

Metabolisierung von phenolischen Pflanzenstoffen in *Caenorhabditis elegans* im Vergleich mit anderen Spezies

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Florian T. Rieck

aus

Heidelberg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Korreferenten: Prof. Dr. Sabine Kulling, Prof. Dr. Ute Schepers

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	ix
1 Zusammenfassung	1
2 Motivation und Zielsetzung	3
3 Einleitung	5
3.1 Fremdstoffmetabolismus in <i>Caenorhabditis elegans</i> und in Säugetieren	5
3.2 Biologische Wirkung von <i>trans</i> -Resveratrol	7
4 Material und Methoden	9
4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	9
4.2 Chemikalien	12
4.3 Untersuchung des Metabolismus in <i>C. elegans</i>	15
4.3.1 Kultivierung der Nematoden	15
4.3.2 Inkubation mit den Testsubstanzen	19
4.3.3 Umsetzung von Metabolit R6 mit Phosphatasen	21
4.3.4 Isolation und NMR-Spektroskopie von Metabolit R6	21
4.4 Metabolisierung von Resveratrol in <i>Drosophila melanogaster</i>	22
4.5 Metabolisierung von Resveratrol in Säugetieren	23
4.5.1 Fütterungsstudie mit Mäusen	23
4.5.2 Fütterungsstudie mit Schweinen	23
4.5.3 Humane Interventionsstudie	24
4.6 Strukturaufklärung und Quantifizierung der Metaboliten	25
4.6.1 Probenvorbereitung	25
4.6.2 Trennmethode	27
4.6.3 Detektion und Strukturaufklärung	28
4.6.4 Quantifizierung	29
5 Ergebnisse	33
5.1 Metabolismus in <i>Caenorhabditis elegans</i>	33
5.1.1 Metabolisierung von Flavon	34
5.1.2 Metabolisierung von Resveratrol	36

Inhaltsverzeichnis

5.1.3	Metabolisierung von <i>p</i> -Aminobenzoesäure	45
5.1.4	Metabolisierung von Quercetin	49
5.2	Metabolisierung von Resveratrol in <i>Drosophila melanogaster</i>	58
5.3	Metabolisierung von Resveratrol in Säugetieren	63
5.3.1	Resveratrol im Menschen	63
5.3.2	Resveratrol in Mäusen	69
5.3.3	Resveratrol in Schweinen	72
6	Diskussion	75
6.1	Fremdstoffmetabolismus in <i>C. elegans</i>	75
6.2	Metabolisierung von Resveratrol	79
	Literaturverzeichnis	85
	Anhang	91
A	MS-Parameter	93
B	Ergänzende Grafiken und Tabellen	99
B.1	Validierungsergebnisse	99
B.2	Identifikation eines Lunularin-Isomers	103
B.3	UV-Chromatogramme	105
C	Massenspektren	107
C.1	Metaboliten von <i>p</i> -Aminobenzoesäure in <i>C. elegans</i>	107
C.2	Resveratrol-Metaboliten in <i>C. elegans</i> -Homogenat	110
C.3	Quercetin-Metaboliten in <i>C. elegans</i> -Homogenat	113
C.4	Metaboliten in <i>Drosophila melanogaster</i>	118
C.5	Metaboliten in humanen Urinproben	122
C.6	Metaboliten in humanen Plasmaproben	146
C.7	Metaboliten in Urinproben aus Mäusen	159
C.8	Metaboliten in Plasmaproben aus Mäusen	172
C.9	Metaboliten in Plasmaproben aus Schweinen	178

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMI	engl. <i>Body Mass Index</i> , Körpermasseindex [kg m^{-2}]
CYP	Cytochrom P450
DAD	Diodenarraydetektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
KG	Körpergewicht
LOD	Nachweisgrenze
LLOQ	(untere) Bestimmungsgrenze
M	mol l^{-1}
MRM	engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Beobachtung mehrerer Fragmentierungswege eines Vorläuferions
MS	Massenspektrometrie
NGM	engl. <i>Nematode Growth Medium</i> , Nährmedium für Nematoden
NMR	engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernmagnetresonanz
NI	Negative Ionisierung
PABA	<i>p</i> -Aminobenzoesäure
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PI	Positive Ionisierung
psi	engl. <i>pound-force per square inch</i> , $1 \text{ psi} \hat{=} 6,8948 \cdot 10^{-2} \text{ bar}$
QqLIT	Triple-Quadrupol-Linear-Ion-Trap-Massenspektrometer (z.B. AB SCIEX QTRAP [®] 5500)
RDA	Retro-Diels-Alder

Abkürzungsverzeichnis

RNAi	RNA-Interferenz
RT	engl. <i>Retention Time</i> , Retentionszeit
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i> , kleine interferierende RNA-Abschnitte
SPE	Festphasenextraktion
SULT	Sulfotransferase
TIC	engl. <i>Total Ion Chromatogram</i> , Chromatogramm des Gesamtionenstroms
HPLC-TOFMS	Hochleistungsflüssigchromatographie, gekoppelt mit Flugzeit-Massenspektrometrie
UDPG	Uridin-5'-diphosphoglucose
UGT	UDP-Glucuronosyl-/UDP-Glykosyltransferase
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Massenanteil pro Volumen
XIC	engl. <i>eXtracted Ion Chromatogram</i> , Massenfilterung aus dem TIC

Tabellenverzeichnis

4.1	Testsubstanzen und ihre Inkubationszeiten für <i>C. elegans</i>	20
4.2	Mausstudie: Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	23
4.3	HPLC-Gradienten zur Trennung der Metaboliten in <i>C. elegans</i>	27
4.4	UHPLC-Gradient zur Trennung der Resveratrol-Metaboliten in Säugetieren	28
4.5	Screening-Liste möglicher Konjugate	29
4.6	Referenzsubstanzen zur Quantifizierung über DAD	30
5.1	Postulierte Strukturen der Flavon-Metaboliten in <i>C. elegans</i>	35
5.2	Metaboliten von Flavon (quantitativ) in <i>C. elegans</i>	36
5.3	Postulierte Strukturen der Resveratrol-Metaboliten in <i>C. elegans</i>	38
5.4	Metaboliten von Resveratrol (quantitativ) in <i>C. elegans</i>	43
5.5	Postulierte Strukturen der PABA-Metaboliten in <i>C. elegans</i>	46
5.6	Metaboliten von PABA (quantitativ) in <i>C. elegans</i>	48
5.7	Postulierte Strukturen der Quercetin-Metaboliten in <i>C. elegans</i>	50
5.8	Metaboliten von Quercetin (quantitativ) in <i>C. elegans</i>	53
5.9	Metaboliten von Quercetin (quantitativ) in <i>C. elegans</i> aus Flüssigkultur	55
5.10	Detektierte Resveratrol-Metaboliten in <i>Drosophila melanogaster</i>	60
5.11	Resveratrol-Metaboliten (quantitativ) in <i>Drosophila melanogaster</i>	62
5.12	Resveratrol-Metaboliten in humanem Urin (Aglykone)	64
5.13	Detektierte Konjugate im Menschen (Übersicht)	65
5.14	Resveratrol-Metaboliten in humanem Plasma (Konjugate)	66
5.15	Resveratrol-Metaboliten in humanem Plasma (Aglykone)	67
5.16	Detektierte Konjugate in Mäusen (Übersicht)	70
5.17	Resveratrol-Metaboliten in Mäusen (Urin, Aglykone)	71
5.18	Resveratrol-Metaboliten in Mäusen (Plasma, Konjugate)	71
5.19	Resveratrol-Metaboliten in Mäusen (Plasma, Aglykone)	72
5.20	Resveratrol-Metaboliten in Schweinen (Konjugate)	73
5.21	Resveratrol-Metaboliten in Schweinen (Aglykone)	73
A.1	TOF-MS-Parameter im NI-Modus	93
A.2	TOF-MS-Parameter im PI-Modus (PABA)	95
A.3	TOF-MS-Parameter im PI-Modus (Flavon)	96
A.4	MRM-Übergänge der Resveratrol-Metaboliten	97
B.1	Validierung Humanurin: Präzision und Richtigkeit	99
B.2	Validierung Humanplasma: Präzision und Richtigkeit	99

Tabellenverzeichnis

B.3	Validierung Humanurin: Wiederfindung, Matrix, Extraktion	100
B.4	Validierung Humanplasma: Wiederfindung, Matrix, Extraktion	101
B.5	Validierung Maus-/Schwein-Plasma: Wiederfindung, Matrix, Extraktion	102

Abbildungsverzeichnis

5.1	Strukturformeln eingesetzter Testsubstanzen	33
5.2	Chromatogramm der Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Flavon	34
5.3	Chromatogramm der Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Resveratrol	37
5.4	Umsetzung von Resveratrol durch <i>C. elegans</i> -Homogenat und UDPG.	39
5.5	Umsetzung von R6 mit Phosphatase	40
5.6	NMR-Spektrum des Resveratrol-Metaboliten R6 aus <i>C. elegans</i>	42
5.7	Konzentrationsverlauf der Resveratrolmetaboliten in <i>C. elegans</i>	44
5.8	Chromatogramm der Inkubation von <i>C. elegans</i> mit <i>p</i> -Aminobenzoesäure	45
5.9	Fragmentierung des PABA-phosphoglykosids	47
5.10	Chromatogramm der Inkubation von <i>C. elegans</i> mit Quercetin	49
5.11	Umsetzung von Quercetin durch <i>C. elegans</i> -Homogenat und UDPG	51
5.12	Chromatogramme der Flüssigkultur von <i>C. elegans</i> mit Quercetin	54
5.13	Metabolisierung von Quercetin durch <i>ugt</i> -Knockout- <i>C. elegans</i>	56
5.14	Einfluss von Nipagin auf den Metabolismus in <i>D. melanogaster</i> (φ)	59
5.15	Einfluss von Nipagin auf den Metabolismus in <i>D. melanogaster</i> (σ)	59
5.16	XICs der Resveratrol-Metaboliten in <i>D. melanogaster</i>	61
5.17	Kinetik der Resveratrolmetaboliten in humanem Plasma	68
B.1	MSMS-Spektren von Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl	103
B.2	Fragmentierung von Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl	104
B.3	UV-Chromatogramme aus humanem Plasma	105
B.4	UV-Chromatogramme aus Maus-Plasma	106

1 Zusammenfassung

Seit über vierzig Jahren wird der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus in der biologischen und medizinischen Forschung verwendet, sodass er inzwischen als eine der am besten erforschten Spezies gilt. Dennoch ist nur wenig bekannt über die Metabolisierung von Fremdstoffen in *C. elegans*.

Für die vorliegende Arbeit wurde *C. elegans* daher den phenolischen Pflanzenstoffen Quercetin, Resveratrol, *p*-Aminobenzoesäure, sowie Flavon ausgesetzt und deren Aufnahme und Metabolisierung untersucht. Zur Trennung, Detektion und Quantifizierung der gebildeten Metaboliten wurden Hochleistungsflüssigchromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie eingesetzt. Alle eingesetzten Substanzen wurden durch den Fadenwurm aufgenommen und umfangreich konjugiert. Flavon wurde vor der Konjugation durch *C. elegans* ein- oder zweifach hydroxyliert. Die gebildeten Konjugate bestanden bei allen eingesetzten Substanzen aus Phosphat- und Hexoseresten, die teilweise als Glucoside und Diglucoside identifiziert werden konnten. Die Ausscheidung der Konjugate wurde anhand von Quercetin-Metaboliten untersucht. Dabei wurden nur Quercetin-Glucoside und -Diglucoside detektiert, nicht aber phosphathaltige Konjugate.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Konjugation von Fremdstoffen in *C. elegans* mit Phosphohexosiden ein allgemeiner Stoffwechselweg zu sein scheint. Konjugate können dabei über Sauerstoff- oder Stickstoffatome der Substanz gebunden werden. Phosphathaltige Metaboliten haben möglicherweise eine Funktion *in vivo*, da solche Konjugate nicht als Ausscheidungsprodukte detektiert wurden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Metabolisierung des Stilbens *trans*-Resveratrol in *C. elegans* andere Metaboliten erzeugt als die aus Säugetieren bekannten Glucuronide und Sulfate. Trotzdem werden biologische Wirkungen dieser Substanz in verschiedenen Veröffentlichungen zwischen Mäusen, *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* verglichen. Diese reichen von leichter Verminderung von oxidativem Stress über Linderung der Auswirkungen einer hochkalorischen, fettreichen Diät in Mäusen bis hin zur Verlängerung der Lebenszeit in *C. elegans* und *D. melanogaster*.

Obwohl diese Wirkungen nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden können, existieren bereits resveratrolhaltige Nahrungsergänzungsmittel, die sich positiv auf die Gesundheit auswirken sollen. Einmal aufgenommen, wird Resveratrol im Körper jedoch schnell fast vollständig zu Glucuroniden und Sulfaten metabolisiert. Durch Darmbakterien können außerdem reduktive Metaboliten des Aglykons gebildet werden. Um die unterschiedlichen Wirkungen, die in Studien mit einfachen oder höher entwickelten Modellorganismen und Menschen beobachtet werden, besser bewerten zu können, ist eine vergleichende Betrachtung der Metabolisierung sowie der Konzentrationen einzelner Metaboliten obligatorisch.

1 Zusammenfassung

Aus diesem Grund wurde die Umwandlung von Resveratrol in *C. elegans*, *D. melanogaster*, Mäusen, Schweinen und im Menschen untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Bildung reduktiver Metaboliten gelegt, welche bisher in der Literatur nur unzureichend betrachtet wurden. Im Vergleich der einzelnen Spezies zeigte sich, dass Konjugate und reduktive Metaboliten in stark variierenden Konzentrationen vorlagen.

In *D. melanogaster* wurde Resveratrol nur in sehr geringem Maße konjugiert, was zur Bildung eines 3-O-Glucosids und 3-O-Phosphoglucosids führte. Letzteres Konjugat war der Hauptmetabolit in *C. elegans*, wo Resveratrol zu 70% konjugiert vorlag. In Säugetieren wurden über 99% von Resveratrol zu Konjugaten metabolisiert. Das Hauptkonjugat von Resveratrol im Plasma von Schweinen und Mäusen war ein 3-O-Glucuronid, in humanem Plasma ein 3-O-Sulfat.

Die Analyse der Aglykone zeigte, dass reduktive Metaboliten von Resveratrol nur in Säugetieren gebildet wurden. Dihydroresveratrol war in humanem Plasma dreimal höher konzentriert als Resveratrol, bei Mäusen hingegen auf etwa gleichem Niveau. Ein weiterer reduktiver Metabolit, Lunularin, wurde ausschließlich im Menschen detektiert und erreichte in einzelnen Probanden bis zu 50% der Konzentration von Resveratrol. Das isomere 3,3'-Dihydroxybibenzyl wurde sowohl in Mäusen als auch im Menschen detektiert und stellt einen neuen *in vivo*-Metaboliten von Resveratrol dar.

Konjugate von Lunularin wurden nur in Humanurin detektiert (drei Sulfolucuronide, ein Sulfat). Konjugate des reduktiven Metaboliten Dihydroresveratrol konnten dagegen in Mäusen und Menschen detektiert werden: sowohl im Plasma als auch im Urin waren Glucuronide und Diglucuronide, Sulfolucuronide sowie Sulfate vorhanden. In humanem Urin konnte darüber hinaus ein Dihydroresveratrol-Ribosylsulfat detektiert werden. Wegen fehlender Referenzsubstanzen konnten diese Konjugate jedoch nicht quantifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Resveratrol im Menschen aufgenommen und schnell metabolisiert wird. Gleichzeitig konnte aber gezeigt werden, dass mehr als nur Resveratrol-Konjugate entstehen – der Anteil von reduktiven Metaboliten überstieg jenen von Resveratrol-Konjugaten deutlich. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass sich die Metabolitenmuster in den verschiedenen Spezies teilweise stark unterscheiden. In *D. melanogaster* und *C. elegans* findet eine Konjugation mit Hexose- und Phosphatresten statt, während in Säugetieren Glucuronide und Sulfo-Konjugate gebildet werden. Bei der Bewertung der Wirkungen von Resveratrol in verschiedenen untersuchten Spezies müssen diese Unterschiede berücksichtigt werden. Die Frage nach der biologischen Aktivität und der *in vivo*-Bedeutung von Resveratrol-Konjugaten, aber auch von Konjugaten der reduktiven Metaboliten Dihydroresveratrol und Lunularin, ist in zukünftigen Arbeiten zu klären. Dabei ist auch eine Quantifizierung aller Konjugate anzustreben, um ihre Bedeutung im Gesamtbild besser beurteilen zu können.

2 Motivation und Zielsetzung

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wird als Modellorganismus zur Untersuchung vieler molekularbiologischer und physiologischer Fragestellungen eingesetzt. Da viele zellbiologische Mechanismen zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind, lassen sich Ergebnisse aus Studien mit *C. elegans* oftmals höher entwickelte Organismen übertragen.

Dies wurde in letzter Zeit häufig versucht, wenn die biologische Wirkung sekundärer Pflanzenstoffe im Hinblick auf positive Effekte auf die Gesundheit bei Menschen untersucht wird. Viele sekundäre Pflanzenstoffe zeigen verschiedene Wirkungen in *C. elegans*, die von Verringerung des oxidativen Stress bis hin zur Lebensverlängerung reichen. Unter diesen Substanzen ist das Stilben *trans*-Resveratrol, welches auch in anderen Spezies wie *Drosophila melanogaster* und Mäusen eine biologische Aktivität aufweist.

Bei der Untersuchung und Beschreibung biologischer Wirkungen wird in der Literatur oftmals außer Acht gelassen, dass eingenommene Substanzen durch den Organismus metabolisiert werden und möglicherweise Metaboliten für die Wirkung verantwortlich sind. In *C. elegans* ist jedoch nur sehr wenig über den Fremdstoffmetabolismus bekannt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Umsetzung verschiedener sekundärer Pflanzenstoffe durch *C. elegans* untersucht werden, um allgemeine Muster im Fremdstoffmetabolismus des Fadenwurms aufzudecken oder abzuleiten.

Die Metabolisierung von *trans*-Resveratrol sollte darüber hinaus in *D. melanogaster*, Mäusen, Schweinen und Menschen untersucht werden. Ein solcher Vergleich existiert bisher nicht in der Literatur, würde aber die Korrelation der beschriebenen Wirkungen und Effekte mit der Metabolisierung der Substanz in den einzelnen Spezies ermöglichen. Ein Schwerpunkt bei der Untersuchung des Metabolismus in Säugetieren sollte auf reduktiven Metaboliten von Resveratrol liegen, die nach Metabolisierung durch die Darmmikrobiota entstehen und bislang nur unzureichend in der Literatur charakterisiert sind.

3 Einleitung

Für viele biologische Fragestellungen wird *C. elegans* als Modell verwendet. Seine Größe und Transparenz, die kurze Generationszeit von drei Tagen und die einfachen Kultivierungsbedingungen machen ihn zu einem attraktiven Organismus für *in vivo*-Untersuchungen. Gleichzeitig ist seine Physiologie komplex genug, um auch biochemische Mechanismen höherer vielzelliger Organismen wie Säugetieren modellhaft zu studieren.

Der biologischen Wirkung von sekundären Pflanzenstoffen liegen komplexe Mechanismen zugrunde. Pflanzlichen Antioxidantien werden schon lange protektive Wirkungen, auch im Menschen, zugeschrieben. Ob diese aber rein auf dem antioxidativen Potenzial beruhen, oder die Substanz als Aktivator oder Inhibitor biochemischer Vorgänge fungiert, ist oft unklar.

