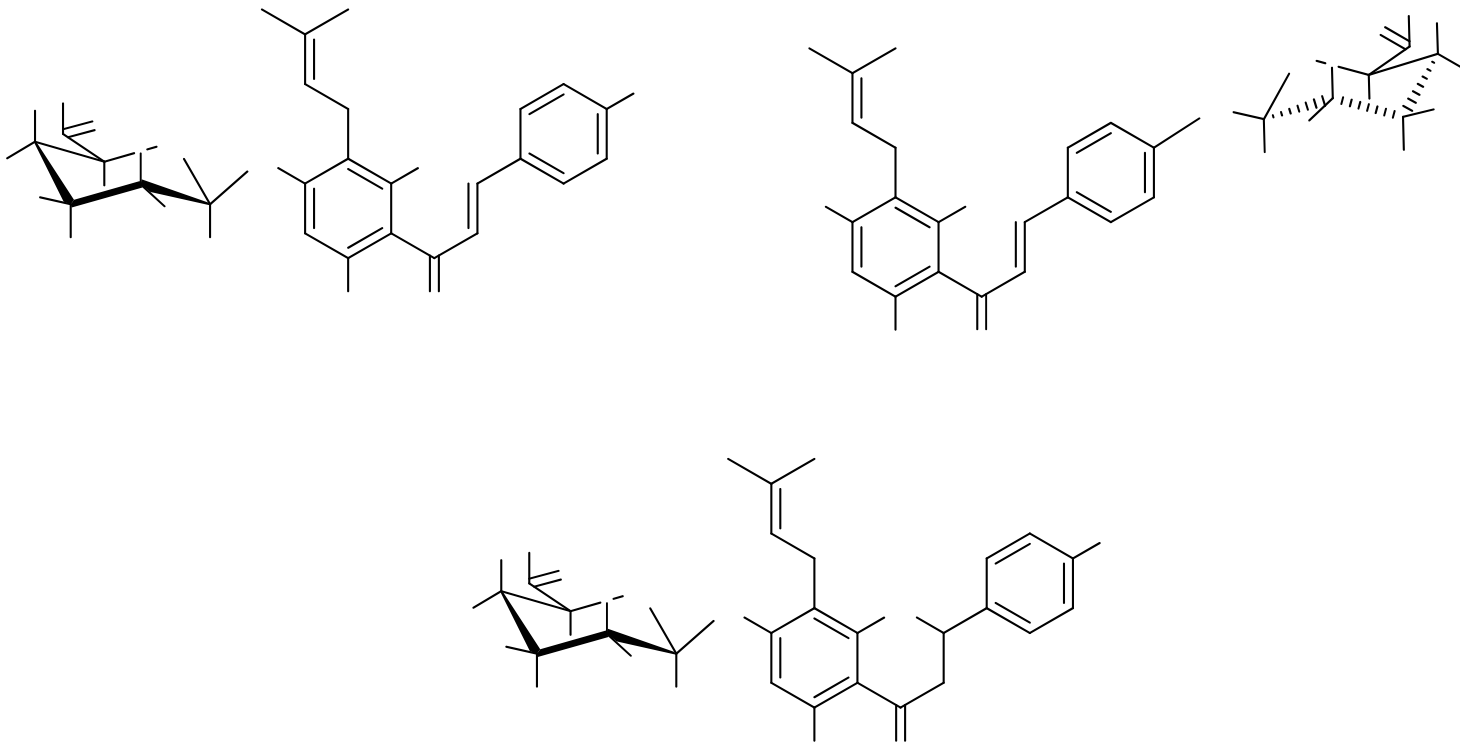
Metabolismus von Xanthohumol *in-vitro* (Phase I)



Nookandeh *et al.*, 2004
Nikolic *et al.*, 2005

Metabolismus von Xanthohumol

In-vitro/in-vivo (Phase II)

