

**LC/LC-MS Determination of the Inhibitory Potency
of Herbal Extracts on the Activity of
Cytochrome P450 Enzymes**

Matthias Unger, Würzburg



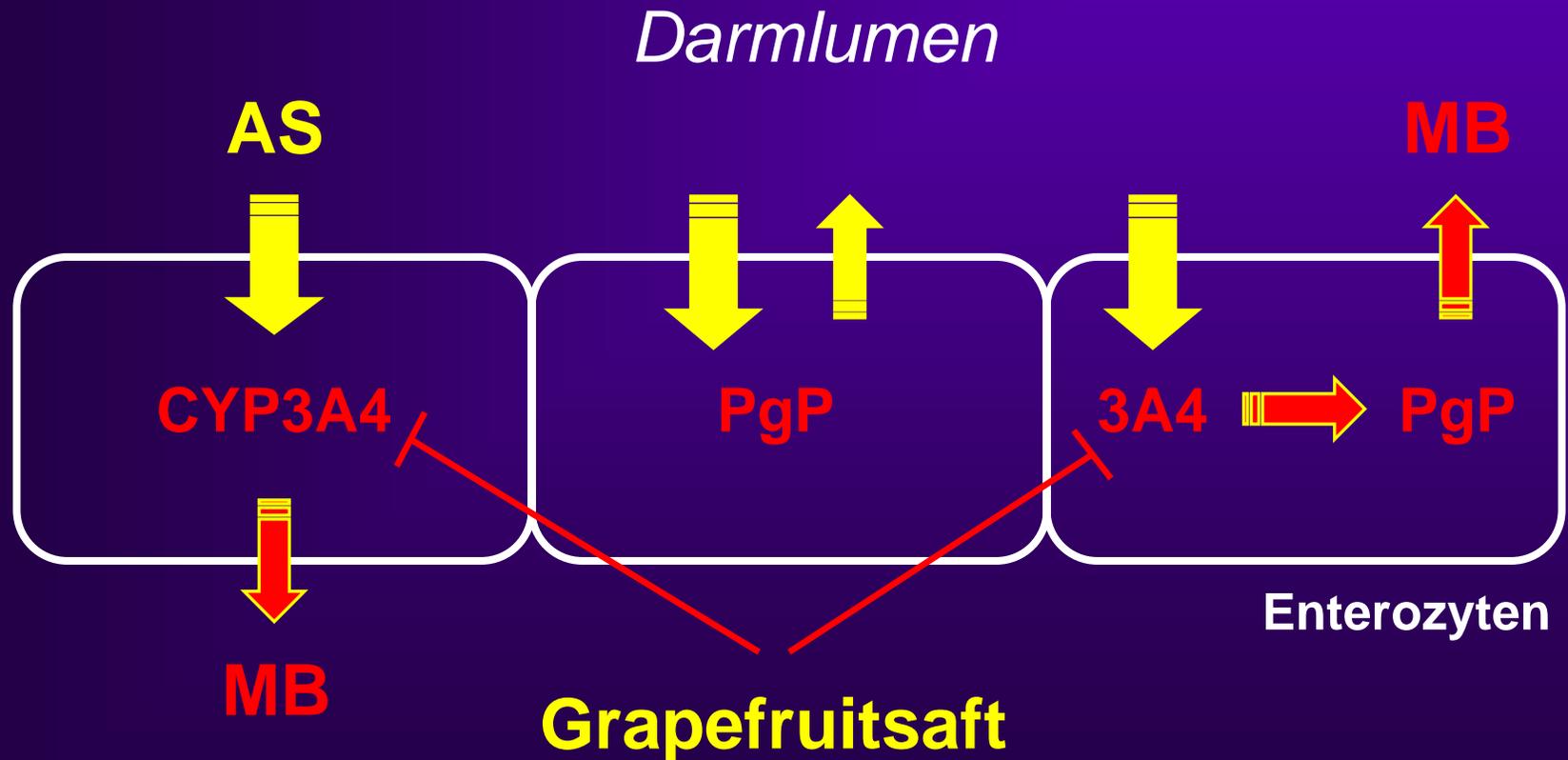
- ❑ **Hypericum-Extrakte erniedrigen die Plasmaspiegel von Cyclosporin, Digoxin, Phenytoin, Theophyllin, Indinavir, Saquinavir, Warfarin**

→ Induktion von CYP3A4 und P-Glykoprotein

- ❑ **Grapefruitsaft erhöht die Plasmaspiegel von Cyclosporin, Erythromycin, Simvastatin, Lovastatin, Terfenadin, Nifedipin, Carbamazepin, Midazolam**

→ Inhibition von CYP3A4 im Dünndarm

Wie **erhöht** Grapefruitsaft die **Bioverfügbarkeit** synthetischer Arzneimittel ??



Entwurf von **BfArM und Kommission E** zur Bewertung von Arzneimittelinteraktionen bei pflanzlichen Arzneimitteln (2004)

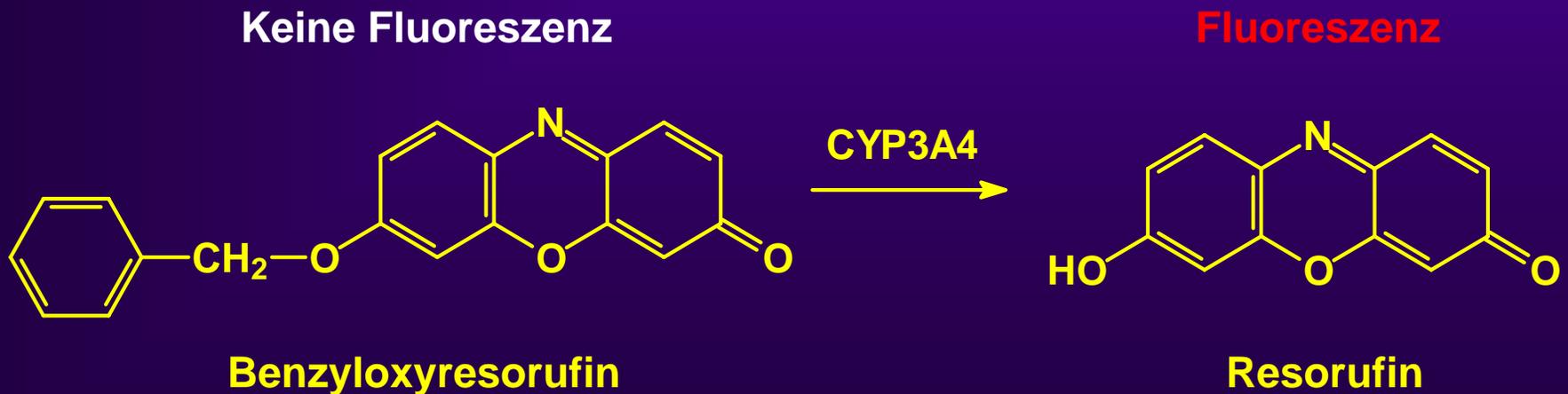
- ❑ „...sind zur Zulassung zumindest *in vitro* Untersuchungen vorzulegen. Falls sich hieraus ein Verdacht ergibt, sind klinische Studien notwendig.“
- ❑ Pharmakokinetische Interaktionen sind *in-vitro* für CYP-450-Enzyme relativ gut vorhersagbar
- ❑ Klinische Studien, nur wenn *In-vitro-Ergebnisse* auf Interaktionen hindeuten (**Kosten!!**)