Um zu prüfen, ob eine Wirkung über einen bestimmten Weg vermittelt wird, können in *C. elegans* biochemische Mechanismen über RNA-Interferenz (RNAi) gezielt ausgeschaltet werden. Auf diese Art wurde beispielsweise ein lebensverlängernder Effekt des Stilbens Resveratrol in *C. elegans* gezeigt, der jedoch nur zu beobachten ist, wenn ein bestimmtes Gen, *sir-2.1*, exprimiert wird (Wood et al., 2004). Andere Substanzen aus der Klasse der Flavonole konnten in *C. elegans* ebenfalls die Lebenszeit signifikant verlängern (Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012). Bei dem Versuch, diese Beobachtungen auf den Menschen zu übertragen, wird teilweise neben den biochemischen Wirkmechanismen die Metabolisierung der jeweiligen Substanz außer Acht gelassen. Die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung zu eventuell inaktiven Konjugaten zu kennen ist jedoch essenziell, um die Wirkung einer Substanz zu beschreiben und auf andere Organismen zu übertragen.

3.1 Fremdstoffmetabolismus in *Caenorhabditis elegans* und in Säugetieren

Ein weiterer Grund, *C. elegans* als Modellorganismus zu verwenden, ist die hohe Orthologie zwischen seinem und dem menschlichen Genom. 40% der Gene im Menschen, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden, sind ortholog zu Genen von *C. elegans* (Culetto und Sattelle, 2000). Gleichzeitig sind mehr als 38% der proteinkodierenden Gene von *C. elegans* auch im Humangenom vorhanden (Shaye und Greenwald, 2011). Der für sämtliche Organismen überlebenswichtige Vorgang der Entgiftung von Fremdstoffen ist beispielsweise über viele Spezies übergreifend konserviert. Der Fremdstoffmetabolismus wird daher in allen Säugetieren durch die gleichen Enzymklassen und Vorgänge bewerkstelligt, die Fremdstoffe chemisch verändern, mit dem Ziel, diese unschädlich und gut ausscheidbar machen.

Phase-I-Metabolismus

In Phase-I-Reaktionen findet eine Funktionalisierung der Fremdstoffe durch Oxidation statt, um die Konjugation mit hydrophilen Gruppen zu ermöglichen. Die bedeutendsten Funktionalisierungsreaktionen sind Oxidationen, die durch Enzyme des Cytochrom P450 (CYP)-Komplex katalysiert werden. Diese membrangebundenen Monooxygenasen ermöglichen z.B. die Einführung von Hydroxylgruppen an aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe, den Austausch eines Schwefel- gegen ein Sauerstoffatom, aber auch N-, O- und S-Dealkylierungen.

In *C. elegans* sind 86 Gene bekannt, die für CYP-Enzyme kodieren. Von 84 dieser Gene sind auch mRNA-Transkripte nachgewiesen worden (Lindblom und Dodd, 2006). Metaboliten, die durch CYP-Enzyme in *C. elegans* gebildet wurden, konnten jedoch nur in wenigen Studien detektiert werden: Nach Inkubation von *C. elegans* mit dem Entwurmungsmittel Albendazol wurde ein deacetylierter Metabolit beschrieben (Laing et al., 2010). Die methylierten Quercetin-Derivate Tamari-xetin und Isorhamnetin wurden in einer anderen Studie durch *C. elegans* zu Quercetin demethyliert (Surco-Laos et al., 2011).

Einen Hinweis auf die Aktivität bzw. fehlende Aktivität bestimmter CYP-Familien lieferten Untersuchungen von Leung et al. (2010): Nach Inkubation von *C. elegans* mit Aflatoxin B₁ wurden DNA-Schäden detektiert, die durch Addukte mit dem epoxidierten Metaboliten entstehen. Diese Epoxidierung kann in Säugetieren durch Enzyme der CYP1-, CYP2- oder CYP3-Familie katalysiert werden (Egner et al., 2003). Benzo[a]pyren bildet ebenfalls DNA-Addukte nach Epoxidierung. Diese wird in Säugetieren ausschließlich über die Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 katalysiert (Shimada, 2006). Nach Inkubation von *C. elegans* mit Benzo[a]pyren konnten jedoch keine DNA-Schäden detektiert werden, was darauf hindeutet, dass in *C. elegans* keine Enzyme der CYP1-Familie vorhanden sind.

Nicht nur zwischen Säugetieren und *C. elegans*, sondern auch zwischen verschiedenen Säugetieren gibt es unterschiedliche Aktivitäten einzelner CYP-Familien. So wurden zum Beispiel in Mäusen 72 funktionale CYP-Gene identifiziert, während im Menschen nur 27 bekannt sind (Nelson et al., 2004). Bei der Übertragung von Beobachtungen zum Metabolismus in Modellorganismen auf den Menschen müssen diese Unterschiede bedacht werden, da die Metabolisierung entscheidend für die Wirksamkeit einer Substanz ist.

Phase-II-Metabolismus

Die zweite Phase im Fremdstoffmetabolismus beinhaltet die Konjugation der (gegebenenfalls in Phase I funktionalisierten) Fremdstoffe mit meist hydrophilen Resten. Dieser Vorgang soll zum einen die Wasserlöslichkeit und das Molekulargewicht des Metaboliten erhöhen, um die Ausscheidung zu erleichtern. Andererseits können biologisch aktive funktionelle Gruppen durch Konjugation deaktiviert werden, sodass unerwünschte Wirkungen des Fremdstoffes vermindert werden.

In Säugetieren existiert eine Reihe von Enzymklassen, die verschiedene Konjugationsreaktionen katalysieren, beispielsweise Aminosäure- und Glutathionkonjugation, Acetylierungen und Methylierungen. Am bedeutendsten sind jedoch die Konjugationen mit aktivierter Glucuronsäure bzw. aktiviertem Sulfat. Glucuronide, Sulfate und gemischte Sulfo-Glucuronide sind die Hauptmetabo-

liten der meisten Arzneistoffe, die im Plasma von Nagern, Schweinen oder Menschen detektiert werden können.

In *C. elegans* hingegen sind nach aktuellem Forschungsstand noch keine Glucuronide detektiert worden. Zwar sind im Genom 72 UDP-Glucuronosyl-/UDP-Glykosyltransferasen (UGTs) und zahlreiche Sulfotransferasen kodiert (Lindblom und Dodd, 2006), es konnten jedoch bisher nur durch eine Arbeitsgruppe Sulfate des Flavonols Quercetin detektiert werden (Surco-Laos et al., 2011). Daneben wurden Glucosekonjugate der Substanz detektiert, nicht jedoch Glucuronsäurekonjugate. In anderen Untersuchungen des Phase-II-Metabolismus von *C. elegans* konnten ebenfalls Glucoside, aber auch Diglucoside sowie Phosphoglucoside der eingesetzten Testsubstanzen detektiert werden (Laing et al., 2010; Soukup et al., 2012; Stupp et al., 2012). Trotz der einzelnen Publikationen ist das Wissen über die Entgiftung von Fremdstoffen durch *C. elegans* jedoch noch sehr begrenzt.

3.2 Biologische Wirkung von *trans*-Resveratrol

Seit 1992 besitzt Resveratrol verstärkte wissenschaftliche Aufmerksamkeit, da es als Bestandteil im Rotwein für dessen schützenden Effekt auf das Herz verantwortlich gemacht wurde (Siemann und Creasy, 1992). Lange Zeit wurde Resveratrol daher als Erklärung für das „Französische Paradoxon“ verwendet. Dieser Begriff entstand aus der Beobachtung, dass in Frankreich Herz-Kreislauf-Erkrankungen weniger oft auftreten als in anderen Ländern, obwohl dort über die Nahrung viele gesättigte Fettsäuren aufgenommen werden, die nicht als gesundheitsförderlich gelten. Inzwischen sind weitere positive Eigenschaften von Resveratrol *in vitro* und in Modellorganismen beschrieben worden, sodass die Substanz als Nahrungsergänzungsmittel verkauft wird. Nicht alle Beobachtungen aus *in vitro*-Studien und daraus postulierte Effekte lassen sich jedoch auf den Menschen übertragen.

Wirkung in Modellorganismen und im Menschen

In Organismen wie Hefen, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* und einer kurzlebigen Fischart wurde gezeigt, dass Resveratrol die Lebenszeit signifikant verlängert (Howitz et al., 2003; Wood et al., 2004; Agarwal und Baur, 2011; Valenzano et al., 2006). Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht immer reproduziert werden (Bass et al., 2007). Der lebensverlängernde Effekt relativiert sich darüberhinaus, wenn er an höherentwickelten Tieren geprüft wird. So konnte zum Beispiel keine echte Lebensverlängerung, sondern lediglich ein längeres Überleben von adipösen Mäusen im Vergleich zur adipösen Kontrolle ohne Resveratrol festgestellt werden (Pearson et al., 2008). Zusätzlich wurde von erhöhter Glucosetoleranz und Insulinempfindlichkeit in Mäusen berichtet, die mit Resveratrol versetztes Futter erhielten. Das ließ den Gedanken aufkommen, Resveratrol als Antidiabetikum im Menschen einzusetzen (Timmers et al., 2012).

In der Tat konnte Resveratrol im Zusammenhang mit üblichen Pharmazeutika (Metformin, Glibenclamid) den HbA1c-Wert von Typ-2-Diabetespatienten weiter senken als das Pharmazeutikum alleine (Bhatt et al., 2012). Reines Resveratrol reduzierte die maximale und die Gesamtkonzentra-

3 Einleitung

tion von Glucose nach einer Mahlzeit, konnte jedoch die Glucose- und Insulinspiegel im Fastenzustand nicht verändern (Crandall et al., 2012).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel. In Patienten, die Statine und zusätzlich Resveratrol einnahmen, konnten LDL, Apolipoprotein-B und weitere Parameter weiter gesenkt werden als bei reiner Statin-Einnahme (Tomé-Carneiro et al., 2012). Dennoch gibt es auch Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen. Insgesamt sind die Wirkungen von Resveratrol auf den humanen Glucose- und Lipidmetabolismus noch nicht einheitlich geklärt (Cottart et al., 2014).

Weitere Studien zeigen positive Auswirkungen von Resveratrol auf Bluthochdruck, Entzündungsprozesse und oxidativen Stress. Es wurden zudem Hinweise gefunden, dass Resveratrol die Proliferation von Darmkrebszellen bremsen und die Apoptose in Lebertumoren steigern kann (Patel et al., 2010; Howells et al., 2011). Insgesamt sind die beschriebenen Effekte jedoch noch nicht einheitlich und validiert, sodass weitere Studien notwendig sind, um bisherige Beobachtungen zu bestätigen und zu präzisieren.

Bioverfügbarkeit und Metabolismus im Menschen

Ein kritischer Punkt, der die Wirksamkeit beeinflusst, ist die biologische Verfügbarkeit von Resveratrol. Bei oraler Einnahme von Resveratrol können bis zu 75% der eingenommenen Menge im Plasma, zum größten Teil als Metaboliten, nachgewiesen werden (Walle, 2011). Werden Milligramm- bis Gramm-Mengen eingenommen, erreicht die Gesamtkonzentration von Aglykon und Metaboliten im Plasma ein Maximum nach 30–60 min, fällt danach aber wieder rasch ab, da Resveratrol schnell eliminiert wird (Cottart et al., 2014). Als Hauptmetaboliten in humanem Plasma und Urin sind bei geringer Dosierung Glucuronide beschrieben worden; bei Einnahme von mehr als 250 mg haben Resveratrolsulfate einen höheren Anteil. Gemischte Sulfo-Glucuronide wurden nach längerer Verweildauer von Resveratrol im Körper (11–21 h) nachgewiesen (Cottart et al., 2014). Resveratrolmetaboliten werden in letzter Zeit vermehrt als Transport- und Speicherform diskutiert, da biologische Wirkungen trotz dieser schnellen und umfangreichen Metabolisierung beobachtet werden (Andres-Lacueva et al., 2012; Patel et al., 2013). Die Ausscheidung von Resveratrol und seiner Metaboliten erfolgt über Fäces und Urin mit einer Halbwertszeit von etwa acht Stunden. Bei kolloidaler Formulierung ist die Halbwertszeit um ein Vielfaches kürzer, obwohl ein zwei- bis vierfach höheres Konzentrationsmaximum im Plasma mit circa zweistündiger Verzögerung im Vergleich zur nichtkolloidalen Form erreicht wird (Cottart et al., 2014).

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller	Land
Gefriertrocknung Lyovac GT2	Leybold-Heraeus	D
Homogenisator FastPrep®-24	MP Biomedicals	USA
Ionisierungsgebläse Stat-Fan YIB01	Sartorius	D
Mikroskop	Leitz	D
Mikrotiterplattenleser iMark™	Bio-Rad Laboratories	USA
NMR-Spektrometer Ascend™ 500	Bruker	D
pH-Elektrode BlueLine 17 pH	Schott instruments	D
pH-Meter HI 9025	Hanna instruments	USA
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf	D
Probenroboter Microlab Star	Hamilton	USA
Reinstwasseranlage Labostar	Siemens Water Technologies	USA
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL	D
Speedvac Savant SPD131DDA	Thermo Fisher Scientific	USA
Sterilbank UVF 6.18 S	BDK	D
Thermomixer comfort	Eppendorf	D
Überkopfschüttler Hybridization Oven 6/12 V	UniEquip	D
Ultraschallbad Sonorex Digitec DT 255 H	BANDELIN electronic	D
Waagen		
Analysenwaage BP221S	Sartorius	D
Feinwaage CPA225D	Sartorius	D
Laborwaage ATL-4202	Acculab Atilon (Sartorius)	D
Wasserbad HBR 4 digital	IKA® Werke	D
Zentrifugen		
Centrifuge 5415r	Eppendorf	D
Centrifuge 5403	Eppendorf	D
2K15	Sigma Laborzentrifugen	D

4 Material und Methoden

HPLC-Säulen				
Acquity UPLC [®] HSS T3, 100 Å, 2,1 mm × 100 mm, 1,8 µm			Waters	D
Gemini [®] C18, 110 Å, 4,6 mm × 250 mm, 5 µm			Phenomenex	D
Gemini [®] C18, 110 Å, 10 mm × 250 mm, 5 µm			Phenomenex	D
PerfectSIL Target ODS-3, 3,0 mm × 250 mm, 3 µm			MZ Analysentechnik	D
SecurityGuard C18, 3,0 mm × 4 mm			Phenomenex	D
ZORBAX Eclipse Plus C18, 95 Å, 3,0 mm × 150 mm, 3,5 µm			Agilent	D
Verbrauchsmaterialien				
Filtrationsplatten (96 well) Glasfaser 0,45 µm			Phenomenex	D
Homogenisationsgefäße Matrix C			MP Biomedicals	USA
Kryoröhrchen Nalgene 1,5 ml			Thermo Fisher Scientific	USA
Kulturflaschen <i>C. elegans</i> (75 cm ²)			Orange Scientific	B
Kulturflaschen <i>Drosophila</i> (68 ml)			Greiner	D
Kulturschalen Bio-One 94 mm			Greiner	D
Reaktionsgefäße				
1,5 ml: 3810x			Eppendorf	D
2,0 ml: Safe-Lock Tubes			Eppendorf	D
SPE-Platten (96 well) Strata X-AW 60 mg/33 µm			Phenomenex	D
SPE-Säulen Strata-X 30 mg/1 ml			Phenomenex	D
SPE-Säulen Strata X-AW 60 mg/3 ml			Phenomenex	D
Spritzenfilter PTFE 4 mm × 0,2 µm			Phenomenex	D
Zentrifugenröhrchen CentriStar [™]			Corning Life Sciences	NL

HPLC-Systeme	
Modul	Modell
HPLC-DAD	Prominence UFLC, Shimadzu, Japan
Interface	CBM-20A
Degasser	DGU-20A3
Pumpen	2 × LC-20AD
Autosampler	SIL-20ACHT
Säulenofen	CTO-20AC
DAD	SPD-M20A
Software	LabSolutions Lcsolution 1.24 (Shimadzu)
UHPLC-MS/MS	Nexera UHPLC, Shimadzu, Japan
Interface	CBM-20A
Degasser	DGU-20A5
Pumpen	2 × LC-30AD
Autosampler	SIL-30AC
Säulenofen	CTO-20AC
DAD	SPD-M20A
Massenspektrometer	QTRAP [®] 5500, AB SCIEX, Deutschland
Ionenquelle	TurbolonSpray [®] , AB SCIEX, Deutschland
Software	Analyst 1.6.2, AB SCIEX, Deutschland Multiquant 2.1.1, AB SCIEX, Deutschland
UHPLC-TOFMS/MS	1290 Infinity LC System, Agilent, Deutschland
Interface	G4208A
Binäre Pumpe	G4220A
Autosampler	G4226A
Säulenofen	G1316C
DAD	G4212A
Massenspektrometer	TripleTOF [®] 5600, AB SCIEX, Deutschland
Ionenquelle	DuoSpray [™] , AB SCIEX, Deutschland
Software	Analyst TF 1.6.2, AB SCIEX, Deutschland Formula Finder 2.0.1.0, AB SCIEX, Deutschland Multiquant 2.1.1, AB SCIEX, Deutschland PeakView [™] 1.2.0.3, AB SCIEX, Deutschland

4.2 Chemikalien

Chemikalien in der Tabelle, zu denen keine Reinheit angegeben ist, waren mindestens von analytischem Reinheitsgrad. Sofern nicht anders angegeben, wurde zweifach demineralisiertes Wasser ($\sigma = 0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$) verwendet.