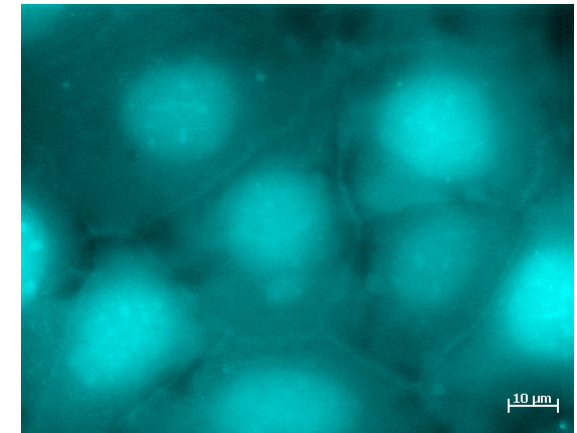
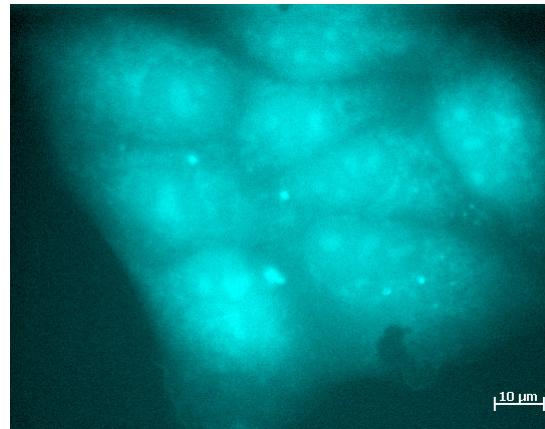
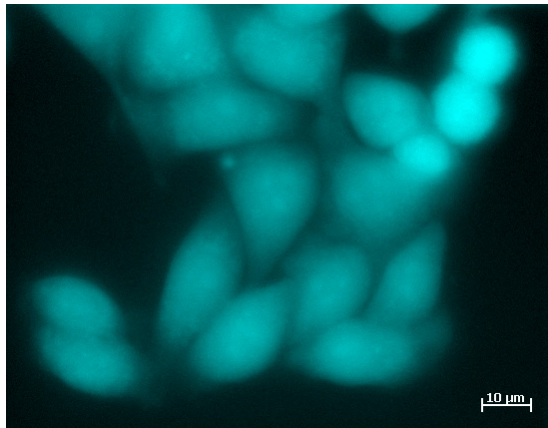
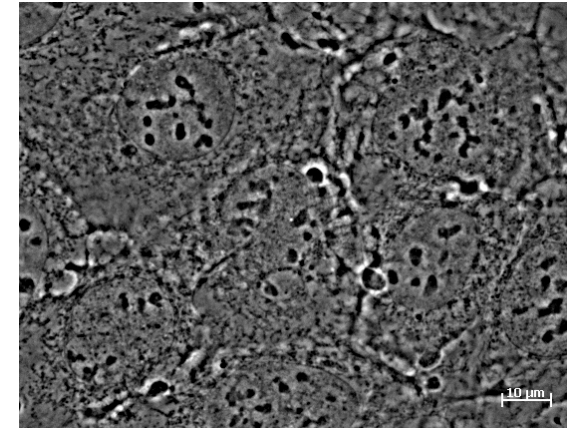
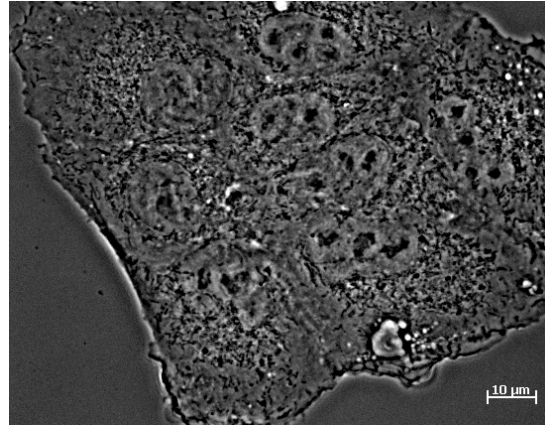
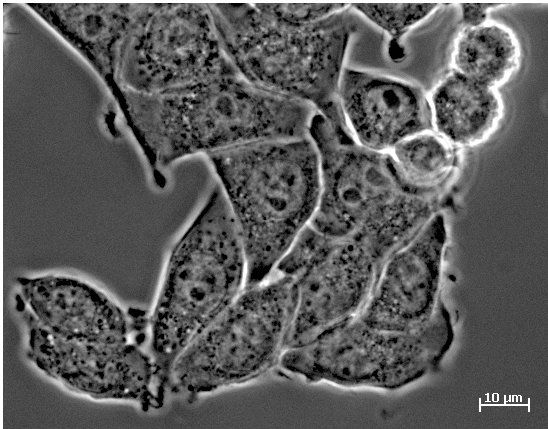


+ Diglucuronide + Sulfate + gemischte Glucuronide/Sulfate (unpublished)

1. **Zelluläre Aufnahme und Metabolismus**
2. **Analyse der in-vivo Metabolisierung unter Berücksichtigung**
 - a.) der Konzentrationen von Phase II Metaboliten in den verschiedenen Geweben
 - b.) der Dauer der Applikation und der applizierten Dosis
 - c.) eines Matrix-Effektes (Applikation der Reinsubstanz im Vergleich zum Extrakt)

Resultate aus der Literatur zu 2: freies Xanthohumol im Serum detektierbar an der Nachweisgrenze, konjugiertes nicht gemessen

Nachweis mittels Life Cell Imaging



Huh 7

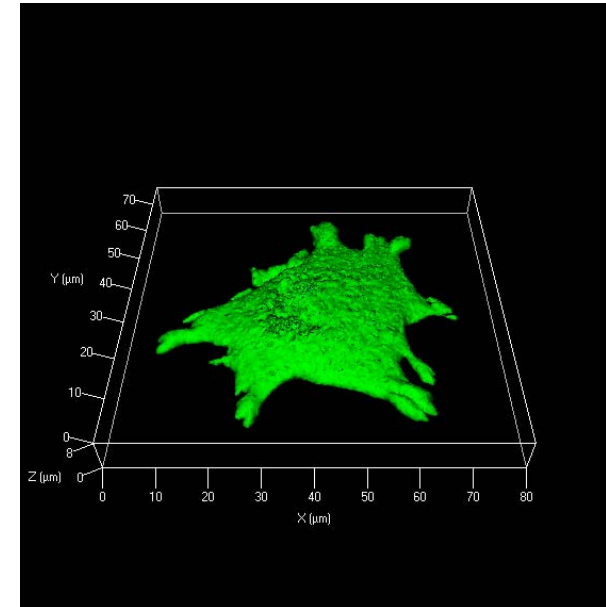
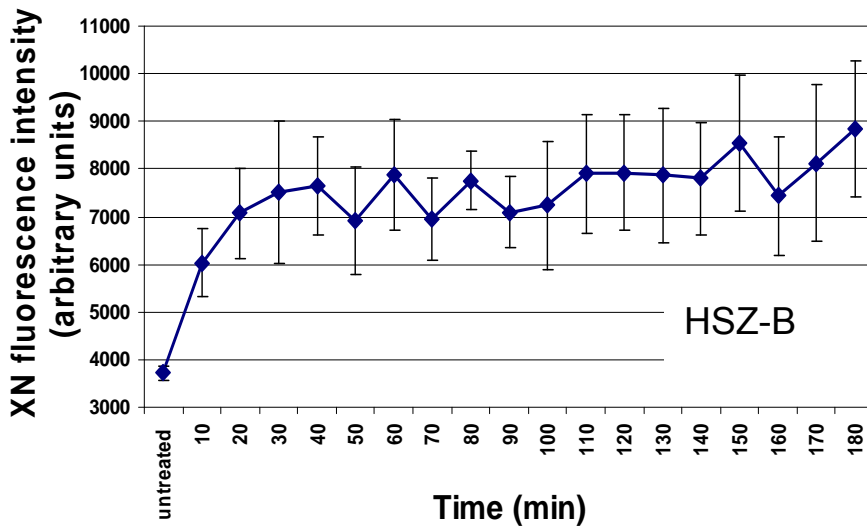
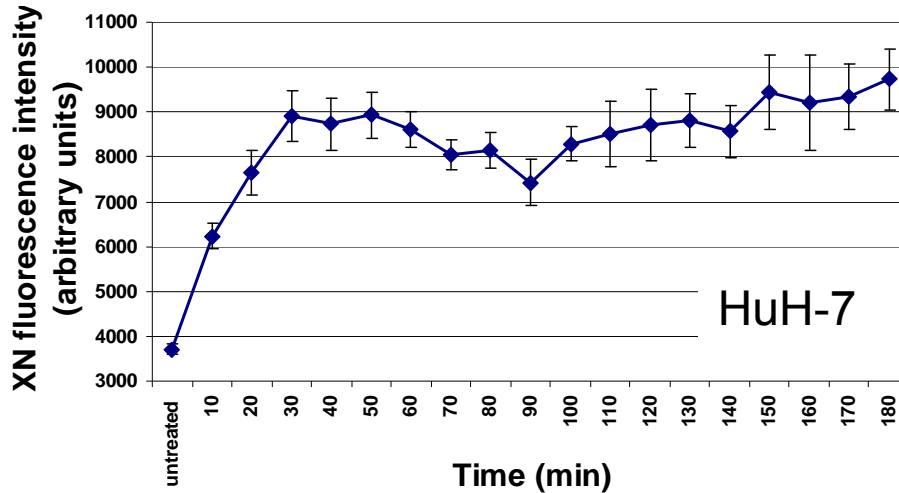
HSZ-B