Arzneistoffe als Substrate und Inhibitoren von Cytochrom P450-Enzymen

| Arzneistoff | CYP | Metabolit | Inhibitor |
|--------------|---------|------------------|----------------|
| Theophyllin | CYP1A2 | 1-Methylxanthin | Coffein |
| Diclofenac | CYP2C9 | 4'-OH-Diclofenac | Sulfaphenazol |
| Diazepam | CYP2C19 | Nordazepam | Tranylcypromin |
| Amitryptilin | CYP2D6 | Nortryptilin | Chinidin |
| Diazepam | CYP3A4 | Temazepam | Ketoconazol |

Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen durch Pflanzenextrakte: *In-Vitro*-Tests

- Substrate werden durch CYP-Enzyme in fluoreszierende Produkte überführt
 - *schnell, gut geeignet für High-Throughput Screening*
 - *viele Pflanzeninhaltsstoffe fluoreszieren*

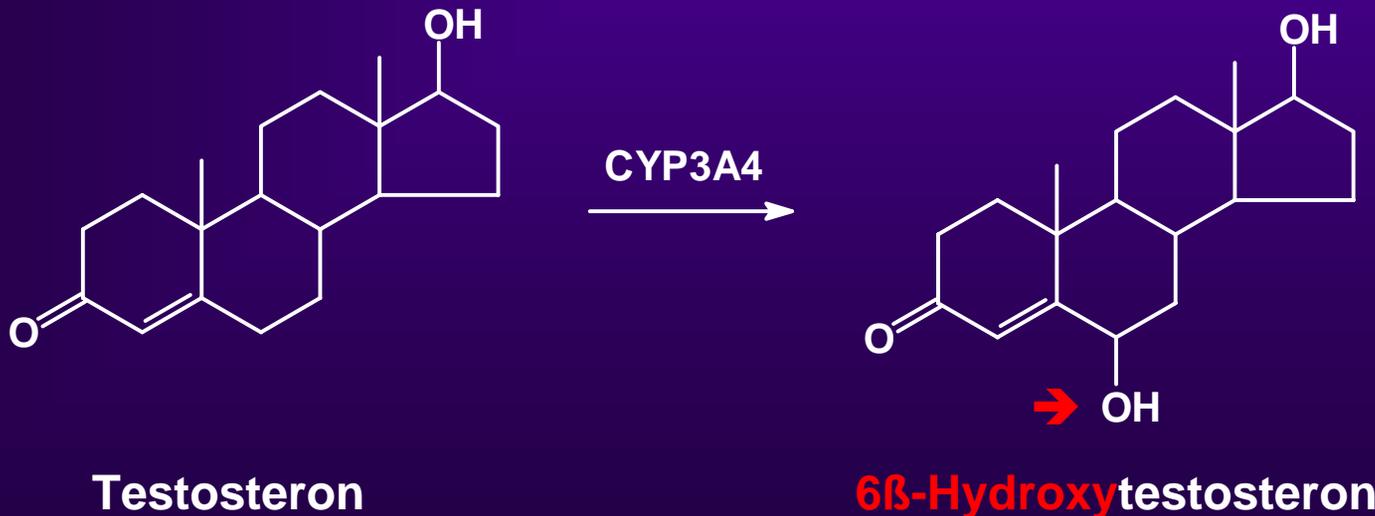


Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen durch Pflanzenextrakte: *In-Vitro*-Tests