Testsubstanzen	Hersteller	Land
Flavon $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich	D
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich	D
Quercetin-Dihydrat $\geq 95\%$	Merck	D
Resveratrol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich	D
Vineatrol®	ACTIchem	F
Referenzsubstanzen		
Dihydroresveratrol	Toronto Research Chemicals	CDN
3,3'-Dihydroxybibenzyl	Synthese durch Dr. J. Krauss (Prof. F. Bracher, München)	D
3-Hydroxyflavon $\geq 98\%$	ABCR	D
3'-Hydroxyflavon $\geq 99\%$	ABCR	D
5-Hydroxyflavon $\geq 97\%$	ABCR	D
6-Hydroxyflavon $\geq 98\%$	ABCR	D
6-Hydroxyflavon- β -D-glucosid $\geq 95\%$	ABCR	D
7-Hydroxyflavon $\geq 98\%$	ABCR	D
Lunularin	Synthese durch Dr. J. Krauss (Prof. F. Bracher, München)	D
Piceatannol $\geq 99\%$	Alexis Biochemicals	CH
Quercetin-3-O-glucosid $\geq 99,9\%$	Carl Roth	D
Quercetin-4'-O-glucosid $\geq 96\%$	APIN	UK
Quercetin-7-O-glucosid $\geq 98\%$	APIN	UK
Quercetin-3,4'-di-O-glucosid $\geq 99,9\%$	APIN	UK
Quercetin-7,4'-di-O-glucosid $\geq 97\%$	APIN	UK
$^{13}\text{C}_6$ - <i>trans</i> -Resveratrol	Toronto Research Chemicals	CDN
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich	D

<i>trans</i> -Resveratrol-3- <i>O</i> - β -D-glucuronid	Toronto Research Chemicals	CDN
<i>trans</i> -Resveratrol-3- <i>O</i> - β -D-glucuronid-D6	Toronto Research Chemicals	CDN
<i>trans</i> -Resveratrol-4'- <i>O</i> - β -D-glucuronid	Toronto Research Chemicals	CDN
<i>trans</i> -Resveratrol-4'- <i>O</i> - β -D-glucuronid-D6	Toronto Research Chemicals	CDN
<i>trans</i> -Resveratrol-3-Sulfat, Natrium-Salz	Toronto Research Chemicals	CDN
Lösungsmittel		
Acetonitril HiPerSolv [®] CHROMANORM [®]	VWR	D
Dimethylsulfoxid EMSURE [®]	Merck	D
Ethanol, absolut	Merck	D
Ethylacetat EMSURE [®]	Merck	D
Methanol HiPerSolv [®] CHROMANORM [®]	VWR	D
Methanol-d ₄ , 99,9 Atom-% D	Sigma-Aldrich	D
2-Propanol EMSURE [®]	Merck	D
Enzyme und Cofaktoren		
Glucose-6-phosphatase aus Hasenleber	Sigma-Aldrich	D
β -Glucuronidase aus Rinderleber, Typ B-3	Sigma-Aldrich	D
Hexokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Typ III	Sigma-Aldrich	D
Saure Phosphatase aus Weizenkeimlingen	Sigma-Aldrich	D
Sulfatase aus <i>Helix pomatia</i> , Typ H-1	Sigma-Aldrich	D
Uridin-5'-diphospho-galactose, Dinatrium-Salz	Sigma-Aldrich	D
Uridin-5'-diphospho-glucose, Dinatrium-Salz	Sigma-Aldrich	D
Puffersubstanzen		
Ameisensäure für MS	Sigma-Aldrich	D
Ammoniumacetat $\geq 99,99\%$	Sigma-Aldrich	D
Ammoniumformiat $\geq 99\%$	Fluka	D
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BIS-TRIS)	Sigma-Aldrich	D
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	D
Essigsäure		
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	D
Kaliumhydroxid	Merck	D
Natriumhydroxid	Merck	D
Triethylamin	Sigma-Aldrich	D
Trikaliumcitrat $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	Merck	D

4 Material und Methoden

Trinatriumcitrat · 2 H ₂ O	Merck	D
Zitronensäure · 1 H ₂ O	Merck	D
Chemikalien für Medien		
Agar, hochvernetzend	Sigma-Aldrich	D
Agar, standard (<i>Drosophila</i>)	Sigma-Aldrich	D
Calciumchlorid · 2 H ₂ O	Merck	D
Cholesterol ≥ 99%	Sigma-Aldrich	D
Dinatrium-EDTA	Merck	D
Eisen(II)sulfat · 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich	D
Glycerol	Merck	D
Hefeextrakt	Bacto	D
Kupfer(II)sulfat · 4 H ₂ O	Merck	D
Magnesiumchlorid · 6 H ₂ O	Merck	D
Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	Merck	D
Maismehl	Sigma-Aldrich	D
Mangan(II)chlorid · 4 H ₂ O	Merck	D
Methyl-4-hydroxybenzoat	Sigma-Aldrich	D
Natriumchlorid	Merck	D
Natriumhypochlorit 6–14% Cl ₂	Merck	D
Nystatin, Suspension in DPBS	Sigma-Aldrich	D
Pepton aus Casein	Merck	D
Pepton aus Fleisch	Merck	D
Propionsäure	Merck	D
Saccharose	Merck	D
Zinksulfat · 7 H ₂ O	Merck	D
Sonstige Chemikalien		
Coomassie® Brillantblau G 250	Serva Electrophoresis	D
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	D
Kalibrierlösung für TOFMS	AB SCIEX	D
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, ≥ 98%	Sigma-Aldrich	D
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat)	Serva Electrophoresis	D

4.3 Untersuchung des Metabolismus in *C. elegans*

Der Fremdstoffmetabolismus kann in zwei Phasen eingeteilt werden, in denen Xenobiotika durch verschiedene enzymatisch katalysierte Reaktionen modifiziert und entgiftet werden können: Eine Funktionalisierungsreaktion (Phase I) fügt, falls erforderlich, durch Oxidation oder Reduktion funktionelle Gruppen in den Fremdstoff ein oder legt diese durch Hydrolyse frei. Dadurch wird die Konjugation (Phase II) mit hydrophilen Molekülen ermöglicht, welche schließlich die Ausscheidung aus dem Organismus erleichtern.

Bisher existieren nur wenige Veröffentlichungen zum Phase-I- und -II-Metabolismus in *C. elegans*. Für die vorliegende Arbeit wurden daher Testsubstanzen ausgewählt, deren Metabolisierung Einblicke in diese Phasen des Fremdstoffmetabolismus sowie die Ausscheidung der Metaboliten ermöglicht.

4.3.1 Kultivierung der Nematoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit Nematoden des *C. elegans* Wildtyps Bristol N2 durchgeführt. Anfangspopulationen von *C. elegans* sowie von *Escherichia coli* OP50 als Nahrungsquelle wurden vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) der Universität Minnesota, USA, bezogen.

Die Nematoden wurden in Petrischalen auf NGM-Agar („nematode growth medium“) bei 20 °C kultiviert. Bei der Kultivierung ohne Testsubstanzen wurden jeweils 300 µl einer Suspension von *Escherichia coli* OP50 in DYT-Medium auf eine 9 cm große Kulturschale mit NGM-Agar pipettiert und diese 24 h lang bei 20 °C inkubiert, bevor *C. elegans* darauf kultiviert wurde. Die Kulturen wurden alle drei bis vier Tage erneuert. Dabei wurde ein Teil der alten Kultur mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen herausgeschnitten und auf eine neue, mit *E. coli* OP50 vorbereitete NGM-Agarplatte umgesetzt.

Die Inkubation von *C. elegans* mit den Testsubstanzen zur Ermittlung des Metabolitenprofils fand auf NGM-Agar statt. Experimente mit Quercetin zur Untersuchung der Exkretion gebildeter Metaboliten wurden zusätzlich in Flüssigmedium durchgeführt. Hierbei fand die Kultivierung in Kulturflaschen mit S-Medium statt.

NGM-Agar	
NaCl	3,0 g
Pepton aus Casein	2,5 g
Agar	17,0 g

Mit Wasser auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Im Wasserbad auf 60 °C abkühlen und unter sterilen Bedingungen 1 ml MgSO₄ (1 M), 1 ml Cholesterol (5 g/l in Ethanol), 0,5 ml CaCl₂ (1 M) und 25 ml KH₂PO₄-Puffer (1 M, pH = 6,0) aus sterilfiltrierten Lösungen, sowie 20 ml Nystatin-Suspension zugeben. In 9 cm große Kulturschalen wurden jeweils 30 ml Agar gegossen. Nach dem Verfestigen über Nacht wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert.

4 Material und Methoden

KH ₂ PO ₄ -Puffer, 1 M, pH = 6,0	
KH ₂ PO ₄	108,53 g
K ₂ HPO ₄	35,28 g

In Wasser lösen, mit Kalilauge auf pH = 6,0 einstellen, im Messkolben mit Wasser auf 1 l auffüllen, in Aliquoten von 25 ml autoklavieren.

S-Medium	
zu S-Basal unter sterilen Bedingungen zugeben:	
Kaliumcitratpuffer pH = 6,0	10 ml
Spurenelemente-Lösung	10 ml
CaCl ₂ -Lösung 1 M (wässrig)	3 ml
MgSO ₄ -Lösung 1 M (wässrig)	3 ml
Nystatin-Suspension	20 ml

Bei 4 °C lagern. Pro Kulturflasche (75 cm²) wurden 45 ml Medium verwendet.

S-Basal	
NaCl	5,85 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
KH ₂ PO ₄	6,00 g
Cholesterol-Lösung 5 g/l in Ethanol	1,0 ml

Mit Wasser auf 1 l auffüllen und durch Autoklavieren sterilisieren.

Kaliumcitratpuffer pH = 6,0	
Zitronensäure-Monohydrat	4,0 g
Trikaliumcitrat-Monohydrat	58,7 g

Mit Wasser auf 200 ml auffüllen und durch Autoklavieren sterilisieren.

Spurenelemente-Lösung	
Na ₂ EDTA	1,86 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,69 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,20 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,29 g
CuSO ₄ · 4 H ₂ O	0,0025 g

Mit Wasser auf 1 l auffüllen, durch Autoklavieren sterilisieren, filtrieren (0,45 µm), dunkel lagern.

Synchronisation der Wurmkultur

Um aus einer Kultur mit gemischten Altersstadien der Nematoden eine synchronisierte Kultur herzustellen, wird diese mit alkalischer Natriumhypochloritlösung (Bleach-Lösung) behandelt. Dabei werden sämtliche Nematoden abgetötet, während die Eier intakt bleiben. Bei längerer Behandlung lässt das Hypochlorit zudem die Cuticula der Nematoden aufplatzen, wodurch auch ungelegte Eier freigesetzt werden. Die Eier können danach in M9-Puffer kultiviert werden; das Schlüpfen der L₁-Larven findet zeitgleich statt.

Für die Synchronisation wurden mehrere NMG-Agarplatten mit überwiegend adulten Würmern und vielen Eiern verwendet. Die Würmer wurden durch mehrfaches Spülen mit wenig M9-Puffer von der Agarplatte gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Auffüllen mit M9-Puffer auf 14 ml wurde 3 min bei 1500 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 2 ml abgesaugt. Das Wurmpellet wurde durch Zugabe von M9-Puffer, kurzes Umschütteln und Zentrifugieren für 3 min bei 1500 g und 20 °C gewaschen. Nach erneutem Absaugen auf 2 ml wurden 4 ml Bleach-Lösung zugegeben und ca. 5 min kräftig geschüttelt, wobei die Vitalität der Würmer und die Freigabe der Eier unter dem Mikroskop kontrolliert wurden. Nachdem keine lebenden Würmer mehr sichtbar waren, wurde sofort für 1 min bei 1500 g und 20 °C zentrifugiert, der Überstand auf ca. 2 ml abgesaugt und zügig mit M9-Puffer wie beschrieben gewaschen, bis kein Chlorgeruch mehr wahrnehmbar war. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit M9-Puffer auf 6 ml aufgefüllt, das Wurmpellet resuspendiert und über Nacht im Überkopfschüttler bei 20 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Kultur einmal mit M9-Puffer gewaschen und auf lebende L₁-Larven untersucht. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand bis auf ca. 1 ml abgenommen und das Pellet aus L₁-Larven sowie abgetöteten Nematoden an den Rand mehrerer NGM-Agarplatten pipettiert. Die Platten wurden zwei Tage bei 20 °C inkubiert. Die bis dahin zum L₄-Stadium herangewachsenen Nematoden wurden mit M9-Puffer heruntergespült, wobei darauf geachtet wurde, die aufgetragenen toten Nematoden nicht mitzureißen. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 3 min bei 1500 g zentrifugiert und der Rückstand dreimal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand bis auf ca. 2,5 ml abgenommen. Das erhaltene Wurmpellet wurde zur Inkubation mit den Testsubstanzen auf NGM-Agar verwendet.

M9-Puffer	
KH ₂ PO ₄	3,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,0 g
NaCl	5,0 g

Mit Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren und nach dem Abkühlen 1 ml MgSO₄-Lösung (1 M, wässrig) zugeben.

4 Material und Methoden

Bleach-Lösung	
5 M KOH	1,0 ml
NaOCl 6–12%	1,0 ml
H ₂ O, steril	8,0 ml

Die Lösung wurde jedes mal frisch hergestellt.

Kryokonservierung der Kultur

Zur Erhaltung der Wurmkultur wurden L₁-Larven bei –80 °C gelagert. Hierzu wurde die Kultur zunächst synchronisiert. Nach Inkubation der Eier über Nacht und Schlüpfen der L₁-Larven wurden diese einmal mit M9-Puffer gewaschen, 3 min bei 1 500 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf 2 ml abgenommen. Es wurden 2 ml Einfriermedium zugegeben und durch Pipettieren gut vermischt. Die Suspension wurde auf acht Kryo-Röhrchen zu je 0,5 ml verteilt und zunächst über Nacht bei –20 °C, danach bei –80 °C gelagert.

Zum Reaktivieren der tiefgefrorenen Kultur wurde eine NGM-Agarplatte wie oben beschrieben mit *E. coli* OP50 vorbereitet. Der Inhalt eines Kryo-Röhrchens wurde durch Erwärmen mit der Hand zügig aufgetaut und unverzüglich auf die vorinkubierte Agarplatte pipettiert. Nach vier bis fünf Tagen wurde die Platte unter dem Mikroskop betrachtet. Der am dichtesten bewachsene Teil wurde mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und auf eine mit *E. coli* OP50 vorinkubierte NGM-Agarplatte umgesetzt.

Einfriermedium	
NaCl-Lösung, 1 M	20 ml
KH ₂ PO ₄ -Puffer, 1 M, pH = 6,0	10 ml
Glycerol	60 ml

Mit Wasser auf 200 ml auffüllen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen 600 µl MgSO₄-Lösung (0,1 M) zugeben. Bei 4 °C lagern.

Kultivierung der Bakterien

Als Nahrungsquelle für die Nematoden wurde eine Suspension des uracilauxotrophen, nicht pathogenen *E. coli*-Stammes OP50 in DYT-Medium verwendet. Durch die begrenzte Menge Uracil im NGM-Agar wird zu starkes Wachstum und damit ein Überdecken der Nematoden durch die Bakterien verhindert. Aus der bei –80 °C gelagerten OP50-Stammssuspension wurde mit einer sterilen Impföse ein Teil entnommen und in 50 ml DYT-Medium überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die so erhaltene Arbeitssuspension wurde maximal eine Woche bei 4 °C gelagert, danach durch Entnahme von 300 µl in 50 ml frisches DYT-Medium und anschließender Inkubation für 6–8 h bei 37 °C erneuert.

Um eine Metabolisierung der Testsubstanzen durch Bakterien bei der Inkubation von *C. elegans* mit den Testsubstanzen zu vermeiden, wurde für diese Experimente eine Suspension abgetöteter

Bakterien verwendet. Hierzu wurden 300 µl der OP50-Arbeitssuspension entnommen, in 50 ml frisches DYT-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag fünf Minuten bei 8 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 10 ml abgenommen, das Bakterienpellet im verbleibenden Medium resuspendiert und 30 min im Wasserbad unter zwischenzeitlichem Umschütteln auf 65 °C erhitzt, um die Bakterien abzutöten. Die abgetöteten Bakterien dienten nun zur Herstellung der Polyphenolplatten zur Inkubation von *C. elegans* mit den Testsubstanzen.

DYT-Medium	
Pepton aus Fleisch	8,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	2,5 g

Mit Wasser auf 500 ml auffüllen. In Aliquoten von 50 ml autoklavieren, bei 4 °C lagern.

4.3.2 Inkubation mit den Testsubstanzen

Um *C. elegans* mit den Testsubstanzen zu inkubieren, wurden NGM-Agarplatten zunächst mit abgetöteten *E. coli* OP50 sowie einer Lösung der Testsubstanz versetzt. Pro Experiment wurden zwei Ansätze zu je fünf NGM-Agarplatten hergestellt. Eine Mischung aus 500 µl der durch Hitze abgetöteten *E. coli* OP50-Kultur sowie 300 µl der Testsubstanz (10 mM in Ethanol:Tween 20, 92:8, nach Volumen) wurde in die Mitte jeder Platte pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt, ohne den Rand zu berühren. In 30 ml Agarvolumen ergab sich somit eine Endkonzentration der Testsubstanzen von 100 µM. Vor Zugabe der synchronisierten Wurmkultur wurden die Testsubstanz- und Kontrollplatten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Kontrolle wurden pro Experiment und Inkubationszeit je zwei Ansätze mit einer Mischung aus 500 µl der abgetöteten OP50-Kultur und 300 µl Lösungsmittel unter denselben Bedingungen hergestellt.

Die mit *E. coli* OP50 und der Testsubstanz versetzten NGM-Agarplatten, sowie die Kontrollplatten, wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde die synchronisierte Kultur von *C. elegans* L₄-Larven auf die Platten verteilt und für die vorgesehene Inkubationszeit bei 20 °C inkubiert. In Tabelle 4.1 sind alle Substanzen und ihre Inkubationszeiten aufgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Würmer mit ca. 6 ml M9-Puffer von den Platten gespült und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dabei wurde die Suspension der ersten Platte eines Ansatzes zum Spülen der jeweils folgenden verwendet. Nach Zentrifugieren der Suspension für 3 min bei 1 500 g und 20 °C wurde der Überstand abgenommen und bei –80 °C aufbewahrt. Das Wurmpellet wurde viermal mit M9-Puffer, zweimal mit BSA-Lösung und weitere zweimal mit M9-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen und Zentrifugieren wurde der Rückstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut 3 min bei 1 500 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand fast komplett abgenommen. Die so erhaltenen Wurmpellets wurden bis zur Aufarbeitung bei –80 °C aufbewahrt.

Tabelle 4.1: In *C. elegans* untersuchte Testsubstanzen mit zugehöriger Inkubationszeit bei 20 °C. Alle Experimente wurden mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt.

Substanz	Inkubationszeit [h]	Ziel des Experiments
Flavon	24, 48	Phase-I- und -II-Metabolismus
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	24	Phase-II-Metabolismus
Quercetin	24, 48	Phase-II-Metabolismus, Exkretion
Resveratrol	3, 6, 12, 24, 48, 72	Kinetik der Phase-II-Metaboliten
Resveratrol	24	Präparation von Metaboliten
Resveratrol	48	Phase-II-Metabolismus

Inkubation mit *C. elegans*-Homogenat

Um eine spezifische Umsetzung zu Glucosiden zu erhalten, wurden die Testsubstanzen Resveratrol und Quercetin mit einem Homogenat aus *C. elegans* L₄-Larven sowie Uridin-5'-diphosphoglucose (UDPG) inkubiert. Dazu wurde eine Wurmkultur wie beschrieben synchronisiert und auf NGM-Agar bis zum L₄-Stadium kultiviert. Die Larven wurden daraufhin von den Platten gespült, mehrfach mit M9-Puffer gewaschen und homogenisiert.

Jeder Inkubationsansatz bestand aus 20 µl Ringer-Lösung¹, 10 µl M9-Puffer, 10 µl der Testsubstanz (1 mM in Ethanol:Tween 20, 92:8 v/v), 10 µl UDPG (30 µM in Wasser) sowie 50 µl L₄-Homogenat. Verschiedene Kontrollansätze wurden ohne *C. elegans*, ohne UDPG, sowie ohne Testsubstanz durchgeführt. Alle Ansätze wurden 48 h bei 20 °C unter Schütteln (500 min⁻¹) inkubiert. Die Extraktion erfolgte analog zu den Homogenaten aus *C. elegans*, die lebend mit den Testsubstanzen inkubiert wurden.

Bakterienkontrollen

Analog zur Inkubation von *C. elegans* wurden NGM-Agarplatten hergestellt, die nur mit abgetöteten *E. coli* OP50 und den Testsubstanzen versetzt wurden. Dazu wurde eine Mischung aus 500 µl der durch Hitze abgetöteten *E. coli* OP50-Kultur sowie 300 µl der Testsubstanz (10 mM in Ethanol:Tween 20, 92:8, v/v) in die Mitte jeder Platte pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur, danach 48 h bei 20 °C gelagert. Nach dem Abspülen und Waschen mit M9-Puffer auf gleiche Weise wie nach der Inkubation mit *C. elegans* wurden die Bakterienpellets bis zur Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Inkubation von Knockout-Würmern mit Quercetin

Um weitere Hinweise auf den Mechanismus der Konjugation in *C. elegans* zu erhalten, sollte die Genexpression bestimmter Konjugationsenzyme ausgeschaltet werden. Hierzu wurden Experimente in der Arbeitsgruppe von Dr. Britta Spanier an der Technischen Universität München durchgeführt. Durch RNA-Interferenz (RNAi) wurden die Gene *ugt-13* und *ugt-63* ausgeschaltet, die für zwei UDP-Glucuronosyl-/UDP-Glykosyltransferasen kodieren und Homologe im Menschen besitzen. Würmer mit ausgeschaltetem *ugt-13*- bzw. *ugt-63*-Gen wurden kultiviert; ihre L₄-Larven

¹7,2 g NaCl, 0,23 g CaCl₂ · 2H₂O, 0,37 g KCl in 1 l Wasser, autoklaviert.

wurden wie bei den Experimenten mit Wildtyp-Würmern für 48 h mit 100 μM Quercetin inkubiert. Als Kontrollen wurden Würmer kultiviert und inkubiert, die lediglich mit dem RNAi-Vektor ohne interferierende RNA (siRNA) behandelt wurden.