Caco-2

Cell Observer (Zeiss Axiovert)

Zelluläre Aufnahme (Kinetik)

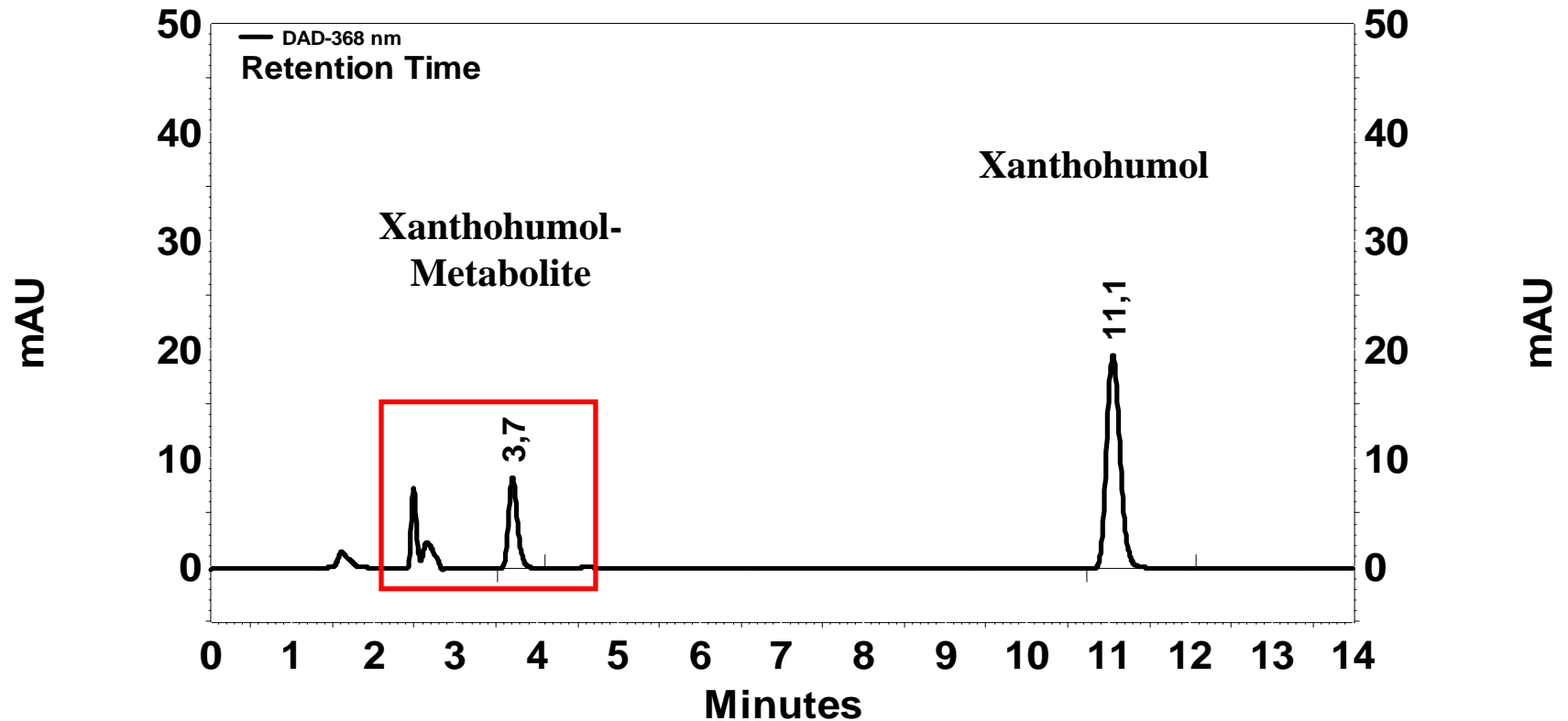
Inkubation der Zellen mit 10 μM XN für 3 h



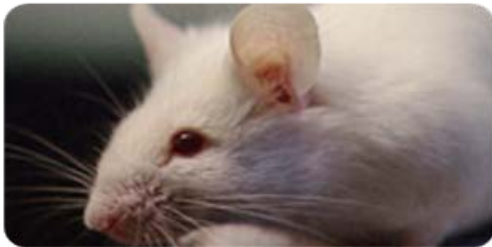
Kalkulation des Zellvolumens

Zellspezifische Anreicherung:
Faktor 2 bis 60 aber nicht korreliert mit der Toxizität gegenüber der Zelllinie

Extraktion des Zellinhaltes und HPLC Analyse



Modell: BALB/c Mäuse (Albino-Laborstamm der Hausmaus)