□ LC/MS oder LC/MS-MS-basierte Methoden

→ (schnell), Bestimmung mit Substrat/CYP-Cocktail

→ komplizierte(re) Methodenentwicklung

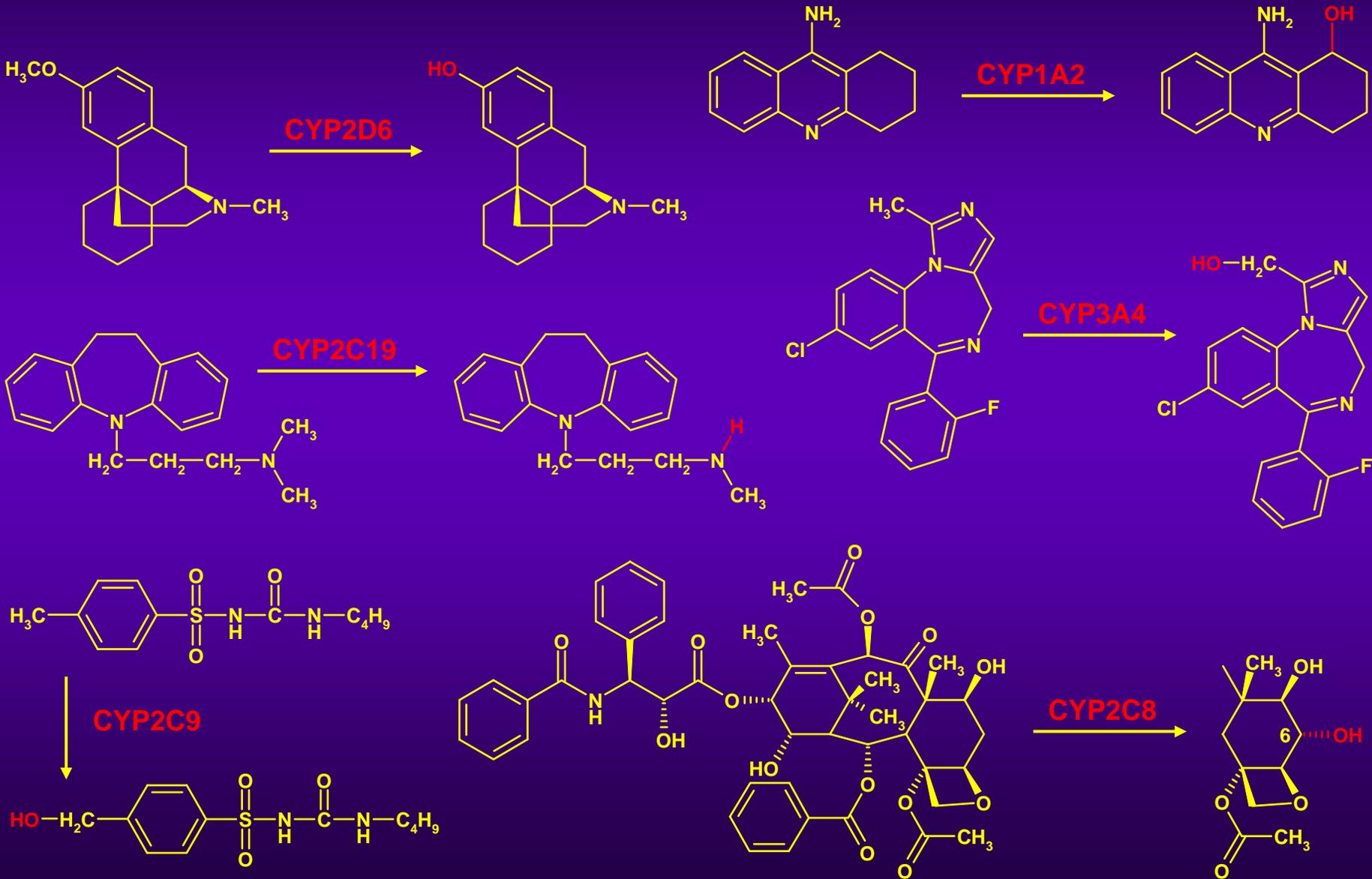


Entwicklung einer LC/LC-MS-Methode für die simultane Bestimmung der Inhibition von CYP1A2/2C8/9/19/2D6 und CYP3A4 durch Pflanzenextrakte



- Inkubation der Pflanzenextrakte (3 Konzentrationen) mit Substraten, rekombinanten CYP-Enzymen und NADPH
- LC/LC-MS-Quantifizierung der gebildeten Metabolite im SIM-Modus und Kalkulation der inhibitorischen Aktivität***

Substrate für LC/LC-MS Screening

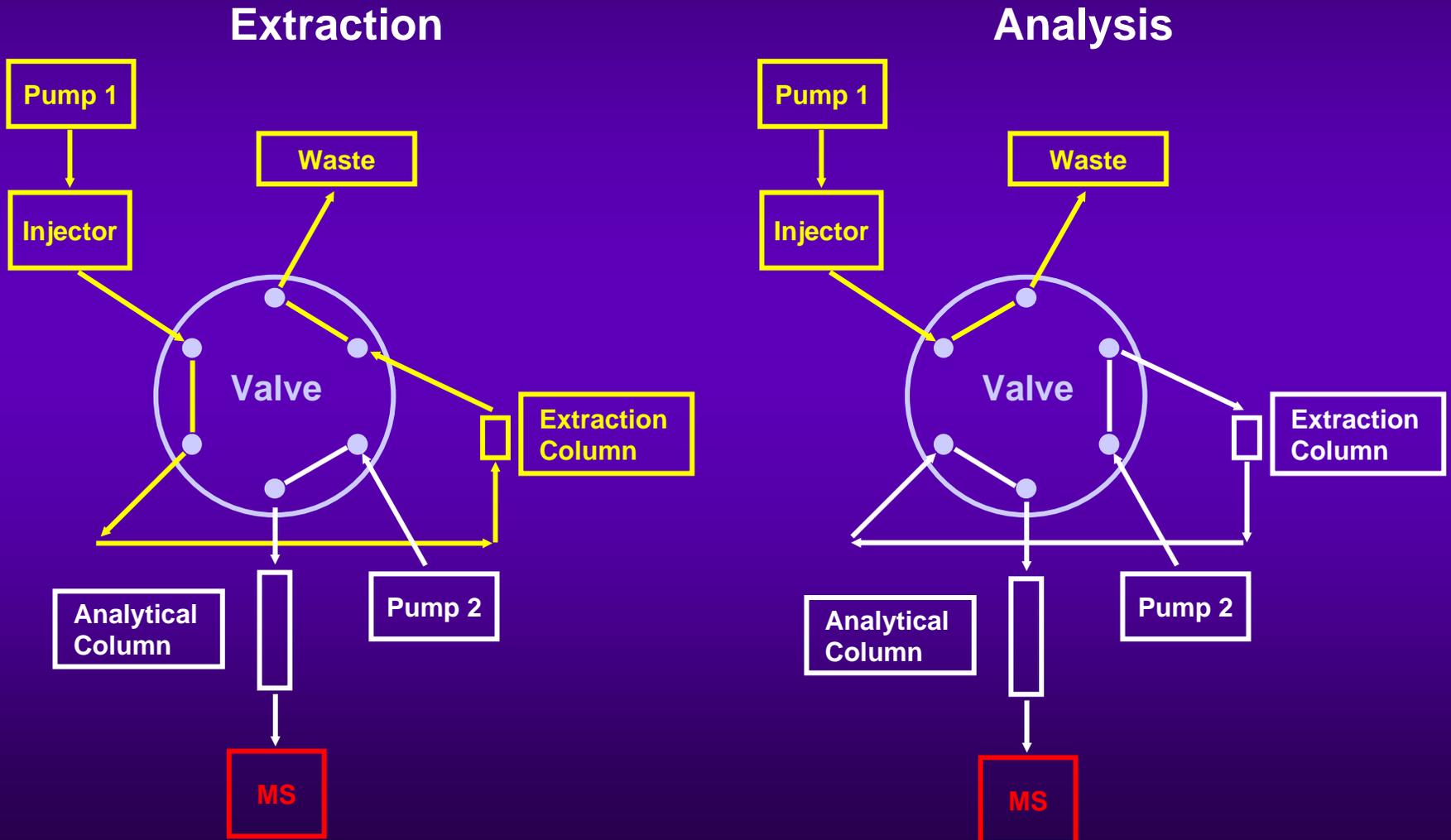


Methodenentwicklung

- ➔ **Quantifizierung aller Produkt-Ionen im SIM-Modus**
ESI (positiv/negativ oder „Polarity Switching“)
- ? **Selektive Bestimmung der Metabolite ohne Interferenzen**
aus der Pflanzenmatrix (komplexe Vielstoff-Gemische)
 - ➔ *Probenvorbereitung (Ausschütteln, SPE, usw.) ??*
 - ➔ *Ausreichende chromatographische Trennung ??*
- ? **Injektion einer großen Probenmenge ohne Verlust an**
Auflösung ➔ Empfindlichkeit

LC/LC-MS

Automated Solvent Extraction (Column Switching)

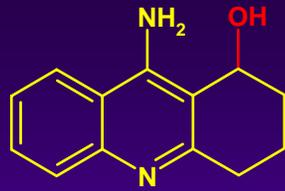
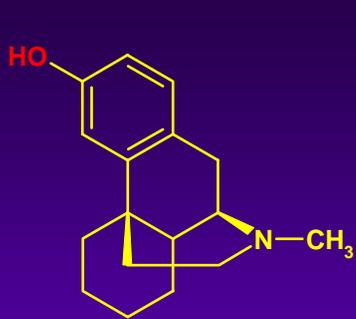