4.3.3 Umsetzung von Metabolit R6 mit Phosphatasen

Um genauere Informationen über den Hauptmetaboliten R6 von Resveratrol zu erhalten, sollte der Metabolit mit Phosphatase bzw. Glucose-6-Phosphatase enzymatisch umgesetzt werden. Hierzu wurden die Eluate mehrerer chromatographischer Analysen zur Retentionszeit von R6 aufgesammelt und durch Gefrierdrying konzentriert. Nach erneutem Lösen in Wasser wurden Aliquots zu je 50 μl entnommen.

Zur Umsetzung durch saure Phosphatase aus Weizenkeimlingen wurden die Aliquots mit jeweils 100 μl Natriumcitratpuffer (90 mM, pH = 4,8) versetzt. Nach Zugabe von 10 μl Enzymlösung (0,22 U ml^{-1} in Wasser) wurden die Ansätze 40 min bei 37 °C unter Lichtausschluss und Schütteln (500 s^{-1}) inkubiert. Kontrollen ohne Enzym wurden mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 400 μl Methanol, die Kontrollen zusätzlich mit 10 μl Enzymlösung versetzt und auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (5 min, 8 600 $\times g$, 4 °C) wurden alle Proben mittels HPLC analysiert und mit der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid verglichen.

Nach Analyse der mit saurer Phosphatase umgesetzten Proben konnte die Dephosphorylierung des Phosphoglykosids bestätigt werden. Daraufhin wurden weitere Aliquots von R6 mit 150 μl BIS-TRIS-Puffer (100 mM, pH = 6,5) und 10 μl einer Lösung von Glucose-6-Phosphatase (1 U ml^{-1} in Wasser) versetzt und 40 min bei 37 °C unter Lichtausschluss und Schütteln (500 s^{-1}) inkubiert. Erneut wurden Kontrollen ohne Enzym mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 400 μl Methanol, die Kontrollen zusätzlich mit 10 μl Enzymlösung versetzt und auf Eis gekühlt. Auch diese Proben wurden nach Zentrifugation (5 min, 8 600 $\times g$, 4 °C) mittels HPLC analysiert und mit der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid verglichen.

4.3.4 Isolation und NMR-Spektroskopie von Metabolit R6

Um die Struktur des Hauptmetaboliten R6 aufzuklären, sollte ein NMR-Spektrum der Substanz aufgenommen werden. Dazu musste R6 in Reinform und möglichst großer Menge isoliert werden.

Die Extrakte mehrerer Inkubationen von *C. elegans* mit Resveratrol wurden mittels Festphasenextraktion (SPE) aufgearbeitet. Säulenmaterial war ein schwacher Anionenaustauscher, der mit je 1 ml Methanol und Wasser konditioniert bzw. equilibriert wurde. Nach Aufgabe der Probe wurde mit je 1 ml Wasser, wässriger Ameisensäure (2%, v/v) und wässrigem Methanol (50%, v/v) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml ammoniakalischem Methanol (0,5%, v/v). Die Eluate wurden unter einem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft, in wässrigem Methanol (30%, v/v) aufgenommen und wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben chromatographisch mit Volumenüberladung getrennt. Zur Elutionszeit von Metabolit R6 wurde das Eluat in eine Vorlage aus 2 ml Ammoniumacetat-Puffer (0,2 M, pH = 7,0) und 1 ml Natriumhydrogencarbonat (0,1 M) eingeleitet und in 6–7 ml großen Aliquots gefriergetrocknet.

Die gefriergetrockneten Aliquots wurden in insgesamt 1 ml wässrigem Methanol (10%, v/v) gelöst und mittels SPE wie oben beschrieben von Puffersalzen und Nebenprodukten befreit. Das

Eluat wurde in einem Braunglasfläschchen unter einem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft, mit Argon überschichtet und bis zur NMR-Spektroskopie bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Messung des NMR-Spektrums wurde der isolierte Metabolit R6 in 0,5 ml Methanol- d_4 gelöst und in ein NMR-Röhrchen (5 mm) überführt. In einem 500 MHz-NMR-Spektrometer wurde ein ^1H -NMR aus 10 000 Scans der Lösung aufgenommen.

4.4 Metabolisierung von Resveratrol in *Drosophila melanogaster*

Alle Experimente wurden mit Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) der Linie w1118 durchgeführt, die vom Bloomington Drosophila Stock Center (#5905) bezogen wurden. Die Kultivierung und Inkubation von *D. melanogaster* mit Resveratrol wurde im Arbeitskreis von Jun.-Prof. Dr. Anika Wagner an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Ausgewachsene Fliegen wurden nach Geschlecht getrennt und in Gruppen von 50 Fliegen pro Kulturgefäß (68 ml) bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40–60% Luftfeuchtigkeit in einem 12 h/12 h Tag/ Nacht-Zyklus kultiviert.

Als Nährmedium diente übliches Maismehl-Agar-Medium, das nach Hoffmann et al. (2013) hergestellt wurde. Es enthielt 5% Hefeextrakt (w/v), 5% Saccharose (w/v), 8,6% Maismehl (w/v), 0,5% Agar (w/v), 0,03% Propionsäure (v/v) und 0,3% Methyl-4-hydroxybenzoat (v/v). Zum Medium für die Resveratrolgruppe wurden zusätzlich 0,5 mM Resveratrol (gelöst in DMSO) hinzugefügt, während das Medium für die Kontrollgruppe mit dem gleichen Volumen reinen DMSOs versetzt wurde.

Durch den im Medium enthaltenen Konservierungsstoff Methyl-4-hydroxybenzoat könnte eine Konkurrenz um die Konjugation an seiner Hydroxylgruppe und jenen von Resveratrol entstehen. Aus diesem Grund wurden die gleichen Experimente mit Medium wiederholt, das wie beschrieben, jedoch ohne Konservierungsstoff hergestellt wurde.

Die Inkubation mit Resveratrol bzw. der Kontrolle dauerte jeweils neun Tage. Danach wurden die Fliegen bis zur Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.5 Metabolisierung von Resveratrol in Säugetieren

4.5.1 Fütterungsstudie mit Mäusen

Die Fütterungsstudie mit Mäusen wurde bis zum Schritt der Probenaufarbeitung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hannelore Daniel an der Technischen Universität München durchgeführt.

Zwölf männliche Hausmäuse (*Mus musculus*, Stamm C57BL/6N) wurden in einem 12:12 h Tag:Nacht-Zyklus bei 22 °C mit freiem Zugang zu Standardfutter und Wasser gehalten. Im Alter von sieben Monaten wurden die Tiere an ein vordefiniertes Trockenfutter gewöhnt. Nach dreitägiger Eingewöhnungsphase wurden die Mäuse in zwei Gruppen ($n = 6$) eingeteilt, die weiterhin definiertes Trockenfutter (Kontrollgruppe) oder Trockenfutter mit zugesetztem Resveratrol (400 mg/kg Futter) erhielten. Während der folgenden 14 Tage wurden die Tiere beobachtet und täglich auf Krankheit oder Tod untersucht. Alle drei Tage wurden die Tiere gewogen und die Futtermittelaufnahme bestimmt; demnach ergab sich eine mittlere Resveratrolaufnahme von 35 mg/kg KG (Tabelle 4.2). Nach der 14-tägigen Behandlungsphase wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Unmittelbar danach wurden Blutproben durch Punktierung des Herzens genommen. Zusätzlich wurden vor Beginn der Studie und am letzten Studientag Urinproben gesammelt. Alle Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei –80 °C aufbewahrt.

Die Studie war durch die Deutsche Tierschutzkommission genehmigt (Referenznummer 55.2-1-54-2532-22-11) und wurde im Einklang mit den deutschen Tierschutzleitlinien durchgeführt.

Tabelle 4.2: Körpergewicht und mittlere tägliche Nahrungsaufnahme in der Maus-Studie (Mittelwerte der Kontroll- und Resveratrol-Gruppe).

	Tage ab Studienbeginn											
	0		1		4		7		11		14	
	KG*	NA [†]	KG	NA	KG	NA	KG	NA	KG	NA	KG	NA
Kontr.	32,4	—	32,2	2,0	32,5	3,1	33,6	2,9	33,6	3,3	34,5	2,8
RES	31,6	—	31,0	1,9	31,8	3,2	32,0	2,8	32,0	3,2	33,1	2,8

*Körpergewicht [g], [†]Nahrungsaufnahme [g]

4.5.2 Fütterungsstudie mit Schweinen

Die Fütterungsstudie mit Schweinen wurde bis zum Schritt der Probenaufarbeitung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Breves an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

In dieser Studie wurde nicht reines *trans*-Resveratrol eingesetzt, sondern ein industriell hergestellter Weinrebenextrakt Vineatrol[®], der 7,7% *trans*-Resveratrol enthält. Darüber hinaus sind die Stilbenmono- und -oligomere ϵ -Viniferin (14,6%), Ampelopsin A (3,4%), Hopeaphenol (1,8%), *trans*-Piceatannol (0,6%), R-2-Viniferin (Vitisin A, 1,6%), Miyabenol C (2,5%), R-Viniferin (Vitisin B, 2,5%) und *iso*- ϵ -Viniferin (2,4%) in Vineatrol[®] enthalten (Bode et al., 2013).

Das Studiendesign wurde durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt. Vier männliche, kastrierte Schweine im Alter von 6–8 Wochen (Körpergewicht 20–25 kg) wurden zwei Wochen lang an eine polyphenolfreie Diät gewöhnt, die sie täglich am Morgen und Abend erhielten. Wasser stand jederzeit frei zur Verfügung. Nach der

Eingewöhnungsphase wurden die Tiere in zwei Gruppen ($n = 2$) geteilt. Nach Fasten über Nacht wurde allen Tieren Blut abgenommen ($t = 0$). In den folgenden drei Tagen erhielten die Tiere einer Gruppe Futter mit Vineatrol[®] in einer Konzentration von 5 mg/kg KG, die der anderen Gruppe mit einer Konzentration von 50 mg/kg KG (jeweils berechnet auf ein durchschnittliches Körpergewicht von 30 kg). Weitere Blutentnahmen erfolgten nach 15, 30, 45, 60 und 90 min sowie nach 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 h.

4.5.3 Humane Interventionsstudie

Die humane Interventionsstudie wurde am Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung des Max Rubner-Instituts Karlsruhe unter Aufsicht von Prof. Dr. Achim Bub durchgeführt.

Zwölf gesunde männliche Probanden im Alter von 19 bis 28 Jahren mit einem BMI zwischen 20 und 25 kg m⁻² wurden für eine einfach verblindete Interventionsstudie im Cross-Over-Design rekrutiert. Das Studienprotokoll wurde von der Landesärztekammer Baden-Württemberg genehmigt (F-2010-094). Empfehlungen des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen („Deklaration von Helsinki“) wurden eingehalten. Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis vor der Studie.

Die Probanden wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen ($n = 6$) aufgeteilt. Zu Beginn der 24-stündigen Interventionsphase erhielten die Probanden beider Gruppen eine äquivalente Menge von 0,5 mg *trans*-Resveratrol pro kg Körpergewicht in Kapselform. Eine Gruppe erhielt den Weinrebenextrakt Vineatrol[®] (Abschnitt 4.5.2), die andere Gruppe Vineatrol[®]SOL, eine kolloide Lösung von 10% Vineatrol[®] in einer Mischung aus Speiseölen und für Lebensmittel zugelassenen Emulgatoren, durch die eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht werden soll.

Unmittelbar vor der Darreichung wurden Blut- und Urinproben von allen Probanden genommen ($t = 0$). Danach wurden Blutproben nach 20, 40, 60 und 90 min sowie nach 2, 3, 4,5, 6, 8, 12 und 24 h genommen. Der Urin wurde in den Phasen von 0–4 h, 4–8 h, 8–12 h und 12–24 h auf Eis gesammelt. Nach einer einwöchigen Washout-Phase, in der die Probanden eine strikt polyphenolfreie Diät einhielten, wurde die Intervention unter Umkehrung der Gruppen wiederholt: Probanden, die vorher den Weinrebenextrakt erhielten, bekamen nun die kolloide Formulierung und umgekehrt. Blut- und Urinproben wurden wie bei der ersten Intervention gesammelt.

4.6 Strukturaufklärung und Quantifizierung der Metaboliten

Unabhängig von der Probe und der eingesetzten Testsubstanz, erfolgte die Trennung der Metaboliten über Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) nach vorheriger Extraktion. Je nach Probenmatrix wurde flüssig-flüssig oder über SPE extrahiert. Zur Detektion reduktiver Metaboliten von Resveratrol in Säugetieren wurden die gebildeten Konjugate vor Extraktion enzymatisch hydrolysiert.

Nach erfolgreicher Trennung der Metaboliten wurde ein Vergleich mit vorhandenen Referenzsubstanzen (siehe Tabelle auf Seite 12) vorgenommen. Da diese nicht für alle Metaboliten verfügbar waren, wurden alle Metaboliten zusätzlich über hochauflösende Massenspektrometrie (TOFMS) analysiert. Die akkurate Masse der Moleküle und Fragmente sowie das Fragmentierungsmuster im Massenspektrometer dienten als Grundlage zur Strukturaufklärung unbekannter Metaboliten.

Die Quantifizierung von Metaboliten, die in *C. elegans* gebildet wurden, erfolgte über einen Diodearraydetektor (DAD) mit Bezug auf die Peakfläche der jeweiligen Testsubstanz bei einer optimierten Detektionswellenlänge. Referenzsubstanzen der Resveratrol-Metaboliten aus Säugetieren waren zum Teil verfügbar, sodass eine Quantifizierung über massenselektive Detektion mittels MRM-Experiment möglich war.

4.6.1 Probenvorbereitung

Proben aus *C. elegans*

Die gewaschenen Pellets der mit den Testsubstanzen inkubierten Nematoden und Bakterien wurden zur Analyse zunächst homogenisiert. Hierzu wurde die Wurm- bzw. Bakterien-Suspension jeder Probe mit einer Glas-Pasteurpipette in 2 ml Aufschlussgefäße überführt, welche mit 1 mm großen Quarzglaskugeln gefüllt waren. Die Proben wurden im Homogenisator dreimal bei 4 m s^{-1} für jeweils 15 s homogenisiert. Zwischen den drei Schritten wurden die Proben jeweils 5 min lang auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Aufschlussgefäße am Boden durchstoßen, die Homogenate in ein neues Gefäß zentrifugiert und bis zur Extraktion bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Analyse wurde jeweils ein Aliquot des Homogenats entnommen, das gleiche Volumen Methanol zugegeben und 30 s kräftig geschüttelt. Anschließend wurde 5 min bei $16\,000 \text{ g}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand in ein LC-Probengefäß überführt, das unmittelbar zur chromatographischen Analyse eingesetzt wurde.

Proben aus *D. melanogaster*

Jeweils 25 Fliegen wurden in ein Aufschlussgefäß (2 ml) mit Quarzglaskugeln (1 mm) überführt und auf Eis mit $200 \text{ } \mu\text{l}$ Triethylammoniumacetat-Puffer (1 M, $\text{pH} = 7,0$), 1 ml ACN:Methanol (1:1, v/v) und $5 \text{ } \mu\text{l}$ internem Standard ($^{13}\text{C}_6$ -Resveratrol) versetzt. Die Proben wurden im Homogenisator dreimal 15 s bei 4 m s^{-1} homogenisiert. Zwischen den drei Schritten wurden die Proben 5 min lang auf Eis gekühlt. Die Homogenate wurden 10 min im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (10 min bei $23\,000 \text{ g}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Die Überstände wurden in der Speedvac zur Trockne

4 Material und Methoden

eingedampft; der Rückstand wurde in 70 μl Methanol (30% v/v in Wasser) aufgenommen, erneut zentrifugiert (10 min bei 23 000 g und 4 °C) und zur chromatographischen Analyse verwendet.

Plasmaproben aus Säugetieren

Aliquote von 100 μl der Plasmaproben aus der Maus-, Schwein- und Humanstudie wurden auf Eis mit 400 μl Wasser und 5 μl internem Standard versetzt (isotopenmarkierte Referenzsubstanzen, siehe Seite 12). Die Proben zur Messung der Konjugate von Resveratrol und Derivaten wurden über SPE an einem Probenroboter aufgearbeitet. Dabei wurden alle Proben zunächst mit 1 ml Phosphorsäure (50 mM in Wasser) angesäuert. Die Extraktionsplatte im 96-well-Format wurde konditioniert mit 1 ml Methanol und equilibriert mit 1 ml Wasser. Nach der Probenaufgabe wurde mit je 1 ml Ameisensäure (2% v/v in Wasser) und Methanol (50% v/v in Wasser) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml ammoniakalischem Methanol (0,5% w/v). Nach der Elution wurden die Proben in der Speedvac zur Trockne eingedampft. Im Probenroboter wurden die Proben wieder in 200 μl Methanol (30% v/v in Wasser) gelöst und durch eine 0,45 μm Glasfaserplatte filtriert. Die Filtrate wurden unmittelbar zur chromatographischen Analyse verwendet.

Zur Messung der Aglykone im Plasma wurden Aliquote von 50 μl zu 400 μl Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH = 5,0) pipettiert und mit 5 μl internem Standard ($^{13}\text{C}_6$ -*trans*-Resveratrol) versetzt. Zum Ausgleich der Calcium komplexierenden EDTA aus den Plasmaproben wurden 100 μl Calciumchloridpuffer (1 M) zugegeben, um eine ausreichend hohe Konzentration für die Enzyme zu gewährleisten. Schließlich wurden jeweils 20 μl β -Glucuronidase (25 U μl^{-1}) und Sulfatase (1,875 U μl^{-1}) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h bei 37 °C unter Schütteln (600 min^{-1}) inkubiert und danach auf Eis mit 200 μl eiskalter Zitronensäure (10%, w/v) versetzt.

Die freigesetzten Aglykone wurden durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit eiskaltem Ethylacetat extrahiert (dreifache Extraktion, zwischenzeitliches Zentrifugieren für 5 min bei 0 °C und 23 000 \times g). Die vereinten Extrakte wurden unter Stickstoff zur Trockne eingedampft, in 100 μl wässrigem Methanol (30%, v/v) gelöst und mittels LC-MS analysiert.

Urinproben aus Säugetieren

Alle Urinproben aus den verschiedenen Studien wurden zunächst 40-fach mit Wasser verdünnt. Verdünnte Aliquote von 20 μl wurden auf Eis zu 480 μl Wasser gegeben und mit 5 μl internem Standard ($^{13}\text{C}_6$ -*trans*-Resveratrol) versetzt. Zur enzymatischen Hydrolyse wurden 330 μl Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH = 5,0) und jeweils 80 μl β -Glucuronidase (25 U μl^{-1}) und Sulfatase (1,875 U μl^{-1}) zugegeben. Das Gemisch wurde 90 min bei 37 °C unter Schütteln (600 min^{-1}) inkubiert und danach auf Eis gekühlt.