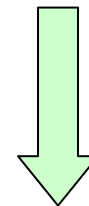


- Leber
- Serum
- Urin
- Fäces
- Galle

XN 73% in phenolischer Matrix, 3 und 7 Tage

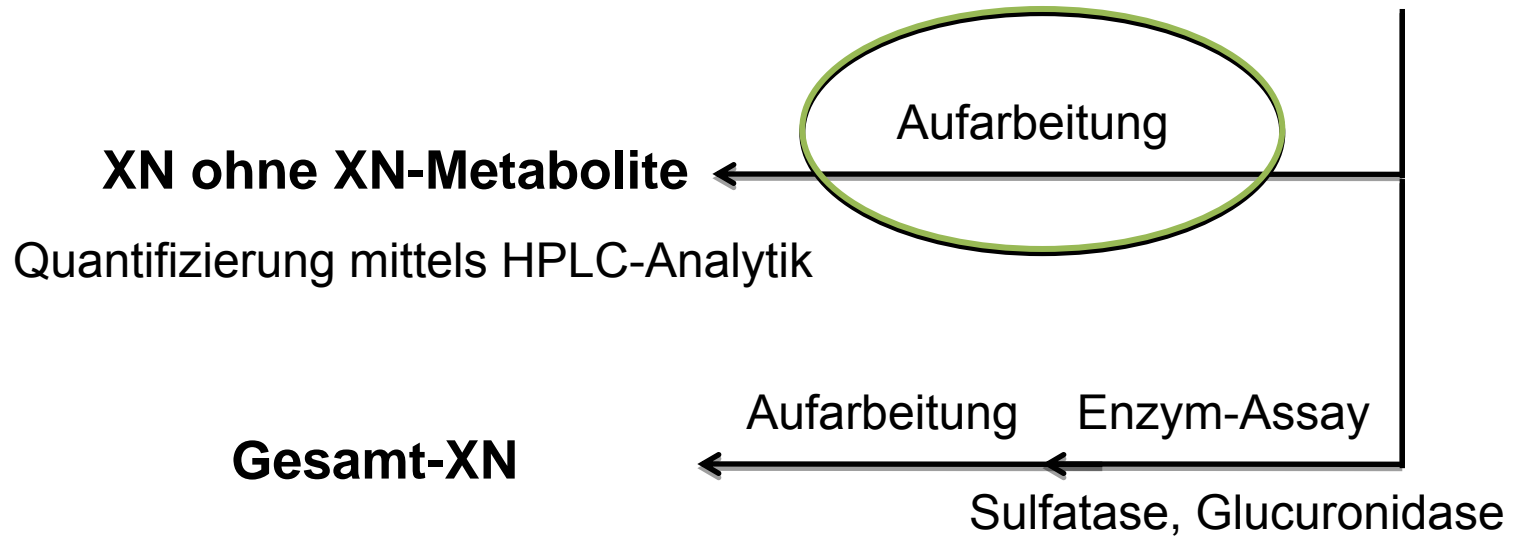
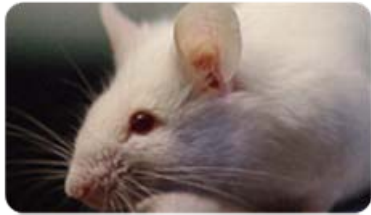
XN >98% , 3 und 7 Tage