Automatische Proben-Extraktion (Column Switching)

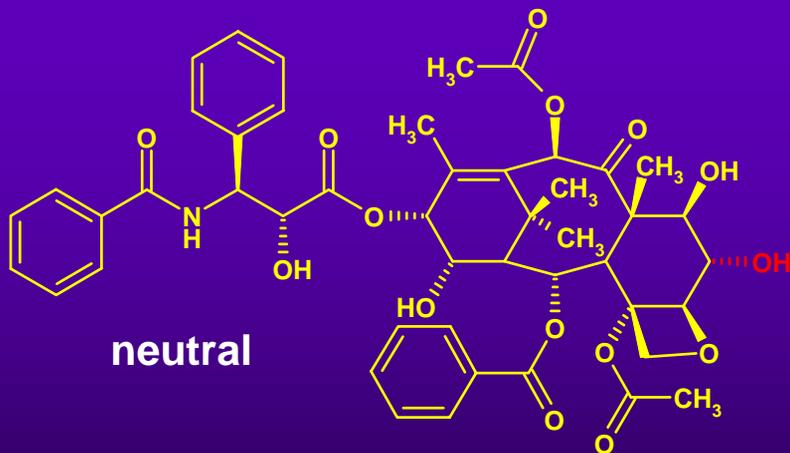
- ❑ Große Proben-Anzahl
- ❑ Injektionsvolumen (< 1.5 ml)
- ❑ Ideal für komplexe Matrices
z.B. Pflanzenextrakte, Urin,
Zellkultur-Medien, Plasma
- ❑ Auswaschen von (polaren)
Substanzen der Probenmatrix
- ❑ Saubere Chromatogramme
- ❑ Saubere ESI-Quelle
→ Reproduzierbarkeit !!