Die freigesetzten Aglykone wurden durch SPE extrahiert. Dazu wurden Strata-X-Kartuschen (30 mg, 1 ml) mit 1 ml Methanol konditioniert und mit 1 ml wässriger Ameisensäure (0,1%, v/v) equilibriert. Nach Aufgabe der Probe wurde jeweils zwei mal mit 1 ml wässriger Ameisensäure (0,1%, v/v) und 1 ml wässrigem Methanol (5%, v/v) gewaschen, bevor mit 2 ml Methanol eluiert wurde. Die Eluate wurden in der Speedvac zur Trockne eingedampft und ein 100 μl einer Mischung aus Acetonitril (ACN), Methanol und 0,1%iger wässriger Ameisensäure (5:5:90, v/v/v) gelöst und mittels LC-MS analysiert.

gelöst. Die Proben wurden gevortext, zentrifugiert ($9\,000 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und durch einen Spritzenfilter (PTFE, $4\text{ mm} \times 0,2\text{ }\mu\text{m}$) direkt in ein LC-Probengefäß filtriert. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS.

4.6.2 Trennmethode

Proben aus *C. elegans* und *D. melanogaster*

Jede Testsubstanz wurde zunächst in reinem Lösungsmittel (50% Methanol in Wasser) über HPLC-DAD analysiert, um eine Wellenlänge zur optimalen Detektion zu finden. Das Injektionsvolumen betrug stets $20\text{ }\mu\text{l}$, die Konzentration der Testsubstanz $50\text{ }\mu\text{M}$. Die Trennung erfolgte in allen Fällen außer bei *p*-Aminobenzoesäure an einer Umkehrphase (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18), die auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert war. Zur Trennung von *p*-Aminobenzoesäure wurde eine auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierte Umkehrphase (MZ PerfectSIL Target ODS-3) verwendet. Als Elutionsmittel dienten ein Ammoniumformiatpuffer (wässrig), 25 mM, $\text{pH} = 3,0$ (Eluent A) sowie eine Mischung von je einem Volumenteil Methanol und ACN (Eluent B). Die Elution erfolgte bei einem Fluss von $0,6\text{ ml min}^{-1}$ ($0,5\text{ ml min}^{-1}$ bei *p*-Aminobenzoesäure) über einen Gradienten mit wachsendem organischen Anteil, der für jede Testsubstanz und deren Metaboliten optimiert wurde (Tabelle 4.3). Nach Optimierung der Trennmethode wurden jeweils $20\text{ }\mu\text{l}$ der aufgearbeiteten Probe injiziert.

Tabelle 4.3: Gradienten zur chromatographischen Trennung der Testsubstanzen und von *C. elegans* bzw. *D. melanogaster* gebildeter Metaboliten. Für Flavon, Quercetin und Resveratrol bzw. deren Metaboliten wurde eine ZORBAX Eclipse Plus C18-Säule (Agilent) verwendet, für PABA eine PerfectSIL Target ODS-3-Säule. Zu jeder Substanz ist die Wellenlänge λ angegeben, die zur Quantifizierung verwendet wurde.

Flavon ($\lambda = 296\text{ nm}$)		<i>p</i> -Aminobenzoesäure ($\lambda = 285\text{ nm}$)	
Zeit [min]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent B [%]
0	10	0	5
1	10	13	18
21	50	14	95
30	90	19	95
31	95	20	5
36	95	25	5
37	10		
47	10		

Quercetin ($\lambda = 470\text{ nm}$)		Resveratrol ($\lambda = 305\text{ nm}$)	
Zeit [min]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent B [%]
0	10	0	10
1	10	1	10
29	38	21	28
38	75	24	70
39	95	25	95
44	95	30	95
45	10	31	10
50	10	36	10

Tabelle 4.4: UHPLC-Gradient zur Trennung der in Säugetieren gebildeten Konjugate (A) und Aglykone (B) von Resveratrol. Die Trennung erfolgte an einer Acquity HSS T3 C18-Säule (Waters).

A: Konjugate im Plasma, $\vartheta = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$		B: Aglykone in Plasma und Urin, $\vartheta = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Zeit [min]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent B [%]
0	3	0	15
2	3	2	15
15	45	11	23
17	95	20,5	23
18,5	95	30	53
20	3	31	100
23	3	36	100
		37	15
		47	15

Konjugate im Plasma aus Säugetieren

Zur Analyse der Konjugate wurden Plasmaproben aus den Resveratrol-Studien mit Säugetieren nach Aufarbeitung über Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) getrennt. Hierzu wurde eine UHPLC-Trennsäule (Waters Acquity HSS T3) mit einer bestehenden Methode verwendet. Das Injektionsvolumen betrug $10\text{ }\mu\text{l}$, die Temperatur $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Eluenten wurden ein wässriger Ammoniumacetatpuffer (25 mM) mit 0,1% Ameisensäure (Eluent A) sowie reines ACN (Eluent B) bei einem konstanten Fluss von $0,5\text{ ml min}^{-1}$ eingesetzt. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 4.4A beschrieben.

Aglykone in Urin und Plasma aus Säugetieren

Zur Trennung der hydrolysierten Urin- und Plasmaproben aus Säugetieren wurde die gleiche UHPLC-Trennsäule wie bei der Analyse der Konjugate verwendet. Es wurde jedoch ein anderer Gradient bei einer höheren Temperatur ($\vartheta = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) verwendet (Tabelle 4.4B). Als Fließmittel wurden 0,1% wässrige Ameisensäure (Eluent A) sowie eine Mischung aus ACN und Methanol (1:1, v/v, Eluent B) eingesetzt.

4.6.3 Detektion und Strukturaufklärung

Nach Optimierung der Chromatographie zur Trennung der Metaboliten wurden zunächst die UV-Chromatogramme der Inkubationen mit den Kontrollen verglichen, um mögliche Metaboliten zu detektieren. Die jeweils beobachtete Wellenlänge ist für jede Testsubstanz in Tabelle 4.3 angegeben. Zusätzlich wurden alle Proben mit einem hochauflösenden Flugzeit-Massenspektrometer analysiert (HPLC-TOFMS). Die Quellen- und Fragmentierungsparameter wurden für jede verfügbare Test- und Referenzsubstanz optimiert und sind in Tabelle A.1 im Anhang zu finden. Zur Detektion der Metaboliten wurde deren akkurate Ionenmasse aus dem Totalionenstrom (TIC) extrahiert. In Tabelle 4.5 sind alle Konjugate aufgelistet, die nach dieser Methode aus dem TIC extrahiert wurden.

Zur Strukturaufklärung wurden die Molekülonen detektierter Metaboliten im Massenspektrometer isoliert und gezielt fragmentiert; die Fragmente wurden hochauflösend detektiert und über eine Datenbank mit möglichen Strukturformeln abgeglichen.

Tabelle 4.5: Mögliche Konjugate, deren akkurate Masse aus dem TIC extrahiert wurde. Aus Gründen der Übersicht ist die Addukt-Masse ohne Dezimalstellen angegeben; im Experiment wurde mit vier Dezimalstellen $\pm 0,01$ Da gescreent. M: Molekülonenmasse der jeweiligen Testsubstanz.

Konjugat	Addukt-Masse	Konjugat	Addukt-Masse
Hydroxid	M + 16 Da	Diglucuronid	M + 352 Da
Methyl	M + 14 Da	Sulfoglucuronid	M + 256 Da
Acetyl	M + 42 Da	Glykosid	M + 162 Da
Sulfat/Phosphat ¹	M + 80 Da	Diglykosid	M + 324 Da
Disulfat/Diphosphat ¹	M + 160 Da	Phosphoglykosid	M + 242 Da
Glycin	M + 74 Da	Phosphodiglykosid	M + 404 Da
Glutathion	M + 306 Da	Diphosphoglykosid	M + 322 Da
Glucuronid	M + 176 Da	Diphosphodiglykosid	M + 484 Da

¹Aus Übersichtsgründen sind Sulfat/Phosphat und Disulfat/Diphosphat mit 80 Da bzw. 160 Da angegeben. Im Experiment wurde mit der akkuraten Molekülonenmasse gescreent, sodass Sulfat- von Phosphat-Konjugaten und Disulfat- von Diphosphat-Konjugaten unterschieden werden konnten.

Alle Proben außer den Extrakten aus der Inkubation von *C. elegans* mit *p*-Aminobenzoessäure wurden mit negativer Ionisierung (NI) analysiert. Es wurde zunächst ein Übersichtsscan im Bereich $m/z = 50$ bis 1000 durchgeführt und ein Chromatogramm des Gesamtionenstroms (*Total Ion Chromatogram*, TIC) aufgezeichnet. Aus diesem wurden die Molekülonenmassen der Metabolitenpeaks erhalten, denen mit Hilfe einer Software eine oder mehrere passende Summenformeln zugewiesen werden konnten. Die gefundenen Metabolitenmassen wurden in einem weiteren Experiment als Vorläuferionen selektiert und fragmentiert (MSMS). Die entstandenen Fragment-Ionen wurden detektiert und mit der Summenformel des Vorläuferions bzw. einer Datenbank verglichen. Auf diese Weise konnte unbekanntem Metaboliten eine mögliche Struktur zugeordnet werden.

Die Homogenate aus den Inkubationen mit Flavon wurden zusätzlich, die Proben aus den Inkubationen mit *p*-Aminobenzoessäure ausschließlich mit positiver Ionisation (PI) analysiert. Wie bei den Messungen im NI-Modus wurde zunächst ein Übersichtsscan durchgeführt, nach welchem einzelne Ionen isoliert und gezielt fragmentiert wurden. Die akkurate Masse von Vorläufer- und Fragment-Ionen wurden ebenfalls mit einer Datenbank und einer Liste möglicher Konjugate abgeglichen. Die Parameter der Messungen im PI-Modus sind in Tabelle A.3 im Anhang zusammengefasst.

4.6.4 Quantifizierung

Quantifizierung über MRM

Die Quantifizierung der durch Referenzsubstanzen identifizierten Säugetier-Metaboliten von Resveratrol erfolgte in einem Triple-Quadrupol-Linear-Ion-Trap-Massenspektrometer (QqLIT) im NI-Modus. Hierzu wurde das Verhältnis der Intensität eines Vorläuferions zu zwei verschiedenen Fragment-Ionen verwendet (multiple reaction monitoring, MRM), welches parallel zur Probenmessung durch Kalibrierung (0,8 nM, 4 nM, 20 nM, 100 nM, 500 nM, 2 500 nM) in Blank-Plasma

und -Urin aus Menschen, Schweinen und Mäusen für jede Referenzsubstanz bestimmt wurde. Durch Miteinbeziehen von internen Standards wurden durch die Probenmatrix und Aufarbeitung bedingte Abweichungen der detektierten Metabolitenkonzentration ausgeglichen. Die am Massenspektrometer eingestellten Geräteparameter sind in Tabelle A.4 im Anhang zu finden.

Quantifizierung über DAD

Alle Metaboliten, die nach Inkubation von *C. elegans* mit den verschiedenen Testsubstanzen entstanden sind, wurden direkt nach der Trennung mittels HPLC über einen Diodenarraydetektor (DAD) quantifiziert. Grundlage war die Peakfläche der Metaboliten bei der in Tabelle 4.3 angegebenen Wellenlänge. Kalibrierkurven (0,1 µM, 0,25 µM, 0,50 µM, 0,75 µM, 1 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM) aller verfügbaren Referenzsubstanzen wurden in reinem Lösemittel erstellt. War für einen Metaboliten keine Referenzsubstanz verfügbar, wurde dessen Peakfläche auf die Substanz bezogen, die ihm chemisch am ähnlichsten ist (siehe Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Referenzsubstanzen zur Quantifizierung von Metaboliten der Testsubstanzen in *C. elegans* über DAD.

Metabolit in <i>C. elegans</i>	Referenzsubstanz (Wellenlänge)
<i>p</i> -Aminobenzoesäure-Konjugate	<i>p</i> -Aminobenzoesäure (285 nm)
3-Hydroxyflavon	3-Hydroxyflavon (296 nm)
5-Hydroxyflavon	5-Hydroxyflavon (296 nm)
6-Hydroxyflavon	6-Hydroxyflavon (296 nm)
7-Hydroxyflavon	7-Hydroxyflavon (296 nm)
3'-Hydroxyflavon und sonstige Hydroxyflavone	3'-Hydroxyflavon (296 nm)
Hydroxyflavon-Konjugate	6-Hydroxyflavon-glucosid (296 nm)
Quercetin-3-O-glucosid	Quercetin-3-O-glucosid (370 nm)
Quercetin-4'-O-glucosid	Quercetin-4'-O-glucosid (370 nm)
Quercetin-7-O-glucosid und sonstige Quercetin-Konjugate	Quercetin-7-O-glucosid (370 nm)
Quercetin-diglucoside	Quercetin-3,4'-diglucosid (370 nm)
3'-Hydroxyresveratrol (Piceatannol)	Piceatannol (305 nm)
Resveratrol-3-glucosid	Resveratrol-3-glucosid (305 nm)
sonstige Resveratrol-Konjugate	

Quantifizierung über TOF-MS

Da die Proben aus *D. melanogaster* stark matrixbelastet waren, konnten die gebildeten Metaboliten nicht über DAD quantifiziert werden. Durch hochauflösende Massenspektrometrie konnte

4.6 Strukturaufklärung und Quantifizierung der Metaboliten

jedoch selektiv die akkurate Masse der Molekülonen aus dem TIC extrahiert und die Fläche unter der Kurve integriert werden. Diese wurde mit der Peakfläche der Referenzsubstanzen in unbehandelter Fliegenmatrix verglichen, die auf die gleiche Art wie die übrigen Proben aufgearbeitet wurde. Durch Verwendung eines internen Standards konnten durch die Probenmatrix verursachte Schwankungen der Konzentration ausgeglichen werden. Auf diese Weise konnten Kalibrierkurven (40 nM, 200 nM, 1 000 nM, 5 000 nM) in Blank-Fliegenmatrix erstellt und Resveratrol, Piceatannol sowie Resveratrol-3-O-glucosid quantifiziert werden.

5 Ergebnisse

5.1 Metabolismus in *Caenorhabditis elegans*

Um die unterschiedlichen Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus in *Caenorhabditis elegans* zu untersuchen, wurde der Fadenwurm mit verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen inkubiert (Abbildung 5.1). Qualitative Voruntersuchungen zur Aufnahme und Metabolisierung von Flavon, Quercetin und *trans*-Resveratrol sowie die Strukturaufklärung der Metaboliten wurden bereits während der Diplomarbeit durchgeführt. Die Daten dieser Voruntersuchungen werden zur Einordnung der Ergebnisse einleitend zusammengefasst. Für die vorliegende Arbeit wurden neue Proben mit diesen Substanzen aufgearbeitet und alle detektierten Metaboliten quantifiziert. Darüber hinaus wurde *C. elegans* mit *p*-Aminobenzoesäure inkubiert, da diese Substanz eine Amino- sowie eine Carboxylgruppe trägt, deren Metabolisierung in *C. elegans* bisher nicht untersucht wurde.

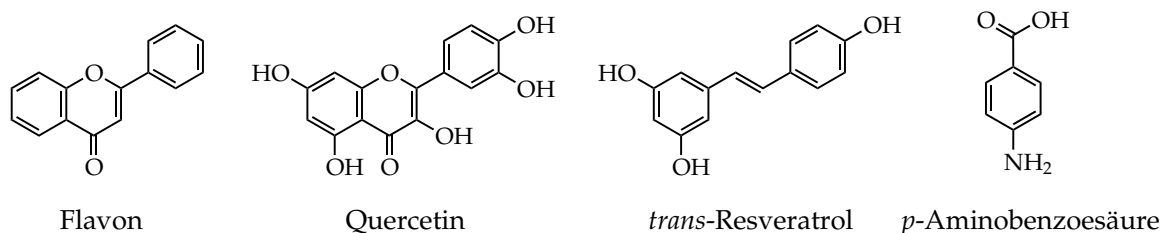


Abbildung 5.1: Strukturformeln der eingesetzten Testsubstanzen.

Flavon besitzt keine funktionellen Gruppen, die in Phase-II-Reaktionen mit wasserlöslichen Resten konjugiert werden könnten. Stattdessen müssen durch Phase-I-Reaktion erst funktionelle Gruppen eingeführt werden. Zur Untersuchung von möglichen Phase-I-Reaktionen wurde *C. elegans* daher mit Flavon inkubiert.

Das Flavonol Quercetin und das Stilben-Derivat Resveratrol verfügen über mehrere Hydroxylgruppen, an denen Konjugationsreaktionen stattfinden können. Die Untersuchung der verschiedenen Konjugate dieser zwei Substanzen, die in *C. elegans* gebildet werden, stand daher im Vordergrund der vorliegenden Arbeit.

Auch *p*-Aminobenzoesäure besitzt funktionelle Gruppen zur Konjugation: eine Carboxyl- sowie eine Amino-Gruppe. Ob *p*-Aminobenzoesäure von *C. elegans* aufgenommen wird und an welcher Stelle eine Konjugation stattfindet, sollte überprüft werden.

Nach Funktionalisierung und Konjugation findet im Fremdstoffmetabolismus üblicherweise die Ausscheidung der Konjugate statt. Diese sollte am Beispiel von Quercetin und dessen Konjugaten untersucht werden.

5.1.1 Metabolisierung von Flavon

Synchronisierte Kulturen von *C. elegans* L₄-Larven wurden mit 100 µM Flavon für 24 und 48 h inkubiert. Extrakte der homogenisierten Kultur wurden mittels HPLC-DAD und HPLC-TOFMS analysiert. Qualitative Voruntersuchungen während der Diplomarbeit zeigten 14 Metaboliten F1–F14 im UV-Chromatogramm, die nicht in der Kontrolle vorhanden waren (Abbildung 5.2). Ein geringer Anteil unmetabolisierten Flavons war ebenfalls vorhanden.

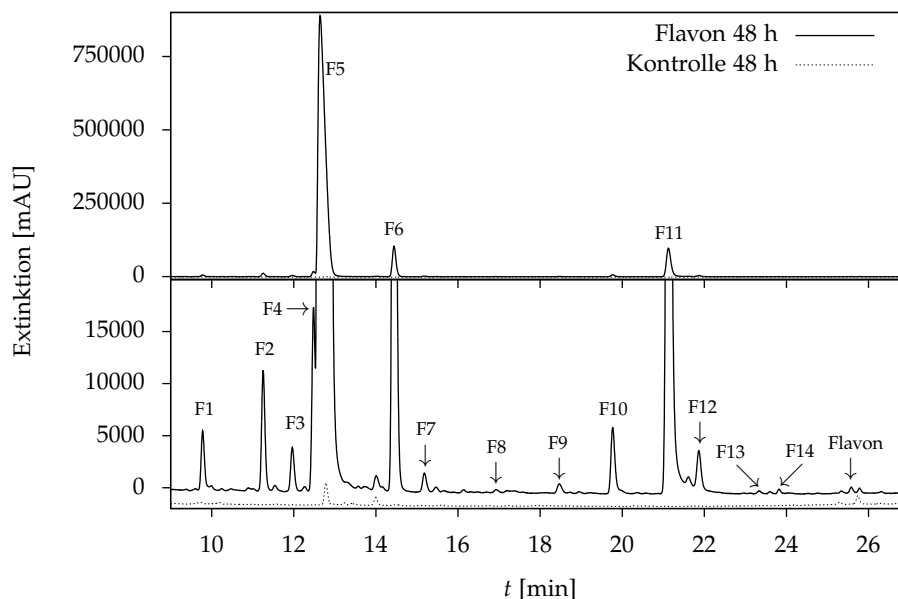


Abbildung 5.2: UV-Chromatogramm (296 nm) eines Extrakts aus *C. elegans* (Vorversuch aus Diplomarbeit). Die Würmer wurden 48 h lang mit 100 µM Flavon (durchgezogene Linie) oder reinem Lösungsmittel (gepunktete Linie) inkubiert. Die obere Hälfte zeigt eine Übersicht, die untere Hälfte dieselben Daten in y-Richtung vergrößert.