Je 0,05, 0,25 und 0,5% in der Nahrung



Aufarbeitung der Proben

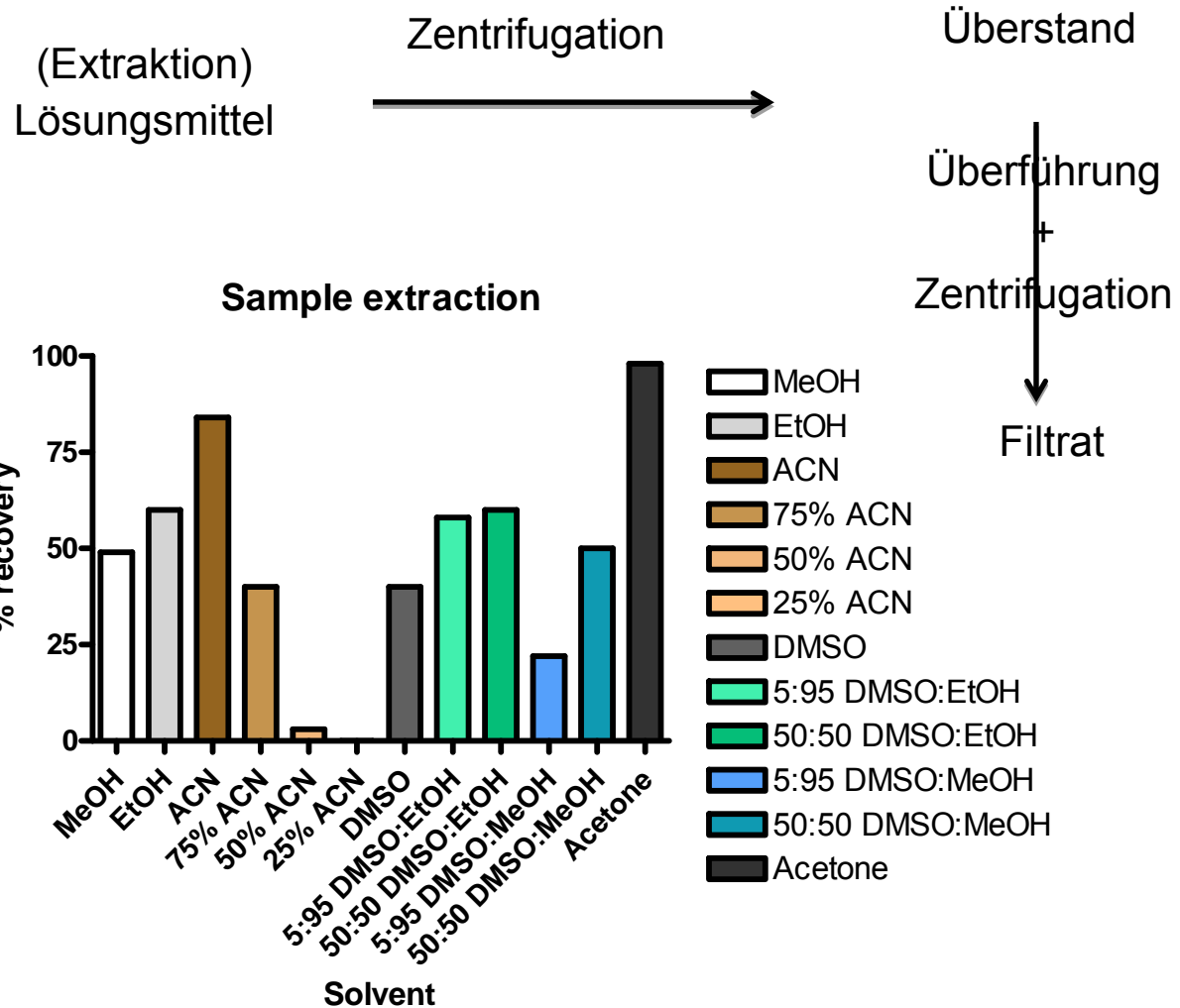
Aufarbeitungsschema



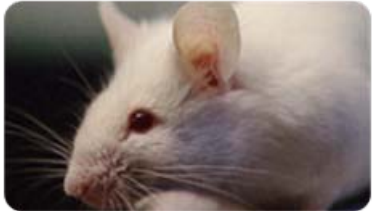
Proben-Aufarbeitung



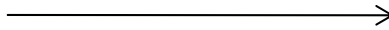
Homogenisiert in
Na-acetat-Puffer



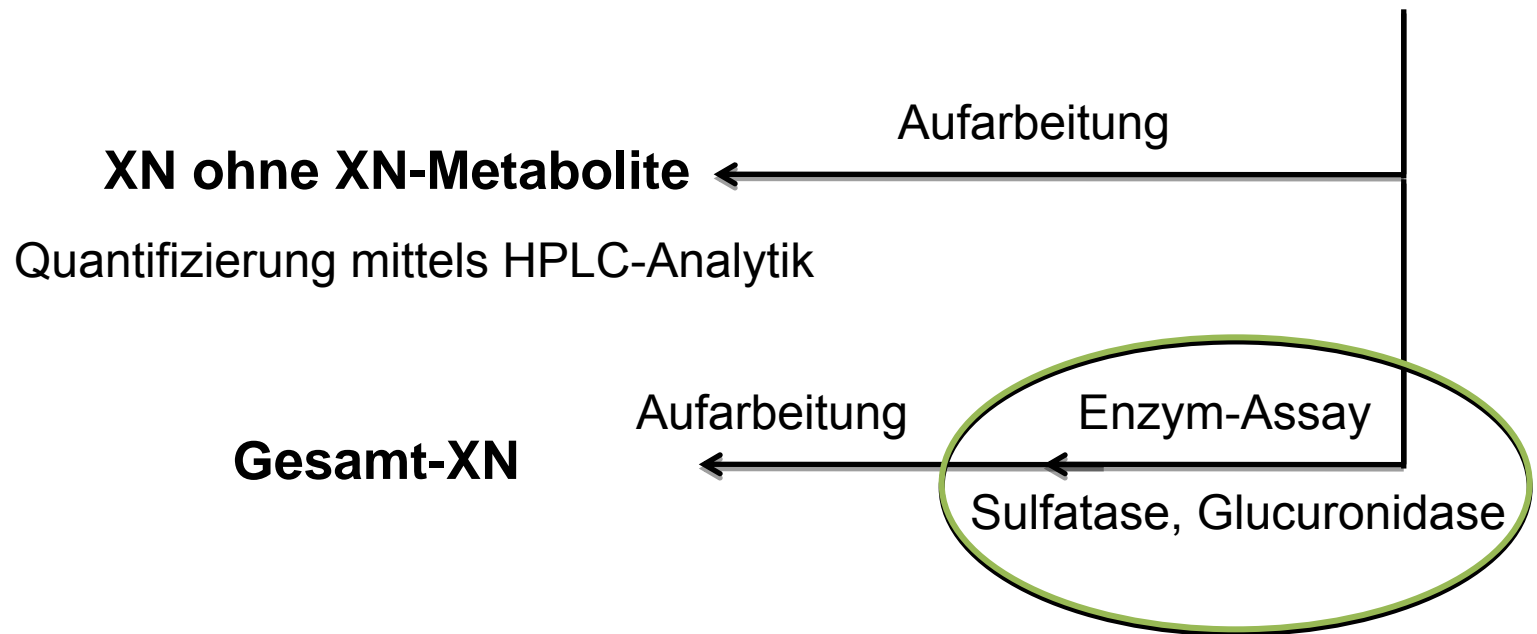
Literaturempfehlung MeOH fragwürdig



+



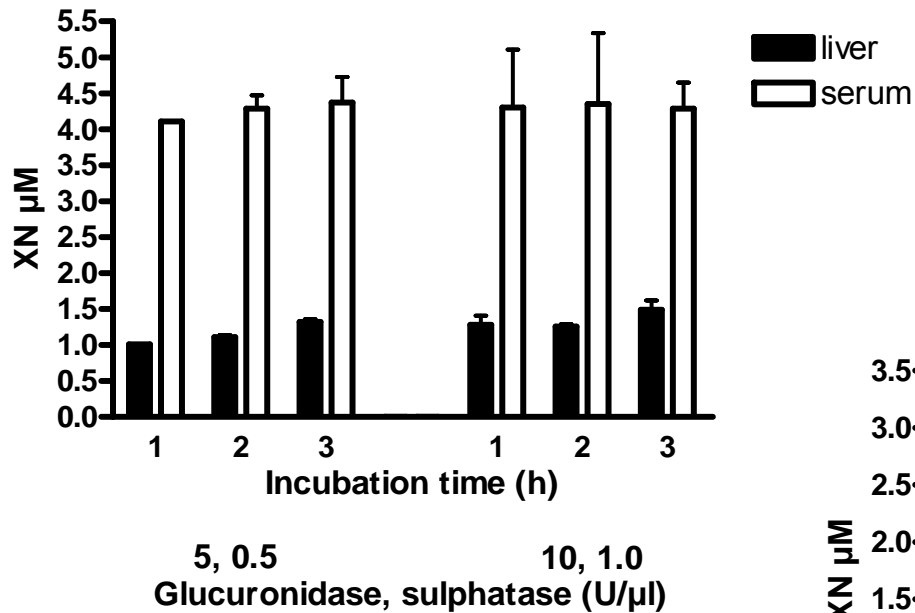
Probe



Spaltung der Phase II Metabolite