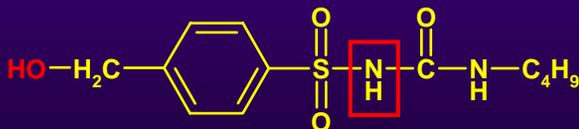
LC/LC-MS-Methode: Chromatographie



basisch



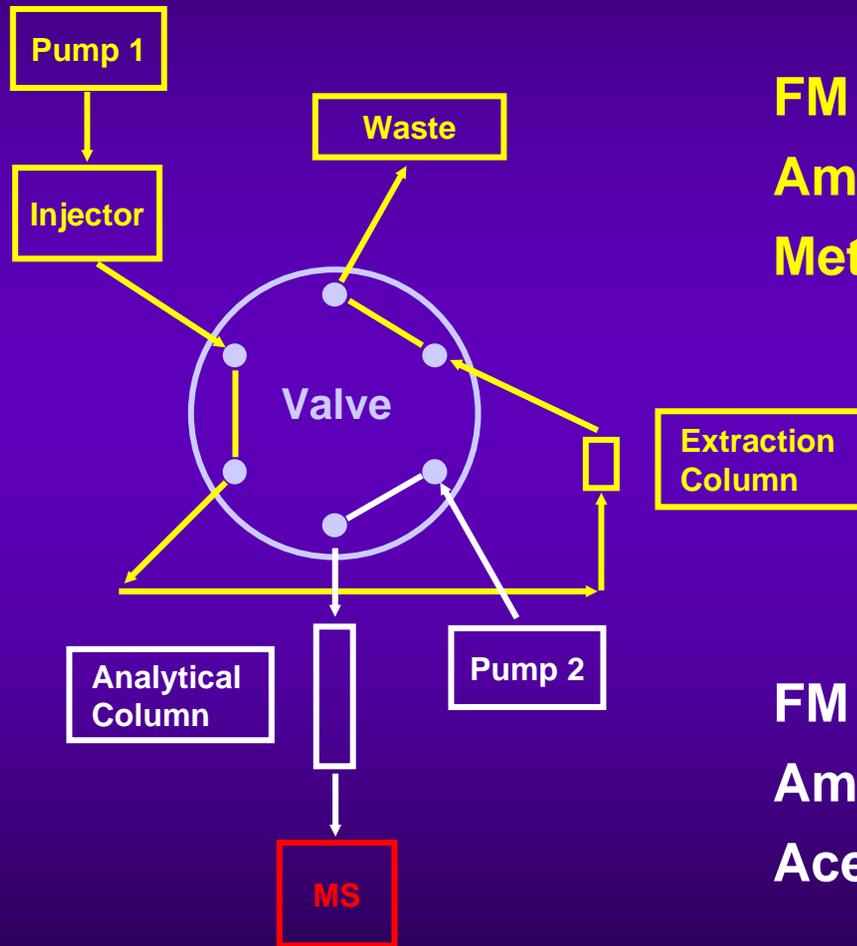
neutral



sauer

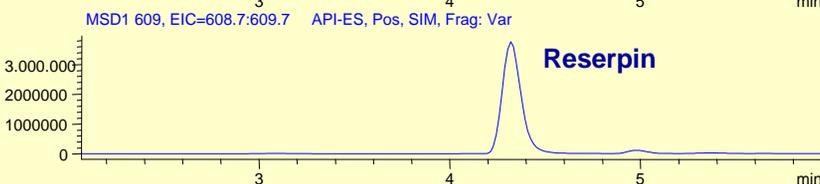
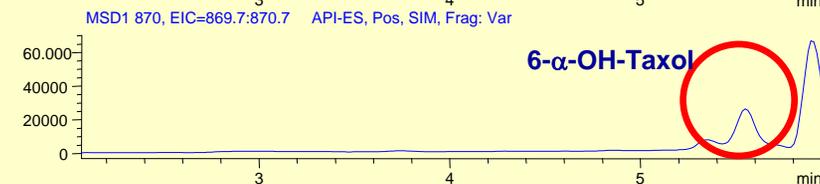
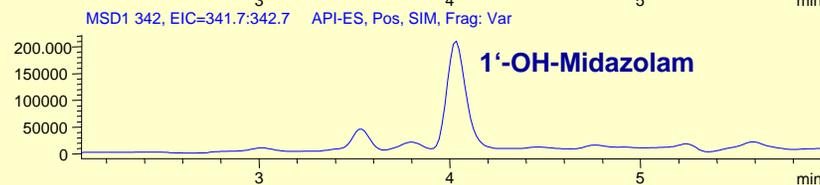
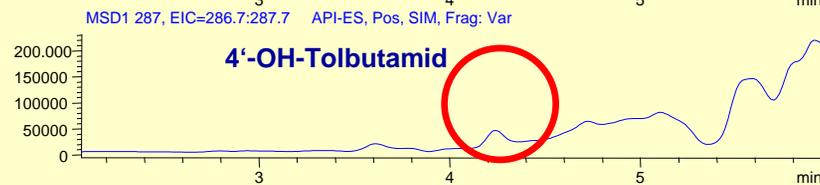
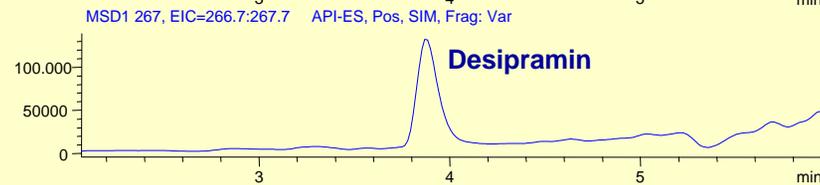
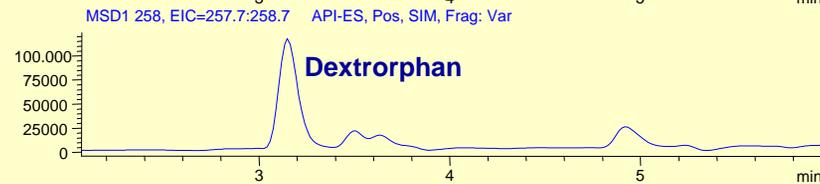
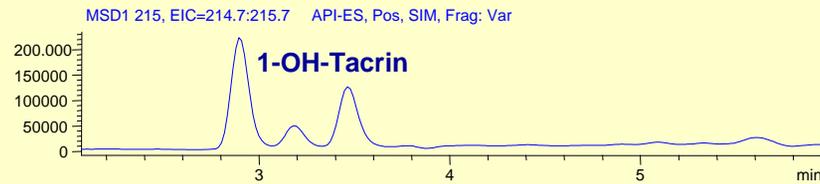
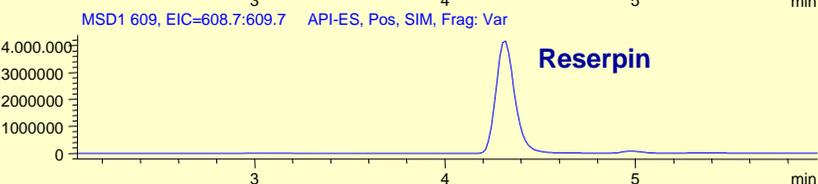
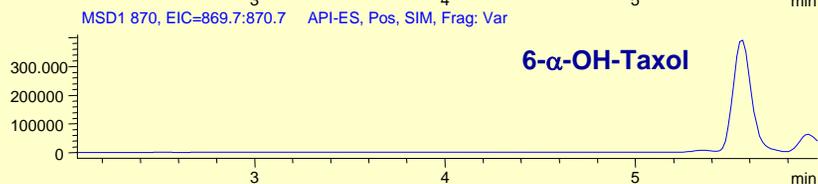
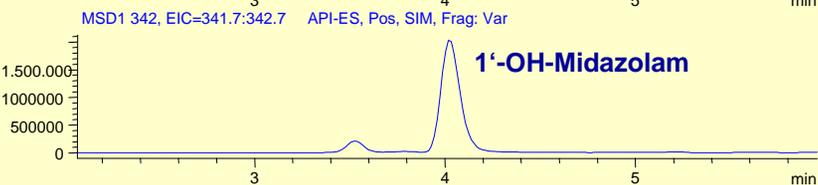
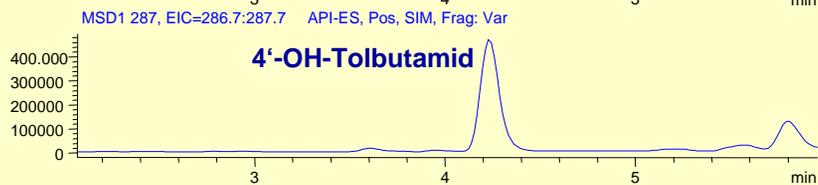
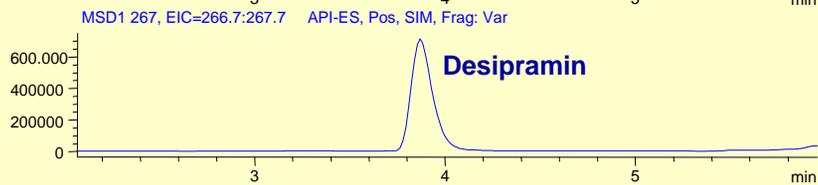
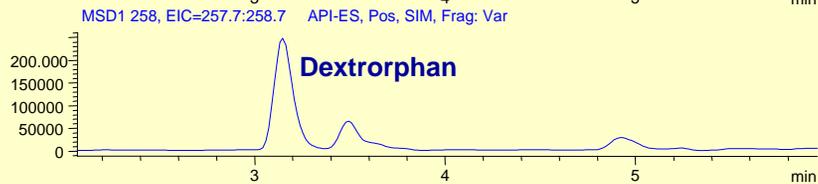
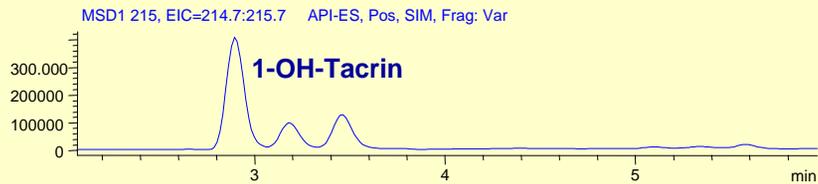
- Automatische Festphasenextraktion
Adsorption der **Metabolite** an RP18
→ **Lipophilie/Selektivität**
- Substrate → µg/ml
Pflanzenextrakt → µg/ml
Metabolite → **ng/ml**
- Analytische Säule
Selektivität/Trennung
Schnelligkeit (Zeitfenster < 8 min)
- Empfindliche Detektion (ESI)
SIM → **Positive Ionisierung**

LC/LC-MS-Methode: Chromatographie



FM Extraction Column (RP18)
Ammoniumacetat 10 mM/TFA 0.1 %
Methanol (90/10); isokratisch

FM Analytische Säule (RP14-Amid)
Ammoniumacatat 10 mM/FA 0.1 %
Acetonitril (Gradient)