Die Strukturaufklärung der gebildeten Metaboliten wurde während der Diplomarbeit durchgeführt. Für die vorliegende Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Quantifizierung der Metaboliten. Die Ergebnisse der qualitativen Vorarbeiten sind zur besseren Übersicht im Text sowie in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Funktionalisierung und Konjugation

Bevor eine Konjugation von Flavon stattfinden kann, muss das Molekül zunächst hydroxyliert werden. Ausgehend von der akkuraten Masse ihrer Molekülionen (m/z 239,0694 bzw. 255,0647), konnten vier Hydroxyflavone (F11–F14) sowie ein Dihydroxyflavon (F9) detektiert werden. Ein Vergleich der Retentionszeit, UV- und Massenspektren mit den vorhandenen Referenzsubstanzen 3-, 3'-, 5-, 6- und 7-Hydroxyflavon ermöglichte die Identifikation von F12 und F13 als 3'- bzw. 6-Hydroxyflavon. Keine der Referenzsubstanzen stimmte mit F11 oder F14 überein, sodass für diese zwei Hydroxyflavone eine Hydroxylierung nur an Position 2', 4' oder 8 in Frage kommt.

Nach Hydroxylierung wurde ein Teil der Flavon-Metaboliten mit Hexose- und Phosphatresten konjugiert. Der Hauptmetabolit F5 wurde als Hydroxyflavon-Phosphoglykosid identifiziert,

ebenso wie die Metaboliten F3, F7 und F10. Reine Hydroxyflavon-Glykoside waren die Metaboliten F6 und F8. Daneben konnte auch ein Hydroxyflavon-Diglykosid (F4) detektiert werden. Die Metaboliten F1 und F2 wurden mit Phosphodiglykosid-Resten konjugiert, wobei F2 vorher zum Hydroxyflavon, F1 zum Dihydroxyflavon oxidiert wurde.

Tabelle 5.1: Akkurate Masse von Molekül- und Fragment-Ionen im PI-Modus sowie postulierte Strukturen der Flavon-Metaboliten in *C. elegans* (Vorversuche aus Diplomarbeit). Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete exakte Ionenmasse bezogen. Fragmente, die nur im NI-Modus detektiert wurden, sind kursiv gesetzt.

Peak	RT [min]	m/z [M+H] ⁺	Abweichung [mDa] (ppm)	m/z Fragment-Ionen	Postulierte Struktur
F1	9,88	659,1360	-1,16 (-1,76)	497, 417, 255, 241, 133, 121, 97, 79	Dihydroxyflavon-phosphodiglykosid
F2	11,37	643,1417	-0,55 (-0,86)	545, 403, 401, 239, 97, 79	Hydroxyflavon-phosphodiglykosid
F3	12,10	481,0879	-1,52 (-3,16)	241, 239, 121, 117, 97, 79	Hydroxyflavon-phosphoglykosid
F4	12,53	563,1752	-0,72 (-1,28)	401, 239, 121, 117	Hydroxyflavon-diglykosid
F5	12,86	481,0893	-0,12 (-0,25)	399, 383, 241, 239, 121, 117, 97, 79	Hydroxyflavon-phosphoglykosid
F6	14,50	401,1226	-0,49 (-1,22)	239, 145, 121, 117	Hydroxyflavon-glykosid
F7	15,34	481,0881	-1,32 (-2,74)	241, 239, 133, 121, 117, 97, 79	Hydroxyflavon-phosphoglykosid
F8	16,98	401,1210	-2,09 (-5,21)	239, 137	6-Hydroxyflavon-glucosid ¹
F9	18,51	255,0647	-0,49 (-1,92)	237, 197, 161, 135, 133, 121, 117, 104	Dihydroxyflavon
F10	19,98	616,1142	-3,23 (-5,24)	239, 223, 97, 79	Hydroxyflavon-phosphoglykosid ²
F11	21,17	239,0692	-1,07 (-4,48)	145, 133, 121, 119, 117	Hydroxyflavon
F12	21,84	239,0724	+2,13 (+8,91)	145, 121, 117	3'-Hydroxyflavon ¹
F13	23,37	239,0694	-0,87 (-3,64)	137, 129, 117	6-Hydroxyflavon ¹
F14	23,84	239,0683	-1,97 (-8,24)	145, 121, 117	Hydroxyflavon
Flavon	25,60	223,0743	-1,06 (-4,75)	129, 121, 103, 93	Flavon ¹

¹Über Referenzsubstanz identifiziert.

²481,1 + Carbamat-Rest

Quantifizierung der detektierten Metaboliten

Alle in den Vorversuchen identifizierten Metaboliten wurden für die vorliegende Arbeit quantifiziert. Dazu wurden neue Proben aufgearbeitet, die durch 24- bzw. 48-stündige Inkubation von *C. elegans* mit Flavon generiert wurden.

Mit geeigneten Referenzsubstanzen wurden externe Kalibrierungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 μM und 100 μM vorgenommen. Die über die Peakfläche im UV-Chromatogramm (296 nm) berechneten Kalibrierkurven hatten eine Korrelation von $r^2 \geq 0,99$. Alle berechneten Konzentrationen der Metaboliten wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

Die im Chromatogramm bereits ersichtlichen drei Hauptmetaboliten F5, F6 und F11 nahmen zusammen einen Anteil von über 96% der Gesamtkonzentration aller Metaboliten ein. Unmetabolisiertes Flavon war nach 24 h Inkubationszeit nur im Spurenbereich zu detektieren und nahm auch nach 48 h einen Gesamtanteil von unter 0,1% an.

Die Gesamtkonzentration der Flavon-Metaboliten stieg von 51,1 $\mu\text{mol/g}$ Protein nach 24 h auf 78,8 $\mu\text{mol/g}$ Protein nach 48 h. Eine signifikant höhere Konzentration einzelner Metaboliten ließ

sich jedoch nur bei den Hauptmetaboliten F5, F6 und F11 feststellen; bei den geringer konzentrierten Metaboliten waren nur leichte Konzentrationsänderungen zu detektieren (Tabelle 5.2). Wird der Anteil jedes Metaboliten an der Gesamtkonzentration aller Metaboliten berechnet, fällt auf, dass sich die Anteile der Hauptmetaboliten F5, F6 und F11 wechselseitig veränderten. Beim Vergleich von 24 h mit 48 h Inkubationszeit sank der Anteil von F5 um 10,1%, während die Anteile von F6 und F11 um 2,9% bzw. 8,6% stiegen. Diese Beobachtung kann Hinweise auf den Stoffwechsel von *C. elegans* liefern: Flavon wird nach Aufnahme schrittweise metabolisiert, zunächst zu Hydroxyflavon (F11), dann zu einem Hydroxyflavon-glykosid (F6) und schließlich zu einem Hydroxyflavon-phosphoglykosid (F5). Nach 24 h Inkubationszeit ist F5 Hauptmetabolit, dessen Vorstufen F6 und F11 in geringer Konzentration vorliegen, da sie bereits weiter konjugiert wurden. Bei kontinuierlicher Aufnahme von Flavon über 48 h könnten die für die Metabolisierung verantwortlichen Enzyme zunehmend ausgelastet sein. Daher wäre eine Akkumulierung von F11 und F6, den Vorläufern von F5, plausibel. Weitere Hinweise für diese Annahme könnten durch quantitative Messung der Exkretion von Flavon und seiner Metaboliten erhalten werden.

Tabelle 5.2: Quantifizierbare Metaboliten von Flavon in *C. elegans* nach 24- und 48-stündiger Inkubation. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$), jeweils normiert auf den Proteingehalt der Probe. LLOQ: 0,02 $\mu\text{mol/g}$ Protein. LOD: 0,01 $\mu\text{mol/g}$ Protein. RT, Retentionszeit.

Peak	RT [min]	Konzentration [$\mu\text{mol/g}$ Protein]		Anteil [%]	
		24 h	48 h	24 h	48 h
F1	9,88	0,12 \pm 0,02	0,20 \pm 0,06	0,2	0,3
F2	11,37	0,37 \pm 0,16	0,45 \pm 0,06	0,7	0,6
F3	12,10	0,07 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,1	0,2
F4	12,53	0,91 \pm 0,44	0,72 \pm 0,10	1,8	0,9
F5	12,86	42,45 \pm 10,40	57,4 \pm 0,25	83,0	72,9
F6	14,50	3,29 \pm 1,00	7,33 \pm 3,44	6,4	9,3
F7	15,34	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,1	0,1
F8	16,98	Spuren	0,02 \pm 0,00	< 0,1	< 0,1
F9	18,51	0,04 \pm 0,02	0,09 \pm 0,04	0,1	0,1
F10	19,98	0,15 \pm 0,04	0,06 \pm 0,03	0,3	0,1
F11	21,17	3,52 \pm 1,16	12,2 \pm 6,77	6,9	15,5
F12	21,84	0,09 \pm 0,01	Spuren	0,2	< 0,1
F13	23,37	0,02 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	< 0,1	0,1
F14	23,84	Spuren	Spuren	< 0,1	< 0,1
Flavon	25,60	Spuren	0,03 \pm 0,01	< 0,1	< 0,1
Gesamt		51,1 \pm 13,3	78,8 \pm 10,2	100	100

5.1.2 Metabolisierung von Resveratrol

Wie bei der Metabolisierung von Flavon existierten bereits Ergebnisse aus der Diplomarbeit, welche die von *C. elegans* L₄-Larven gebildeten Metaboliten qualitativ beschreiben. Die Quantifizierung dieser Konjugate war Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich sollte eine Strukturaufklärung der Hauptmetaboliten erfolgen. Dazu wurden homogenisierte *C. elegans* L₄-Larven mit Resveratrol und UDP-Glucose inkubiert, sodass ausschließlich Glucose-Konjugate gebildet werden konnten. Diese wurden mit den von lebenden Fadenwürmern gebildeten Konjugaten verglichen.

Der Hauptmetabolit R6 wurde isoliert und mit Phosphatasen behandelt bzw. mit NMR-Spektroskopie untersucht, um zu klären, an welcher Position des Glucosylrests die Phosphatgruppe gebunden ist.

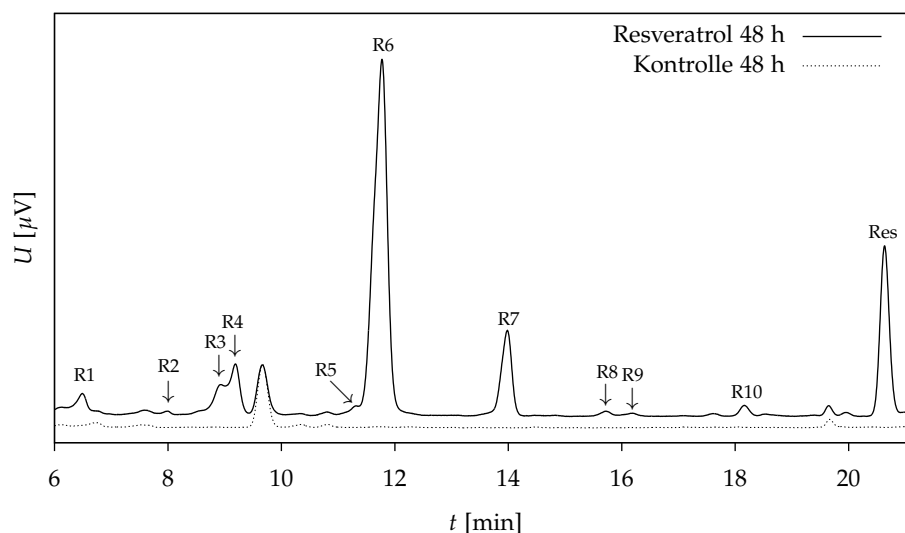


Abbildung 5.3: UV-Chromatogramm (305 nm) eines Extrakts aus *C. elegans* (Vorversuche aus Diplomarbeit). Die Würmer wurden 48 h lang mit 100 μM Resveratrol (durchgezogene Linie) oder reinem Lösungsmittel (gepunktete Linie) inkubiert.

Inkubation von L₄-Larven mit Resveratrol

Synchronisierte Kulturen von *C. elegans* L₄-Larven wurden mit 100 μM Resveratrol unter Lichtausschluss für 48 h inkubiert. Extrakte der homogenisierten Kultur wurden mittels HPLC-DAD und HPLC-TOFMS analysiert. Eine qualitative Beschreibung der Metabolisierung wurde bereits während der Diplomarbeit vorgenommen. Abbildung 5.3 und Tabelle 5.3 fassen die Ergebnisse zusammen.

Neben unmetabolisiertem *trans*-Resveratrol konnten zehn Metaboliten R1–R10 detektiert werden. Hauptmetabolit (R6) war ein Resveratrol-Phosphoglykosid. Vier weitere Phosphoglykoside wurden detektiert (R3, R4, R9, R10), eines davon (R3) war an ein hydroxyliertes Aglykon gebunden. Daneben zeichneten ein Glucosid (R5), zwei Diglykoside (R2, R5), ein Phosphodiglykosid (R1) sowie das hydroxylierte Resveratrolderivat Piceatannol (R8) das breite Metabolitenspektrum aus.

Umsetzung von Resveratrol mit *C. elegans*-Homogenat

Nach 48-stündiger Inkubation eines Homogenats aus *C. elegans* L₄-Larven mit UDPG und Resveratrol waren im UV-Chromatogramm bei 305 nm fünf Peaks zu detektieren (Abbildung 5.4). Die größte Peakfläche in dieser Probe sowie in den Kontrollen ohne UDPG bzw. ohne *C. elegans*-Homogenat nahm jeweils Resveratrol ein. Ein Peak bei 9,8 min war sowohl in der Probe mit Resveratrol als auch in der Kontrolle ohne Zugabe von UDPG enthalten. Im Massenspektrum

Tabelle 5.3: Akkurate Masse von Molekül- und Fragment-Ionen sowie postulierte Strukturen der Resveratrol-Metaboliten in *C. elegans* (Vorversuche aus Diplomarbeit). Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete exakte Ionenmasse bezogen.

Peak	RT [min]	m/z [M-H] ⁻	Abweichung [mDa] (ppm)	m/z Fragment-Ionen	Postulierte Struktur
R1	6,49	631,1426	-0,75 (-1,19)	469, 241, 97, 79	Resveratrol-phosphodiglykosid
R2	7,99	551,1766	-0,41 (-0,74)	389, 227, 185, 143	Resveratrol-diglykosid
R3	8,93	485,0855	+0,06 (+0,12)	243, 241, 97, 79	Hydroxyresveratrol-phosphoglykosid
R4	9,19	469,0905	-0,02 (-0,04)	241, 227, 97, 79	Resveratrol-phosphoglykosid
R5	11,30	551,1758	-1,21 (-2,20)	323, 227, 185, 143	Resveratrol-glykosylglykosid
R6	11,77	469,0906	+0,08 (+0,17)	241, 227, 97, 79	Resveratrol-phosphoglykosid
R7	13,98	389,1237	-0,49 (-1,26)	227, 185, 143	Resveratrol-3-O-glucosid ¹
R8	15,72	243,0668	+0,52 (+2,14)	201, 159	Piceatannol ¹
R9	16,19	469,0901	-0,42 (-0,90)	241, 227, 97, 79	Resveratrol-phosphoglykosid
R10	18,16	469,0902	-0,32 (-0,68)	241, 227, 97, 79	Resveratrol-phosphoglykosid
Resveratrol	20,63	227,0721	+0,73 (+3,21)	185, 143	Resveratrol ¹

¹Über Referenzsubstanz identifiziert.

konnten keine Hinweise auf ein Resveratrol-Konjugat gefunden werden; der Peak wurde daher als Verunreinigung deklariert und ignoriert. Die übrigen drei Peaks R_A , R_B und R_C waren nur in der Inkubation mit *C. elegans*-Homogenat und UDPG enthalten.

Da dieses Experiment mit homogenisierten *C. elegans* L_4 -Larven in Puffer ohne Kohlenstoffquelle durchgeführt wurde, stand zur Konjugation von Resveratrol lediglich UDP-Glucose als Substrat zur Verfügung. Alle detektierten Konjugate können daher als Glucoside, Diglucoside bzw. Glucosylglucoside angesehen werden.

Im Massenspektrum (siehe Anhang C.2, S. 110) wurde bei R_A und R_B jeweils ein Molekülion detektiert, welches einem zweifach glucosylierten Resveratrol entspricht (m/z 551,1764). Im Fragmentspektrum von R_A wurden Fragmente mit m/z 389,1230 und m/z 227,0718 detektiert, die einem Resveratrol-Glucosid bzw. Resveratrol entsprechen und die schrittweise Abspaltung der zwei Glucosereste dokumentieren. Ob es sich bei R_A um zwei einzelne Glucosereste an unterschiedlichen Hydroxylgruppen von Resveratrol handelt oder um ein Disaccharid an einer Hydroxylgruppe, lässt sich aus den Daten nicht ablesen. Bei der Fragmentierung von R_B wurde ein Disaccharid-Fragment mit m/z 323,0717 detektiert. Bei dem Konjugat handelt es sich daher um ein Glucosylglucosid, das über eine einzelne Hydroxylgruppe an Resveratrol gebunden war. Über die Art der Bindung zwischen den zwei Glucoseresten kann keine Aussage getroffen werden.

Metabolit R_C wurde mit einem Molekülion von m/z 389,1230 detektiert, was einem Resveratrol-Glucosid entspricht. Im Fragmentspektrum wurden ein Resveratrol-Aglykon (m/z 227,0716) sowie typischer Resveratrol-Fragmente (m/z 185 bzw. 143) detektiert. Retentionszeit und im Massenspektrometer detektierte Ionen stimmten mit denen der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid überein. Metabolit R_C konnte daher eindeutig als Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid identifiziert werden. Dieses Konjugat wurde bereits während der Vorversuche für die Diplomarbeit in lebenden *C. elegans* detektiert (R7) und mittels Referenzsubstanz identifiziert.

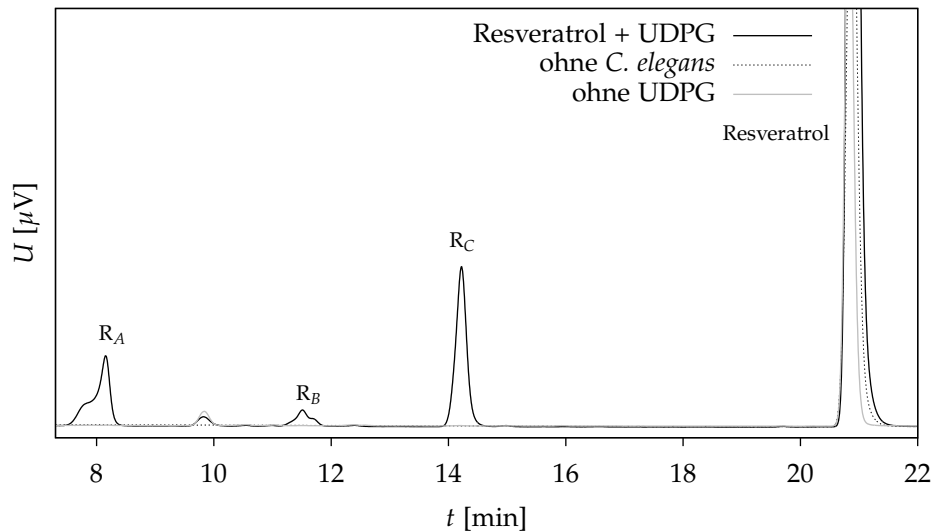


Abbildung 5.4: UV-Chromatogramm ($\lambda = 305 \text{ nm}$) der Umsetzung von Resveratrol durch ein Homogenat aus *C. elegans* L₄-Larven und Uridin-5'-diphosphoglucose (schwarze Linie). Die Metaboliten R_A, R_B und R_C sind nicht in den Kontrollen ohne UDPG (graue Linie) oder ohne Homogenat (schwarz gepunktet) enthalten.