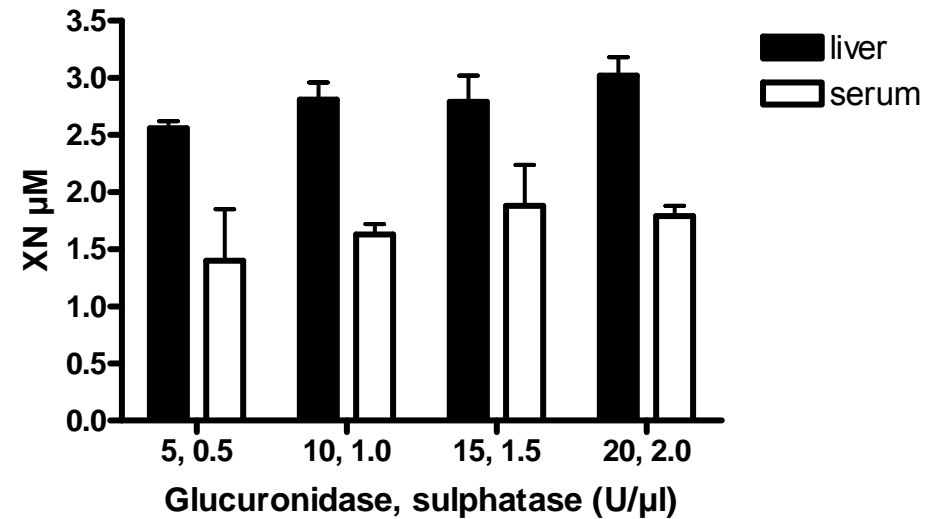
Zeitoptimierung

A



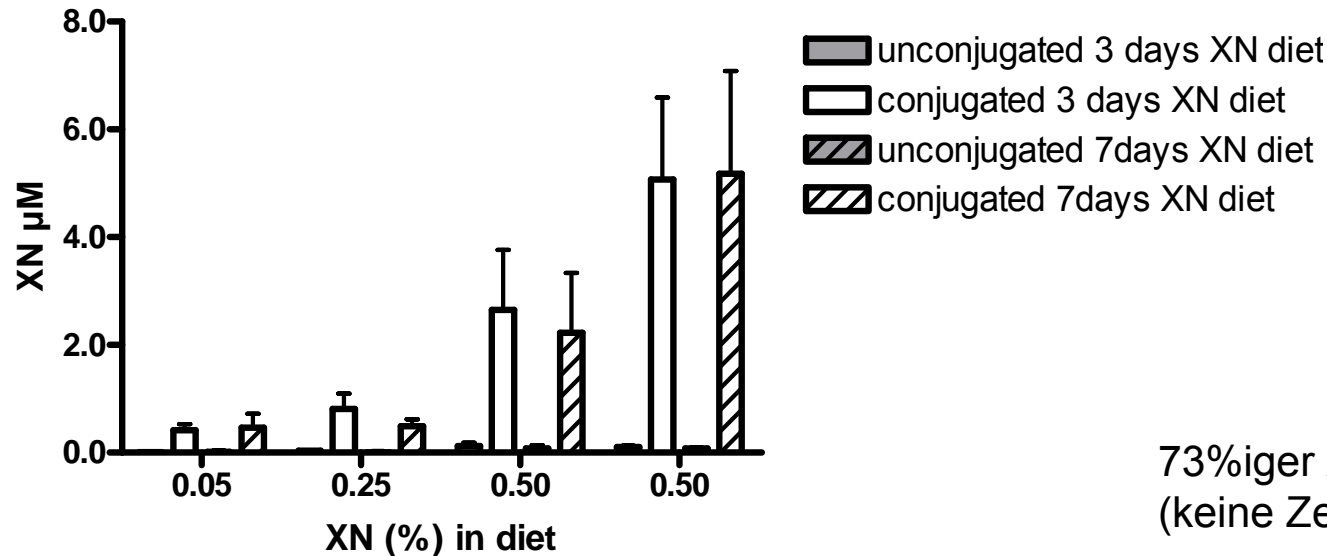
Enzymoptimierung

B



Dosisfindung für die Fütterungsversuche

Serum



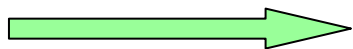
73%iger XN-Extrakt
(keine Zeichen von Toxizität)

Freies XN im Serum irrelevant

Konjugiertes XN in pharmakologisch relevanten Konzentrationen nachweisbar

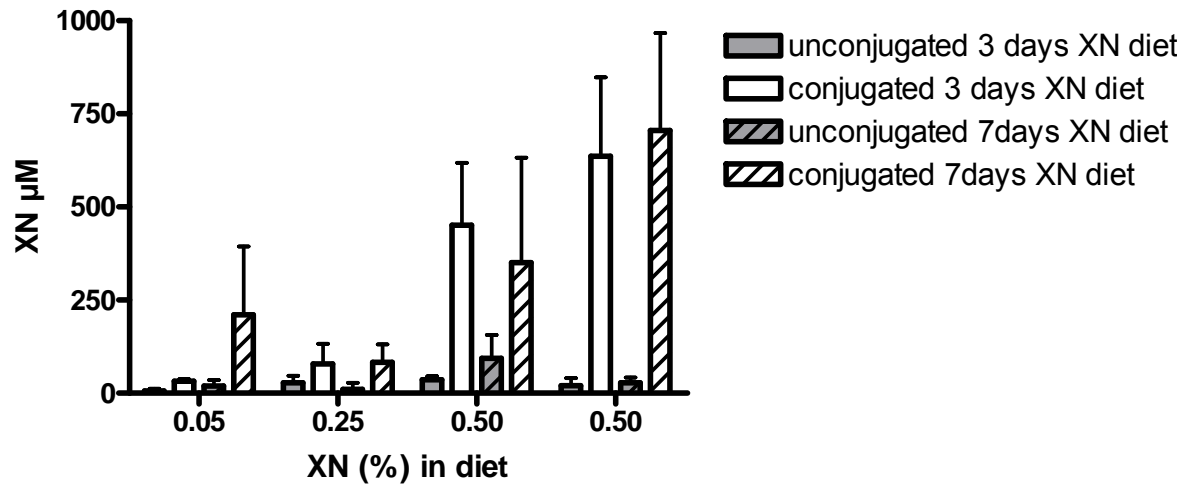
Dosis ist nicht linear korreliert mit den Serum Spiegeln