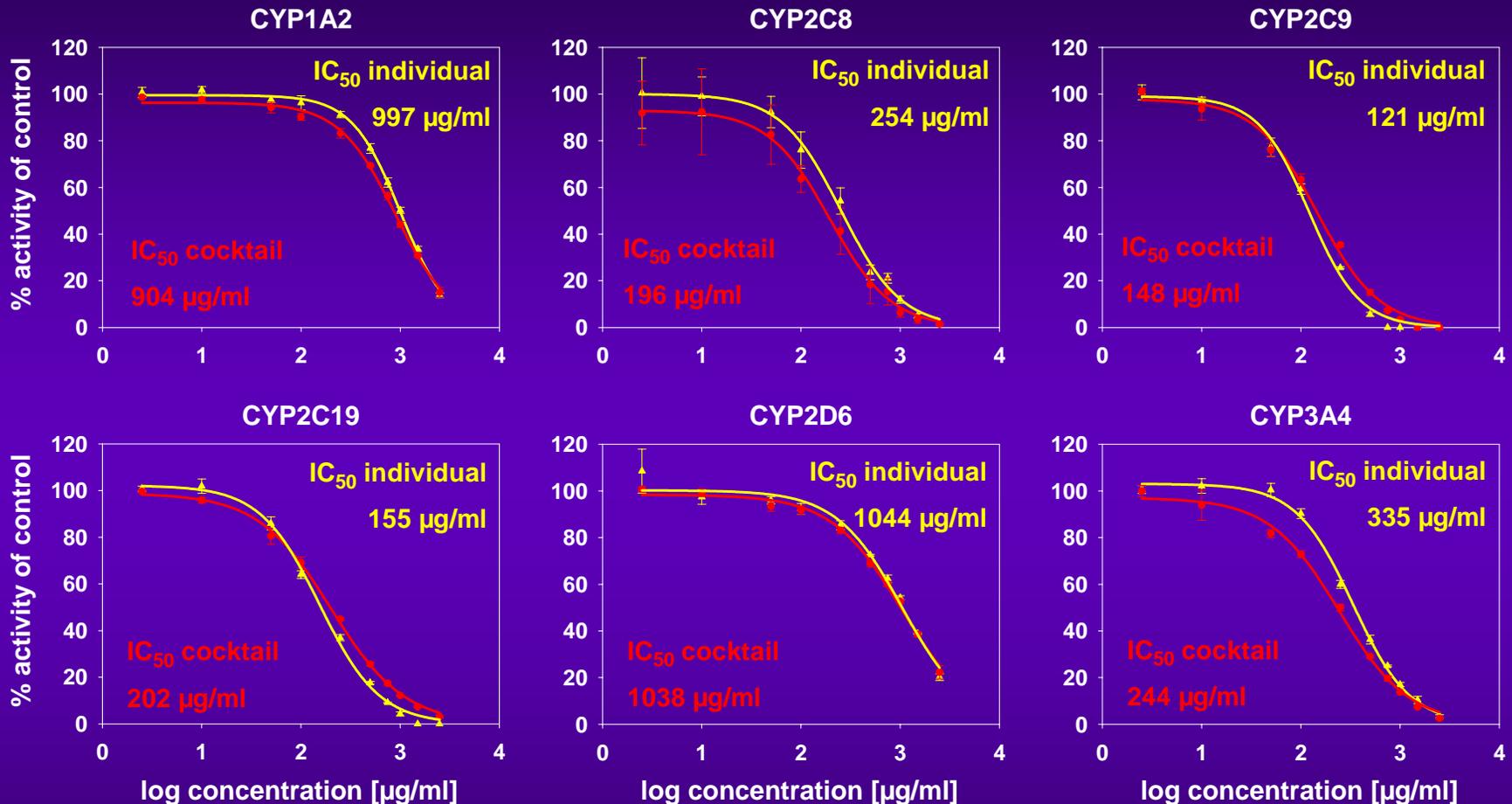


Selektivität Enzym-Substrat-Cocktail: Inhibitoren

| Inhibitor | CYP | IC ₅₀ cocktail | IC ₅₀ individual | IC ₅₀ literature |
|-----------------|------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Furafylline | 1A2 | 1.4 ± 0.1 µM | 2.7 ± 0.1 µM | 0.5 - 6.0 µM |
| Quercetin | 2C8 | 6.2 ± 0.2 µM | 3.9 ± 0.3 µM | 7.0 µM |
| Sulfaphenazole | 2C9 | 0.42 ± 0.08 µM | 0.43 ± 0.02 µM | 0.14 - 0.7 µM |
| Tranlycypromine | 2C19 | 12.5 ± 1.2 µM | 8.6 ± 0.4 µM | 8.0/8.9 µM |
| Quinidine | 2D6 | 30.7 ± 7.4 nM | 25.3 ± 1.0 nM | 20 - 150 nM |
| Clotrimazole | 3A4 | 3.8 ± 0.2 nM | 2.6 ± 0.2 nM | 6.7 nM |

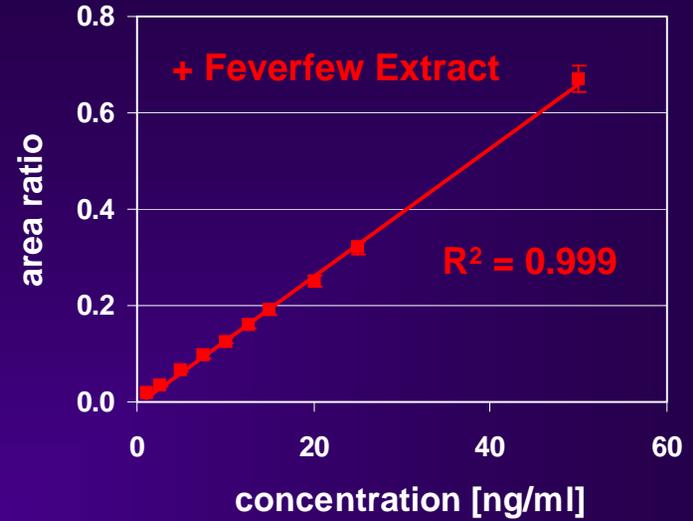
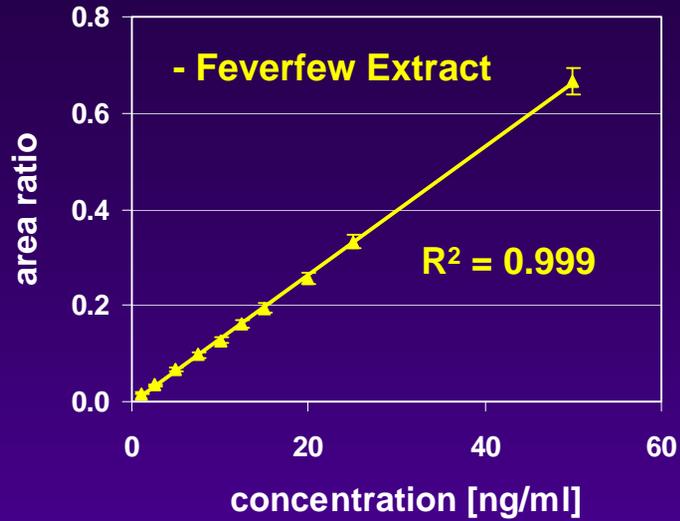
- ❑ IC₅₀-Werte in Übereinstimmung mit publizierten Daten
- ❑ Abweichung: 45 - 60% (CYP1A2/2C8/2C19/3A4), 20% (CYP2D6), 2% (CYP2C9)
- ❑ Eignung der Methode für Pflanzenextrakte ??