Der Vergleich mit dem UV-Chromatogramm der Inkubation von lebenden *C. elegans* L₄-Larven zeigte, dass die Retentionszeiten von R_A und R_B mit denen von R₂ bzw. R₅ übereinstimmten. Die zu den Peaks gehörenden UV-Spektren waren bei den zwei verschiedenen Inkubationsarten identisch, ebenfalls die im Massenspektrometer detektierten Fragmente. Auf Basis dieser Daten konnten die bisher nur als Resveratrol-Diglykosid bzw. -Glykosylglykosid bezeichneten Metaboliten R₂ und R₅ als Diglucosid bzw. Glucosylglucosid identifiziert werden.

Umsetzung von R₆ mit Phosphatasen

Der Hauptmetabolit R₆ wurde auf Basis seines Moleküliions als Resveratrol-phosphoglykosid identifiziert. Durch Behandlung mit Phosphatasen sollte die Phosphatgruppe hydrolysiert werden, um Informationen über das Konjugat zu erhalten. Die Eluate von R₆ aus mehreren analytischen Läufen wurden gesammelt, getrocknet, in Wasser gelöst und aliquotiert. In einem ersten Experiment wurden Aliquote mit saurer Phosphatase umgesetzt. Nach der Inkubation wurde das gesamte Reaktionsgemisch mittels HPLC-DAD analysiert und mit der Kontrolle (Enzymzugabe nach Inkubation) sowie der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid verglichen. Es stellte sich heraus, dass R₆ durch saure Phosphatase erfolgreich dephosphoryliert und zu Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid (R₇) umgewandelt werden konnte.

Daraufhin wurden weitere Aliquote mit Glucose-6-Phosphatase inkubiert und die Reaktionsgemische nach der Inkubation wie zuvor analysiert. Auch nach spezifischer Umsetzung mit Glucose-6-Phosphatase war Metabolit R₆ fast vollständig abgebaut (Abbildung 5.5). Der neu detektierte Peak stimmte in Retentionszeit und UV-Spektrum mit Metabolit R₇ überein und konnte durch der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid als ebendieses Konjugat identifiziert werden.

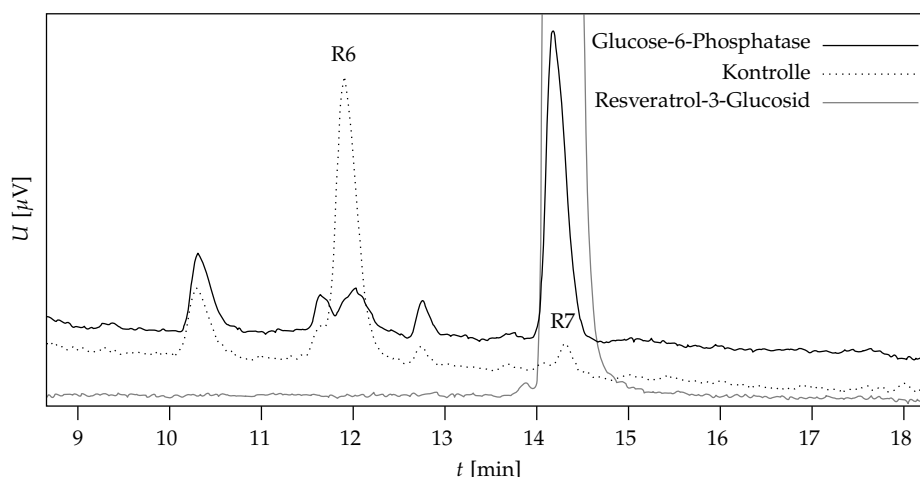


Abbildung 5.5: Umsetzung des Hauptmetaboliten R6 (Resveratrol-phosphoglykosid) mit Glucose-6-Phosphatase. Nach enzymatischer Behandlung (schwarze Linie) wurde R6 abgebaut und koeluiert mit R7, einem Resveratrol-3-Glucosid (graue Linie). In der Kontrolle (gepunktete Linie) blieb R6 konstant.

In der Kontrolle, die ohne Enzym unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde (Abbildung 5.5, gepunktete Linie), konnte auch ein kleiner Peak zur Retentionszeit von R7 detektiert werden. Dieser entstand wahrscheinlich durch nichtenzymatische Hydrolyse, die durch die leicht sauren Bedingungen während der Inkubation hervorgerufen wurde. Da die Peakfläche allerdings sehr gering ist im Vergleich zu R6, wurde die Umsetzung bei der Inkubation mit Enzym nicht einer sauren Hydrolyse, sondern dem Enzym zugeschrieben.

Die Hydrolyse des Resveratrol-phosphoglykosids R6 war somit nicht nur mit unspezifischer saurer Phosphatase, sondern auch spezifisch durch Glucose-6-Phosphatase erfolgreich. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Metabolit R6 um ein Resveratrol-3-O-(6'-phospho)-glucosid handelt.

Isolation und Analyse von R6 mittels NMR

Um weitere Hinweise auf die Struktur zu erhalten, wurde ca. 0,5 mg des Metaboliten R6 (Resveratrol-phosphoglykosid) durch präparative Chromatographie als Reinstoff isoliert und mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Die präparierte Menge war nicht ausreichend für 2-dimensionale NMR-Experimente, sodass ausschließlich ein ^1H -NMR-Spektrum der in Methanol- d_4 gelösten Substanz aufgezeichnet werden konnte. Durch Verwendung eines protischen deuterierten Lösungsmittels wurden alle Hydroxyl-Protonen durch Deuteronen ausgetauscht.

Zur Zuordnung der unbekanntenen Signale wurden Spektren mit der Software ChemDraw (CambridgeSoft) und online über nmrdb.org simuliert. Außerdem wurde ein ^1H -NMR-Spektrum der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid zum Vergleich aufgenommen, deren Signale wegen der bekannten Struktur zugeordnet werden konnten. Durch massenspektrometrische Analysen und Experimente mit Phosphatasen konnte bereits gezeigt werden, dass sich R6 von dieser Substanz lediglich durch eine Phosphatgruppe, die an den Glucoserest gebunden ist, unterscheidet.

Abbildung 5.6 zeigt einen Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Resveratrol-3-O-Glucosid und R6 zwischen 3,3 und 4,2 ppm. In diesem Bereich befinden sich die Signale von Protonen des Glucoserests. Wegen der Kopplungen der Protonen innerhalb des Glucopyranoserings waren nicht alle Signale eindeutig zuzuordnen.

Da sich R6 von der Referenzsubstanz Resveratrol-3-O-Glucosid nur durch eine Phosphatgruppe unterscheidet, sind Unterschiede zwischen den zwei Spektren ausschließlich auf den Einfluss der Phosphatgruppe zurückzuführen. War diese vorhanden (Abbildung 5.6 B), wurde die Verschiebung mehrerer Signale, besonders aber einer Signalgruppe, ins tiefere Feld (4,13 ppm) beobachtet. Das Integral dieser Signalgruppe entsprach (gerundet) zwei Protonen. Die einzige Gruppe zweier äquivalenter Protonen am Glucopyranosering befindet sich an Kohlenstoffatom C6. Bei Veresterung der dortigen Hydroxylgruppe mit einer Phosphatgruppe würden die Protonen an C6 eine stärkere Abschirmung durch den zusätzlichen Substituenten erfahren, was ihre chemische Verschiebung in positive Richtung verändern würde.

Ohne absolute Strukturaufklärung durch weitere, 2-dimensionale NMR-Experimente kann diese Änderung der chemischen Verschiebung von zwei Protonen lediglich als weiterer Hinweis betrachtet werden, dass Metabolit R6 die Phosphatgruppe an Position 6 des Glucoserests trägt.

Quantifizierung der Metaboliten

Mit Resveratrol, 3'-Hydroxyresveratrol (Piceatannol) und Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid wurden externe Kalibrierungen zwischen 0,1 μM und 100 μM vorgenommen. Über die Peakfläche im UV-Chromatogramm (305 nm) wurden Kalibrierkurven erstellt, deren Bestimmtheitsmaß $r^2 \geq 0,99$ war. Die Konzentration der Metaboliten in der Probe wurde ebenfalls über die Peakfläche bei 305 nm, mit Bezug auf die Kalibrierkurven, berechnet. Außer Piceatannol wurden alle Resveratrol-Konjugate auf die Kalibrierung mit Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid bezogen. Alle errechneten Konzentrationen der Metaboliten wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

In Tabelle 5.4 sind Mittelwert und halbe Spannweite der Konzentration aller Resveratrol-Metaboliten aufgelistet, ebenso wie der prozentuale Anteil einzelner Metaboliten an der Gesamtkonzentration. Das Resveratrol-phosphoglykosid R6 nahm mit $4,23 \pm 0,19 \mu\text{mol/g}$ Protein den mit Abstand größten Anteil ein (49,6%). Der am zweithöchsten konzentrierte Metabolit war ebenfalls ein Resveratrol-phosphoglykosid (R4, 6,8%). Alle anderen Metaboliten nahmen jeweils weniger als 5% der Gesamtkonzentration ein. Fast ein Drittel (29,5%) des aufgenommenen Resveratrols wurde nicht metabolisiert und war als *trans*-Resveratrol zu detektieren. Eine Hydroxylierung von Resveratrol zu Piceatannol (R8) ohne darauffolgende Konjugation fand in geringem Maße statt (1,1%).

Um den zeitlichen Konzentrationsverlauf der Resveratrol-Metaboliten zu dokumentieren, wurden zwölf Kulturen von *C. elegans* gleichzeitig mit Resveratrol inkubiert und die Inkubation jeweils zweier Kulturen nach 3, 6, 12, 24, 48 bzw. 72 h beendet. Eine Kontrollinkubation ohne Resveratrol, ebenfalls in Doppelbestimmung durchgeführt, diente als Zeitpunkt Null. Die Quantifizierung erfolgte über externe Kalibrierkurven wie oben beschrieben; alle gemessenen Konzentrationen wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

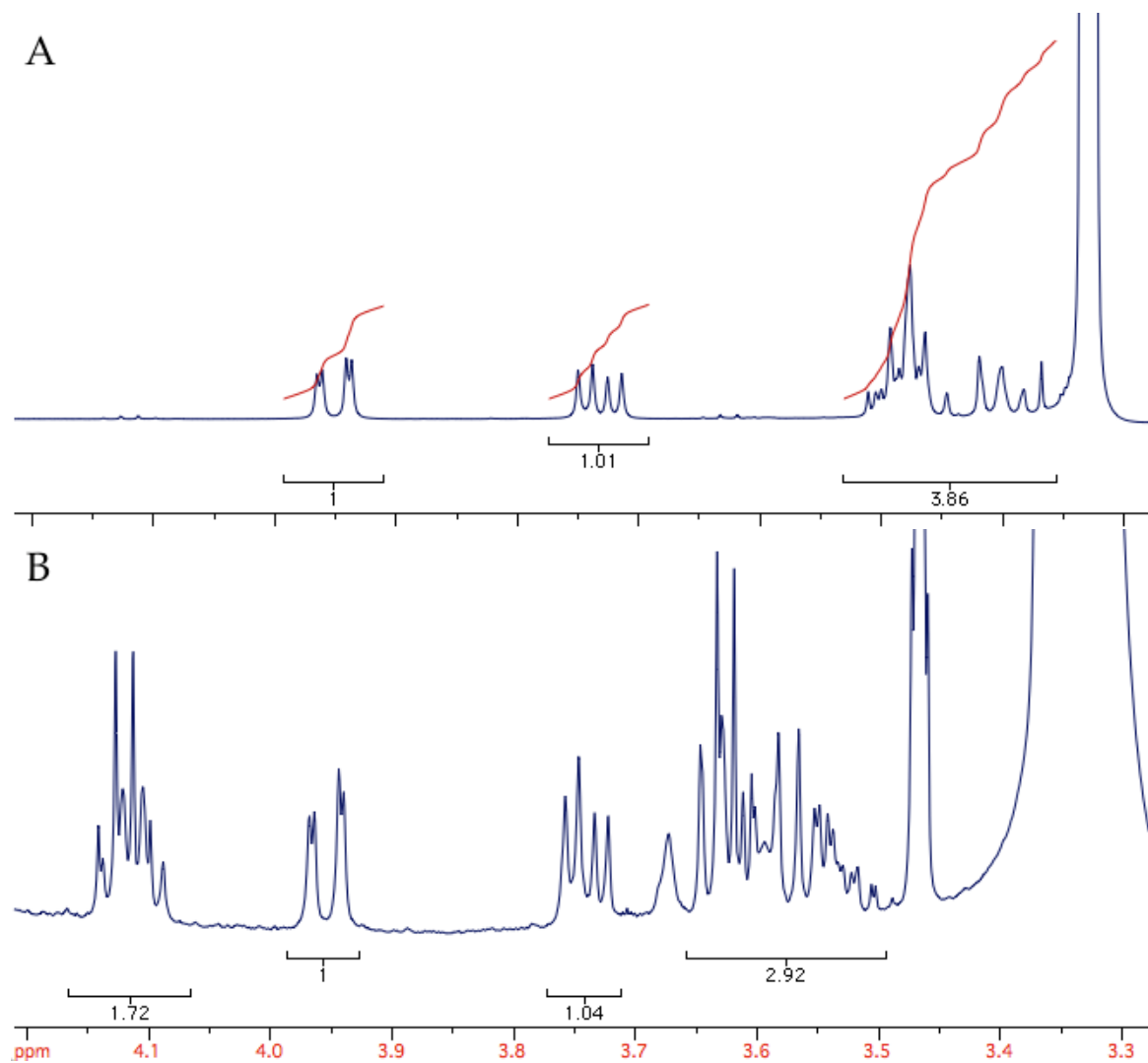


Abbildung 5.6: Ausschnitt aus den ¹H-NMR-Spektren von Resveratrol-3-O-β-D-glucopyranosid (A) und dem Resveratrol-3-O-phosphoglucosid R6 (B). Abgebildet sind die Signale von Protonen im Glucopyranosering sowie ihre Integrale. Bei Einführung einer Phosphatgruppe ändert sich die chemische Verschiebung einer Gruppe von zwei äquivalenten Protonen besonders stark. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Substitution an der Hydroxylgruppe von C6 stattgefunden hat.

Tabelle 5.4: Konzentration von Resveratrol und Resveratrol-Metaboliten in *C. elegans* nach 48-stündiger Inkubation. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$) nach Normierung auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe. Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LLOQ) betragen 0,01 bzw. 0,02 $\mu\text{mol/g}$ Protein. RT: Retentionszeit.

Peak	RT [min]	Konzentration [$\mu\text{mol/g}$ Protein]	Anteil [%]
R1	6,49	$0,20 \pm 0,01$	2,3
R2	7,99	$0,06 \pm 0,02$	0,7
R3	8,93	$0,29 \pm 0,05$	3,4
R4	9,19	$0,58 \pm 0,10$	6,8
R5	11,30	$0,11 \pm 0,01$	1,3
R6	11,77	$4,23 \pm 0,19$	49,6
R7	13,98	$0,41 \pm 0,05$	4,8
R8	15,72	$0,09 \pm 0,03$	1,1
R9	16,19	< LOQ	0,1
R10	18,16	$0,03 \pm 0,00$	0,4
Resveratrol	20,63	$2,52 \pm 0,43$	29,5

Abbildung 5.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen von Resveratrol, der drei Hauptmetaboliten R4, R6 und R7 sowie der geringer konzentrierten Metaboliten R1, R2, R5 und Piceatannol (R8). Die Konzentration von R3, R9 und R10 war insbesondere bei den kurzen Inkubationszeiten zu gering, um eine aussagekräftige Darstellung zu erhalten. Diese Metaboliten sind daher nicht Teil der Grafik. Dargestellt sind die Einzelwerte von zwei parallelen Bestimmungen über den beobachteten Zeitraum sowie Trendlinien, die auf dem Mittelwert der Doppelbestimmung basieren. Alle Werte sind auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

Beim Vergleich der Konzentrationsmaxima lassen sich die Resveratrol-Konjugate in zwei Gruppen einteilen: eine erreichte ihr Maximum nach 12 h (R2, R5, R7), die andere nach 24 h (R1, R4, R6). Piceatannol als Phase-I-Metabolit von Resveratrol hatte die höchste Konzentration nach 48 h. Alle Metaboliten der ersten Gruppe sind mit einem oder zwei Glykosylresten konjugiert, während die der zweiten Gruppe zusätzlich mit Phosphatresten konjugiert sind. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, die bereits für die Flavon-Metaboliten F6 und F5 aufgestellt wurde (Tabelle 5.2): Bei der Metabolisierung in *C. elegans* werden Fremdstoffe zunächst glykosyliert, danach in einer zweiten Reaktion phosphoryliert, weshalb phosphorylierte Metaboliten erst nach längerer Inkubationszeit mit maximaler Konzentration detektiert werden.

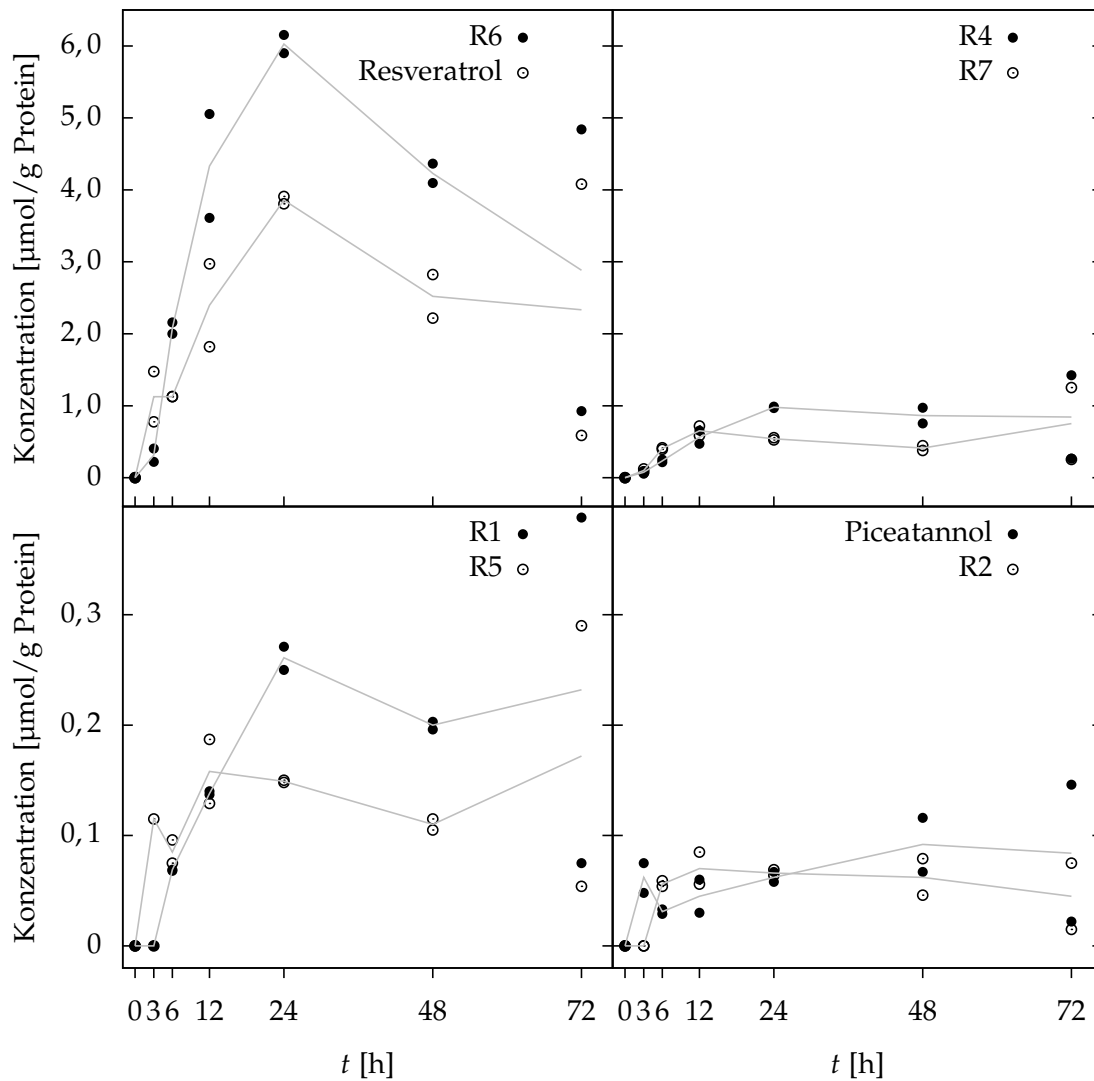


Abbildung 5.7: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Resveratrol und seiner Metaboliten in *C. elegans*. Die Grafik zeigt die Messwerte mit Trendlinie aus zwei Bestimmungen pro Zeitpunkt. Die gemessenen Konzentrationen wurden jeweils auf den Proteingehalt der Probe normiert.