Keine signifikanten Unterschiede in der 3 und 7 Tage Gruppe

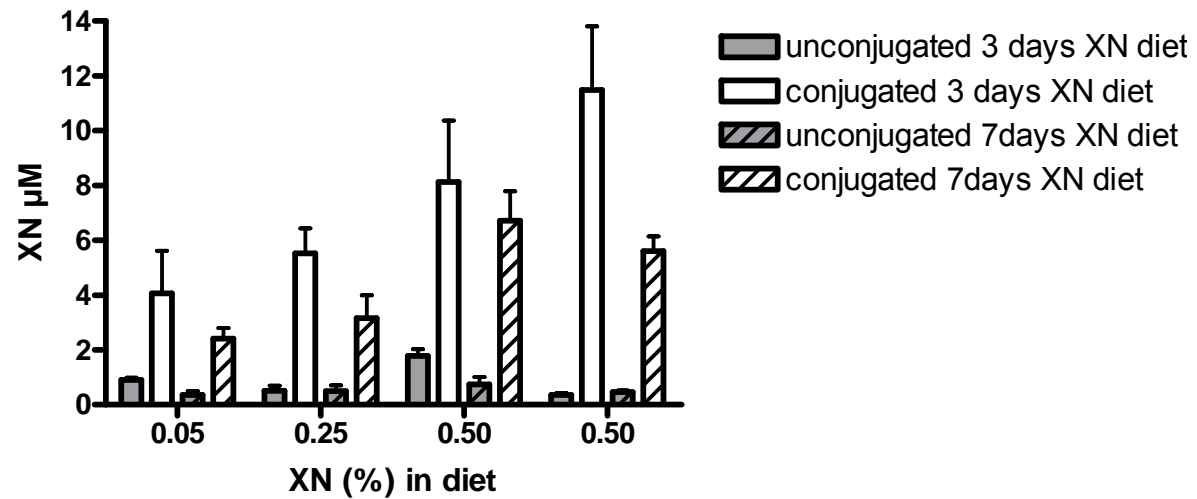


Dosisfindungsstudien bei Chalconen notwendig

Urine



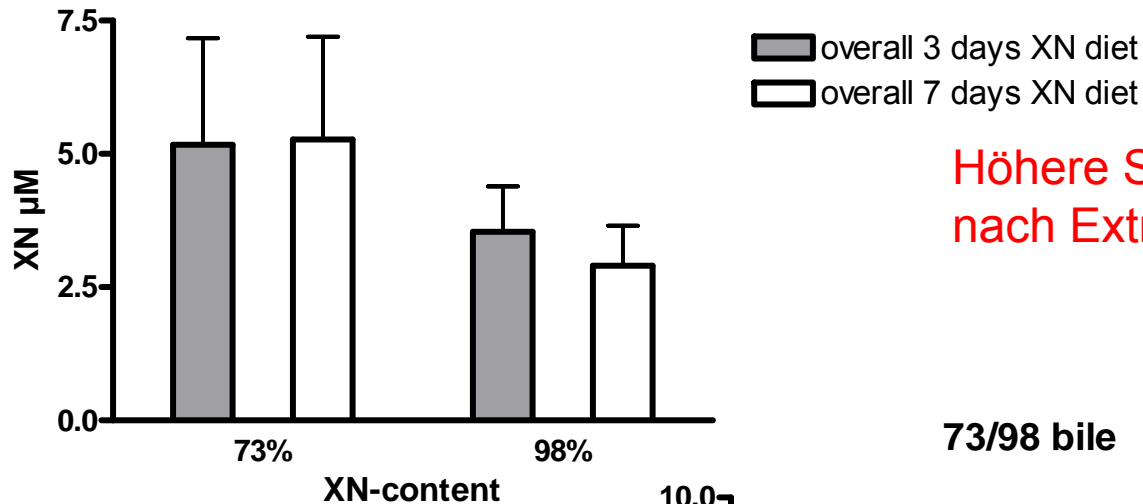
Liver



Verteilung von XN

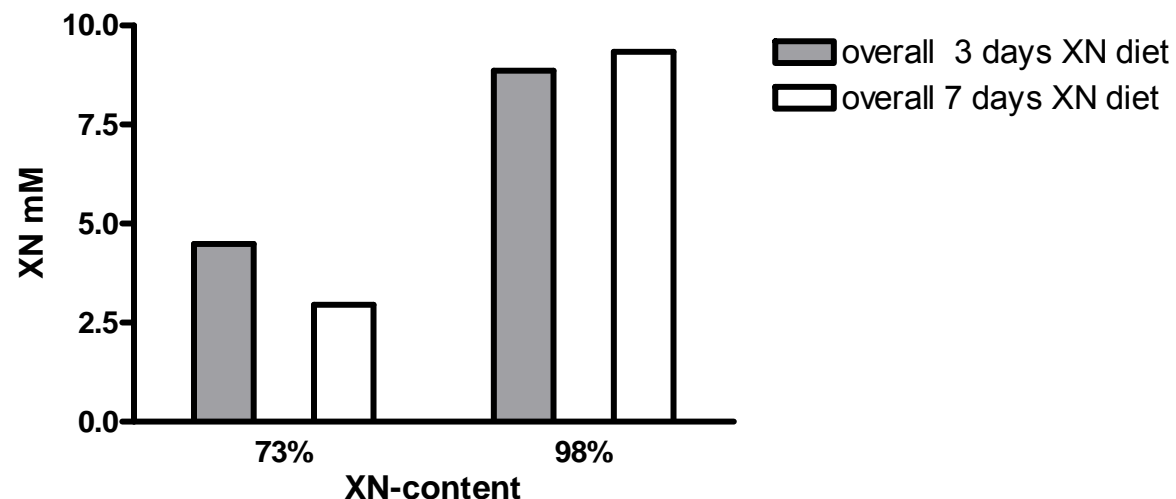
0,5% XN in der Nahrung

73/98 serum



Höhere Serumspiegel
nach Extrakt Applikation!!