Selektivität Enzym-Substrat-Cocktail: Devil's Claw

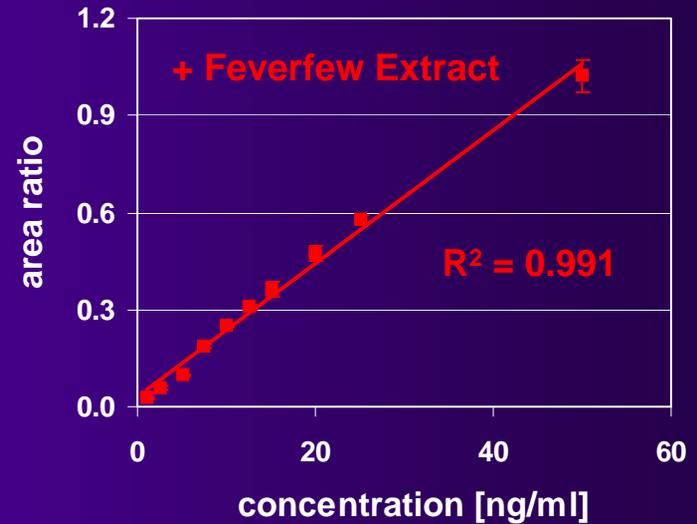
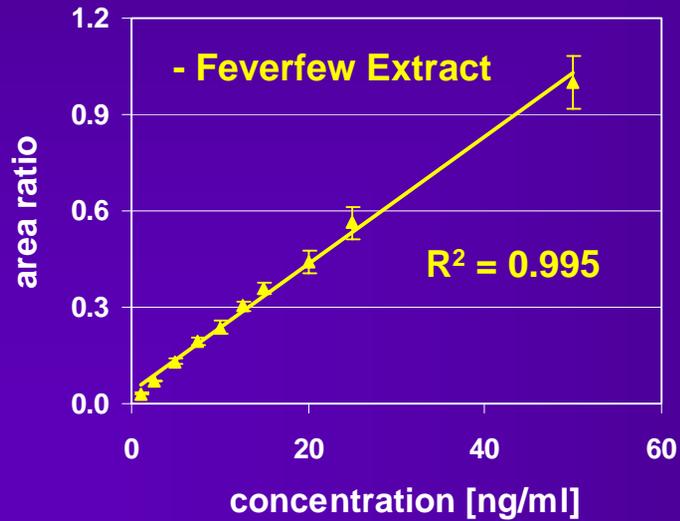


- ❑ Abweichungen IC_{50} -Werte Cocktail/Individueller Assay: 1% (2D6) - 30% (2C19)
- ❑ Moderate Inhibition: 2C8/2C9/2C19; Schwache Inhibition: 3A4/1A2/2D6

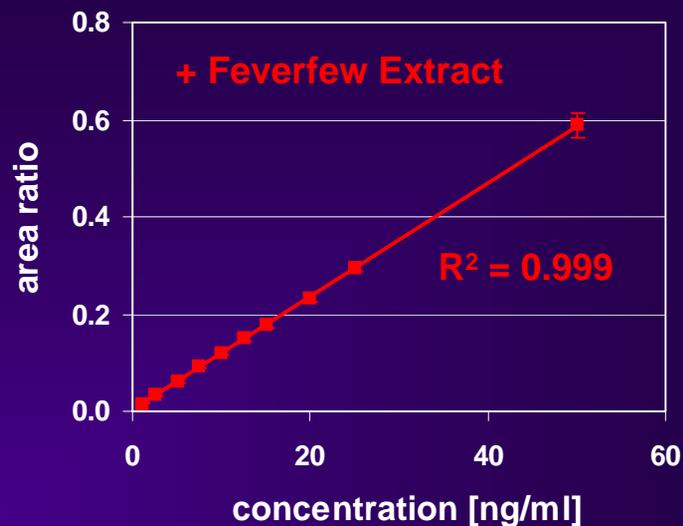
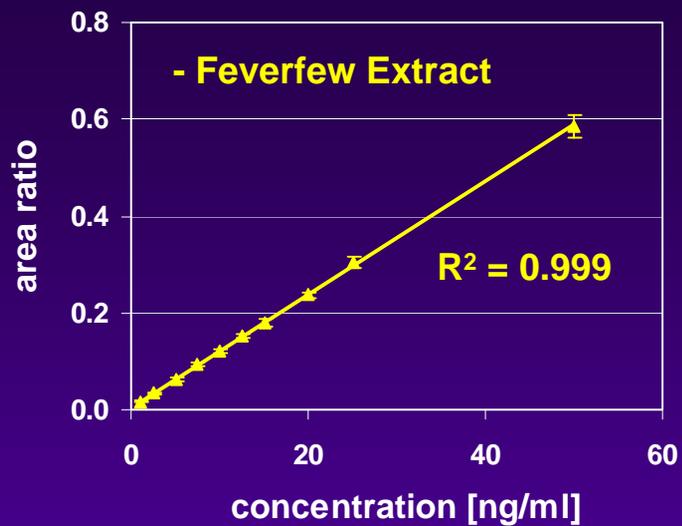
1-Hydroxytacrin



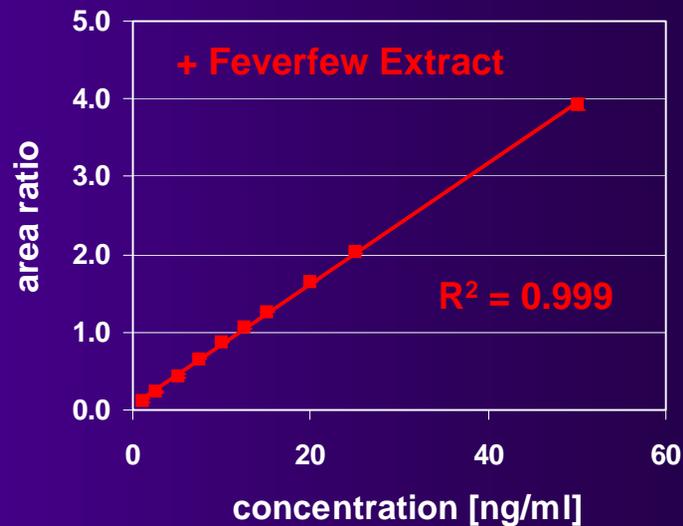
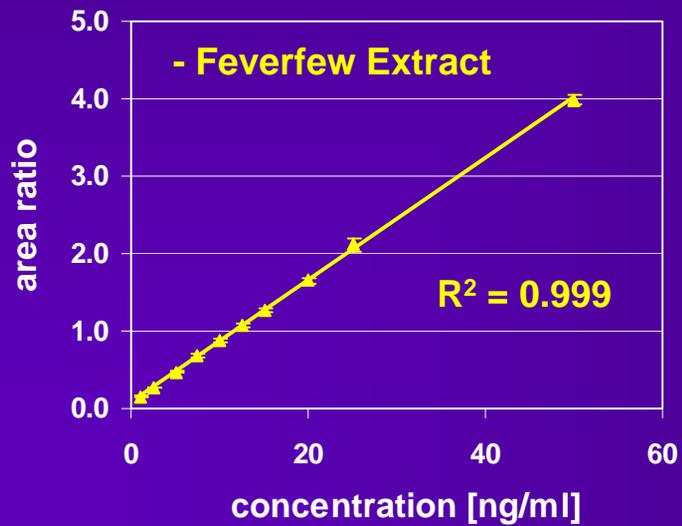
4-Hydroxytolbutamid