73/98 bile

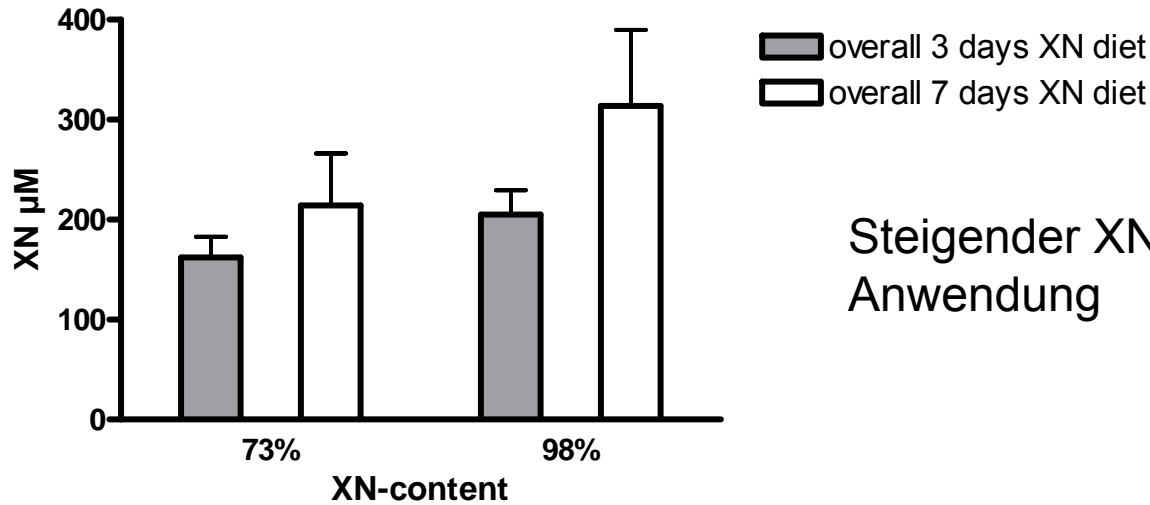


Anreicherung in der Galle
 Unkonjugiertes XN irrelevant
 Höhere Gallenspiegel
 bei der Reinsubstanz

Matrix beeinflusst Exkretion und Verteilung!!

Verteilung von XN

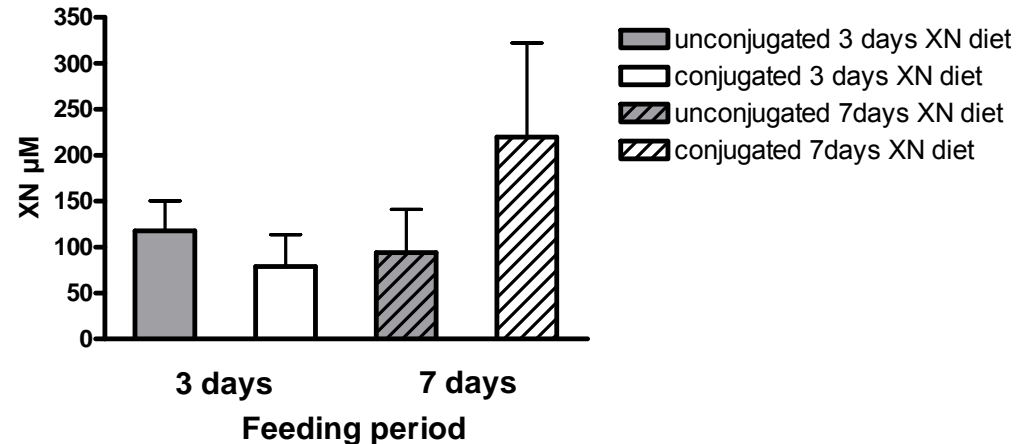
73/98 faeces



Steigender XN Gehalt mit längerer Anwendung

Hoher Anteil an freiem XN

Faeces



Induktion eines entero-hepatischen Kreislaufs?

1. Aufarbeitung der biologischen Proben
 - a.) Extraktion aus der Matrix optimierbar
 - b.) Enzymatische Konjugat-Spaltung optimierbar
2. Freies XN in irrelevanten Konzentrationen vorhanden,
Phase II Konjugate auch bei den Chalconen von größerer Bedeutung
3. Serumspiegel nach Applikation des Extraktes höher als bei der
Reinsubstanz (Matrix-Effekt)
4. Extraktgabe verändert auch die Substanzverteilung in den Geweben

Danksagung

Prof. Dr. Claus Hellerbrand (Innere Medizin Universitätsklinikum Regensburg)

Dr. Birgit Kraus (Pharmazeutische Biologie Universität Regensburg)

Dr. Christoph Dorn (Innere Medizin Universitätsklinikum Regensburg)

Dr. M. Gehrig (Nateco)

Magdalena Motyl (Pharmazeutische Biologie Universität Regensburg)



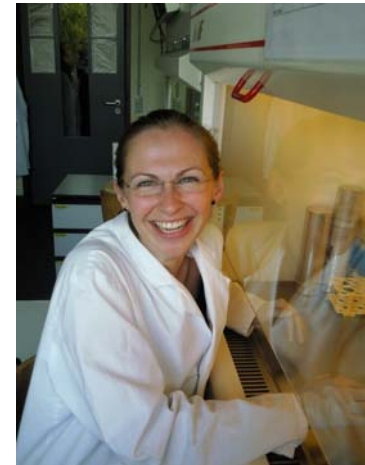
C.H.



B.K.



C.D.



M.M.