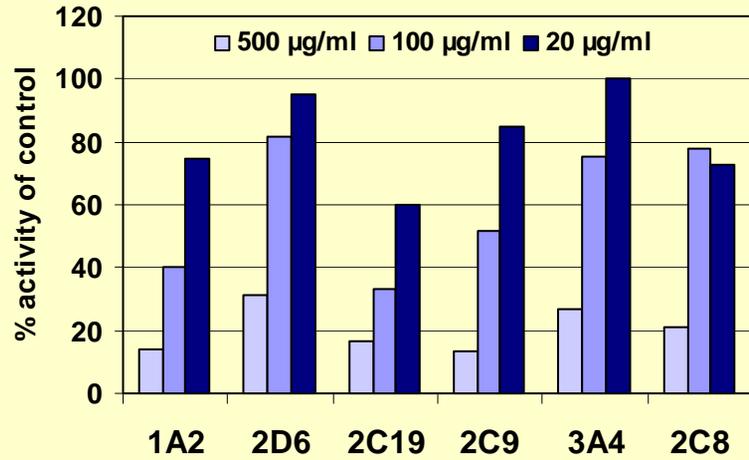
Dextrophan



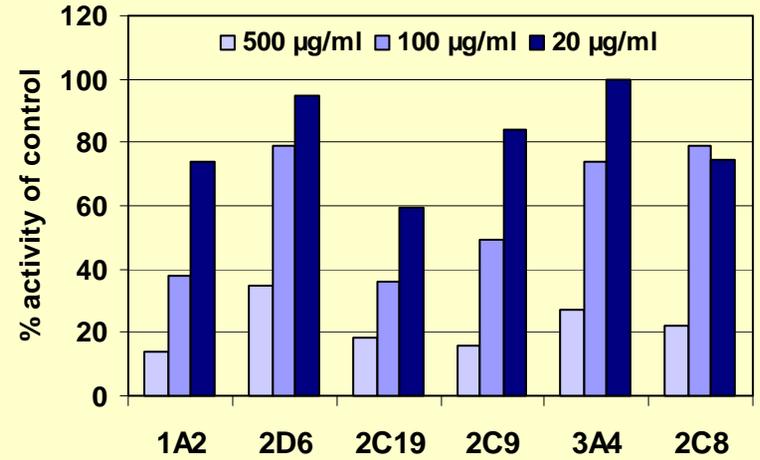
1'-Hydroxymidazolam



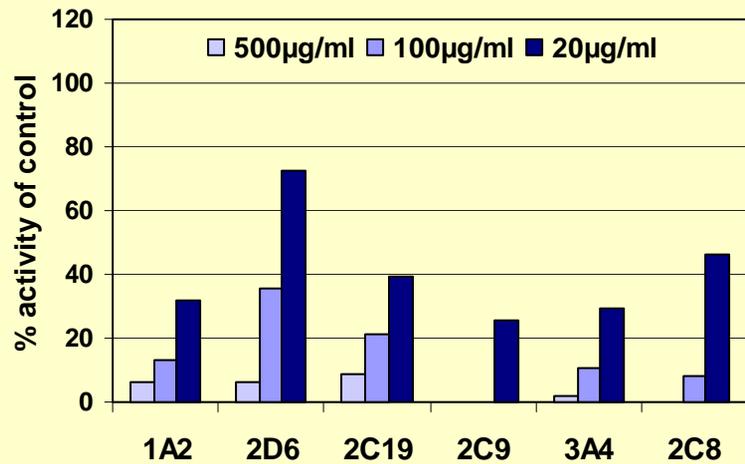
Kava Kava (Nature's Way)



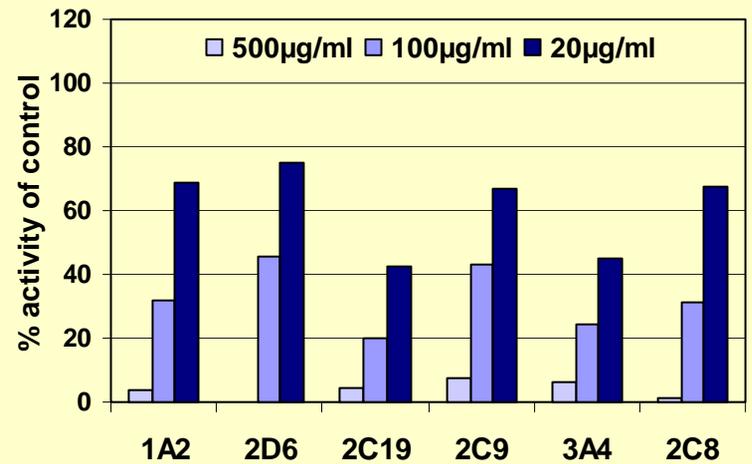
Kava Kava (Caelo)



Pfeffer (schwarz)



Grapefruitöl



Zusammenfassung

- ❑ LC/LC-MS-basierte *In-vitro*-Methode für die Identifizierung von Phytopharmaka und Naturstoffen als Inhibitoren von Cytochrom P450-Enzymen
- ❑ Ausreichende Selektivität des Enzym/Substrat-Cocktails gegenüber individuellen Assays → Kosten/Zeitersparnis
- ❑ Viele Pflanzenextrakte inhibieren:
CYP1A2/**2C8/2C9/2C19**/2D6 und -3A4 ($IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$)

Ausblick

- ❑ **Isolierung und Identifizierung der für die Inhibition verantwortlichen Inhaltsstoffe (Bioassay-Guided-Fractionation)**
- ❑ ***In-vivo*-Studien (*in-vitro-in-vivo*-Korrelation)**
- ❑ **Auffinden von selektiven Inhibitoren und Leitstrukturen**
 - ➔ ***Experimentelle Forschung/Molecular Modeling***
 - ➔ ***Entwicklung neuer/selektiver Wirkstoffe***

Acknowledgement

Andreas Frank

Deutsche Forschungsgemeinschaft