5.1.3 Metabolisierung von *p*-Aminobenzoesäure

Eine synchronisierte Kultur aus *C. elegans* L₄-Larven wurde 24 h lang bei 20 °C mit *p*-Aminobenzoesäure (PABA, 100 mM) inkubiert. Nach Homogenisation und Extraktion der Kultur konnten mittels HPLC-UV neben unmetabolisierter *p*-Aminobenzoesäure zwei Metaboliten (P1, P2) detektiert werden, die nicht in der Lösungsmittelkontrolle vorhanden waren (Abbildung 5.8).

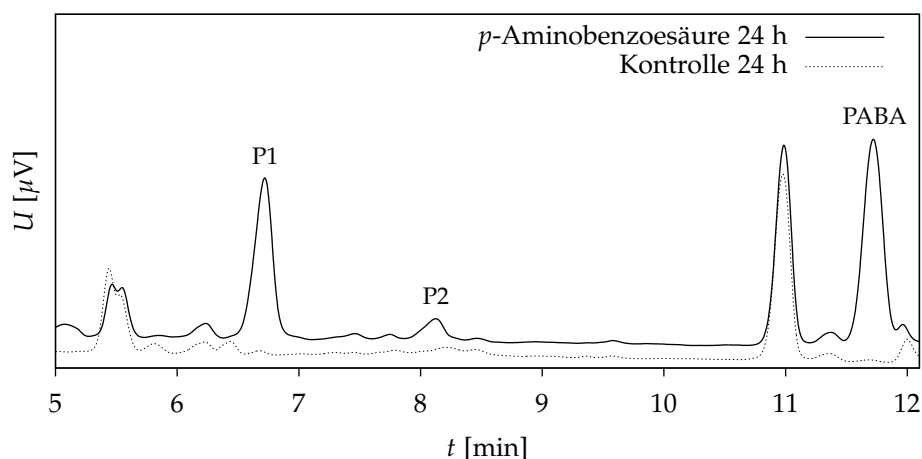


Abbildung 5.8: UV-Chromatogramm ($\lambda = 285$ nm) eines Extraktes von *C. elegans* nach 24-stündiger Inkubation mit *p*-Aminobenzoesäure (durchgezogene Linie) bzw. reinem Lösungsmittel (gepunktete Linie).

Konjugation mit Hexose und Phosphat

Die Strukturaufklärung der Metaboliten wurde mit hochauflösender Massenspektrometrie im PI-Modus durchgeführt. Tabelle 5.5 fasst die akkurate Masse der detektierten Molekülonen sowie Fragmente und die postulierte Struktur der Metaboliten zusammen. Massenspektren sind in Anhang C.1, S. 107 zu finden.

Das Aglykon PABA wurde mit einer akkuraten Molekülonenmasse von m/z 138,0543 detektiert. Im Fragmentspektrum wurden Ionen detektiert, welche die Abspaltung von Wasser (-18 Da, m/z 120,0427) und der Carboxylgruppe als CO_2 (-44 Da, m/z 94,0642) dokumentieren. Fragment-Ionen mit m/z 77,0381 und 65,0382 konnten einem Benzyl- bzw. Cyclopentadienylkation zugeordnet werden, zwei typischen Fragmenten einer benzoiden Verbindung. Der in *C. elegans* detektierte Metabolit PABA stimmte in Retentionszeit, Molekül- und Fragment-Ionen mit der eingesetzten Testsubstanz überein.

Metabolit P1 wurde als protoniertes Molekülon $[\text{M}+\text{H}]^+$ sowie als Natriumaddukt $[\text{M}+\text{Na}]^+$ detektiert (m/z 380,0743 bzw. 402,0557). Die akkurate Masse konnte der Struktur eines PABA-phosphoglykosids zugeordnet werden. Im Fragmentspektrum des Molekülonen wurden die Ionen mit m/z 243,0248 und 98,9828 am häufigsten detektiert (Abbildung C.1, S. 107). Diese entsprechen strukturell einem Phosphoglykosid- bzw. einem Phosphat-Rest. Das PABA-Aglykon wurde mit m/z 138,0549 detektiert. Die Fragmentierung des Konjugats erfolgte durch sukzessiven Verlust von Phosphorsäure und Wasser (-116 Da, m/z 264,0855), $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ aus dem Glykosid (-60 Da,

Tabelle 5.5: Akkurate Masse von Molekül- und Fragment-Ionen im PI-Modus sowie postulierte Strukturen der Metaboliten von *p*-Aminobenzoesäure (PABA) in *C. elegans*. Die Abweichung der gemessenen *m/z* ist auf die berechnete exakte Ionenmasse bezogen.

Peak	RT [min]	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Abweichung [mDa] (ppm)	<i>m/z</i> Fragment-Ionen	Postulierte Struktur
P1	6,72	380,0735	-0,60 (-1,58)	264, 243, 204, 158, 145, 138, 99	PABA-phosphoglykosid
P2	8,12	322,0897 [‡]	-0,02 (-0,06)	300, 138, 121	PABA-glykosid
PABA	11,72	138,0543	-0,66 (-4,78)	120, 94, 77, 65	<i>p</i> -Aminobenzoesäure

[‡]Natrium-Addukt [M+Na]⁺

m/z 204,0628), erneuter Wasserabspaltung (-18 Da, *m/z* 186,0583) sowie Verlust von CO (-28 Da, *m/z* 158,0593). In Abbildung 5.9 sind diese Fragmente mit hypothetischen Strukturformeln aufgelistet. Da ein Fragment nach Verlust des Phosphatrests, aber keines nach Verlust des Glykosids allein detektiert wurde, muss die Konjugation von PABA über das Glykosid stattgefunden haben. Dass Glykosid- und Phosphatrest aneinander gebunden waren, belegt das Fragment mit *m/z* 243,0248. Diese Art der Verknüpfung wurde bereits bei den Phosphoglykosid-Konjugaten von Flavon und Resveratrol beobachtet.

Die Konjugation mit dem Phosphoglykosid kann entweder über die Carboxylgruppe oder über die Aminogruppe erfolgen. Die in Abbildung 5.9 angestellten Überlegungen zur Fragmentierung zeigen, dass mehrere Fragment-Ionen sowohl nach N- als auch nach O-Glykosylierung entstanden sein können. Lässt man Umlagerungen außer Acht, die unter den Fragmentierungsbedingungen nie vollständig ausgeschlossen werden können, erscheint es aber wahrscheinlicher, dass dem Fragment mit *m/z* 158,0593 ein N-Glykosid als Vorläuferion zugrunde lag. Das Auftreten dieses Fragments legt daher nahe, dass die Glykosylierung über die Aminogruppe stattfand. Diese Art der Glykosylierung wurde in *C. elegans* bereits nach Inkubation mit den stickstoffhaltigen Substanzen Albendazol und Indol beschrieben (Laing et al., 2010; Stupp et al., 2012), was die Annahme weiter unterstützt.

Von Metabolit P2 wurden hauptsächlich Natrium- und Kaliumaddukte [M+Na]⁺, [2M+Na]⁺ bzw. [M+K]⁺ detektiert (*m/z* 322,0897, 621,1893 bzw. 338,0636, Abbildung C.2, S. 108). Das Molekülion [M+H]⁺ (*m/z* 300,1067) war nur mit geringer Intensität zu detektieren. Diesem konnte die Struktur eines PABA-glykosids zugeordnet werden. Das Fragmentspektrum enthielt das Molekülion ohne Addukte (*m/z* 300,1081) sowie das protonierte Aglykon nach Abspaltung des Glykosids (*m/z* 138,0520). Es konnten keine Hinweise erhalten werden, ob es sich um ein N- oder O-Glykosid handelt.

Quantifizierung der Metaboliten

Zur Quantifizierung der PABA-Metaboliten stand lediglich das Aglykon als Kalibrierstandard zur Verfügung. Die Konjugate wurden daher über ihre Peakfläche bei 285 nm mit Bezug auf die Peakfläche von PABA quantifiziert. Die externe Kalibrierung zwischen 0,1 und 100 µM war über den gesamten Bereich linear ($r^2 = 0,999$); die Nachweisgrenze lag unterhalb des kleinsten Kalibrier-

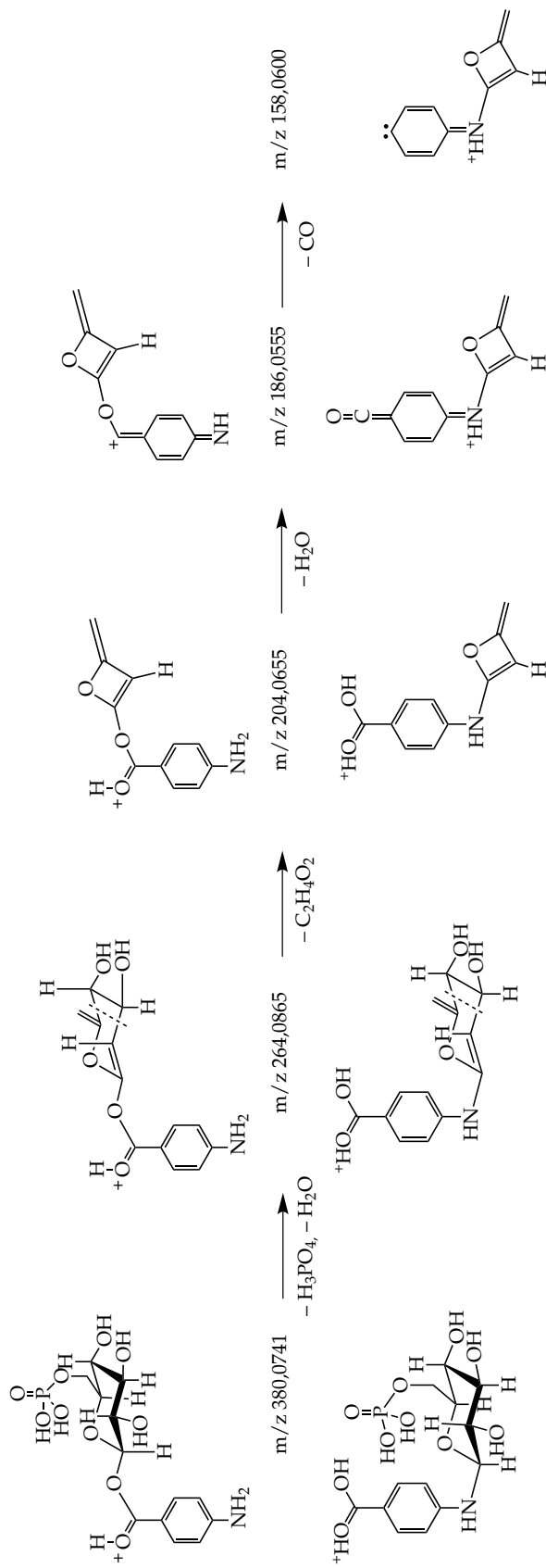


Abbildung 5.9: Hypothetisches Fragmentierungsmuster von *p*-Aminobenzoensäure-phosphoglykosid bei Konjugation über die Carboxylgruppe (oben) oder über die Aminogruppe (unten). Angegeben ist jeweils die berechnete exakte Ionenmasse. Das im Spektrum (Abbildung C.1, S. 107) detektierte Fragment mit *m/z* 158 kann ausschließlich nach N-Glykosylierung entstehen.

5 Ergebnisse

punkts. Die berechneten Konzentrationen der Metaboliten wurden jeweils auf den Proteingehalt der Probe normiert.

Die Aufnahme von PABA und damit auch die Gesamtkonzentration der Metaboliten war bei den zwei unabhängigen Experimenten unterschiedlich; die Konzentrationen innerhalb eines Experiments schwankten weniger stark. Aus diesem Grund sind die zwei Experimente in Tabelle 5.6 separat dargestellt. Die Konzentrationsanteile der einzelnen Metaboliten sind reproduzierbar: unmetabolisierte PABA war Hauptbestandteil mit 55% bzw. 60% der Gesamtkonzentration. Das PABA-phosphoglykosid nahm einen Anteil von 40% bzw. 33,5% ein. Die zu 100% fehlenden Anteile von 5 bzw. 6,5% wurden vom PABA-glykosid eingenommen.

Tabelle 5.6: Metabolitenkonzentration in *C. elegans* nach 24-stündiger Inkubation mit PABA. Wegen der unterschiedlichen Gesamtkonzentration sind zwei unabhängige Experimente separat dargestellt. Angegeben sind die mittlere Konzentration und halbe Spannweite aus zwei Inkubationen.

Experiment	Konzentration [$\mu\text{mol/g}$ Protein] (Anteil Gesamtkonzentration)		
	PABA	PABA-phosphoglykosid (P1)	PABA-glykosid (P2)
1	$6,19 \pm 0,10$ (60%)	$3,46 \pm 0,12$ (33,5%)	$0,66 \pm 0,05$ (6,5%)
2	$3,29 \pm 0,16$ (55%)	$2,39 \pm 0,09$ (40,0%)	$0,30 \pm 0,03$ (5,0%)

5.1.4 Metabolisierung von Quercetin

C. elegans wurde auf verschiedene Arten mit Quercetin inkubiert: Wie für die anderen Testsubstanzen beschrieben, wurden synchronisierte L₄-Larven für 24 h und 48 h mit Quercetin auf NGM-Agar kultiviert. Zur Untersuchung der Ausscheidung gebildeter Metaboliten wurde zusätzlich eine Flüssigkultur von *C. elegans* für 48 h mit Quercetin inkubiert. Wie schon bei Resveratrol beschrieben, wurde auch Quercetin durch ein *C. elegans*-Homogenat in Anwesenheit von UDP-Glucose umgesetzt, um gezielt Glucosid-Konjugate von Quercetin zu erhalten.

Qualitative Vorarbeiten zur Strukturaufklärung der durch L₄-Larven gebildeten Metaboliten wurden bereits während der Diplomarbeit geleistet. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse durch die Inkubation von *C. elegans*-Homogenat mit Quercetin und UDPG verfeinert. Der Schwerpunkt lag jedoch auf der Quantifizierung der intrazellulären Metaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten, sowie auf der qualitativen und quantitativen Beschreibung der Ausscheidung gebildeter Metaboliten.

Umsetzung von Quercetin durch *C. elegans*-L₄-Larven

Synchronisierte L₄-Larven von *C. elegans* wurden für 24 h und 48 h mit 100 μ M Quercetin inkubiert. Durch qualitative Vorversuche während der Diplomarbeit konnten zu beiden Zeitpunkten im UV-Chromatogramm 17 Metaboliten Q1–Q17 detektiert werden, die nicht in der Lösungsmittelkontrolle vorhanden waren (Abbildung 5.10).

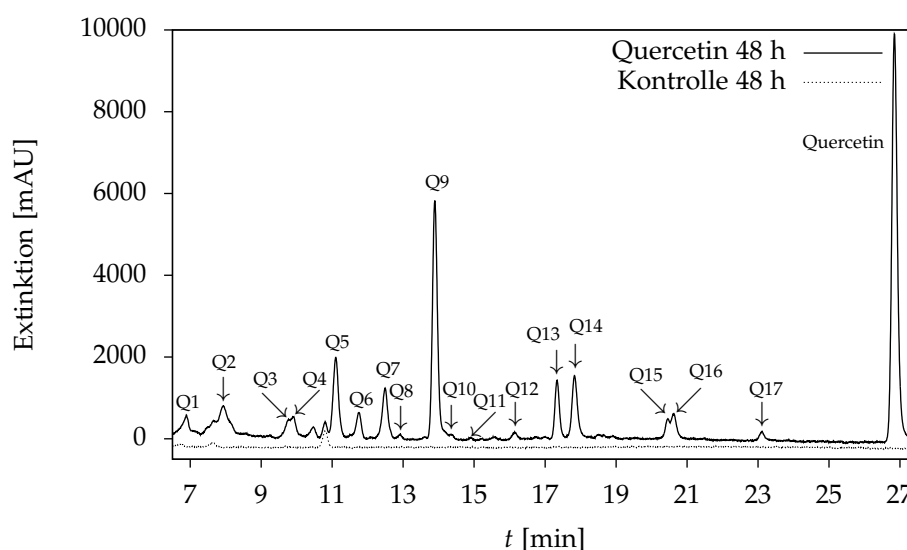


Abbildung 5.10: UV-Chromatogramm ($\lambda = 370$ nm) eines Extrakts von *C. elegans* nach 48-stündiger Inkubation mit Quercetin (Vorversuch aus Diplomarbeit).

Die qualitative Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie zeigte, dass es sich bei Q9 um die Überlagerung von zwei Metaboliten handelte, die im Weiteren Q9a und Q9b genannt werden. Ausgehend von der akkuraten Masse der Moleküle wurden fünf verschiedene Konjugationsarten detektiert, deren Isomere die 18 verschiedenen Metaboliten darstellen. Wie bei Flavon

5 Ergebnisse

und Resveratrol waren diese mit Glykosyl- und Phosphatresten konjugiert: vier Glykoside, jeweils drei Diglykoside und Phosphoglykoside, sieben Phosphodiglykoside sowie ein Diphosphodiglykosid konnten detektiert werden. Über Referenzsubstanzen wurden die Metaboliten Q8, Q12, Q13 und Q15 als Quercetin-3,4'-diglucosid, Quercetin-7-O-, -3-O- bzw. -4'-O-glucosid identifiziert. In Tabelle 5.7 sind detektierte Molekül- und Fragment-Ionen, die Abweichung der gemessenen von der berechneten Ionenmasse sowie postulierte Strukturen aller Metaboliten aufgeführt.

Tabelle 5.7: Akkurate Masse von Molekül- und Fragment-Ionen im NI-Modus sowie postulierte Strukturen der Quercetin-Metaboliten in *C. elegans* (Vorversuche aus Diplomarbeit). Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete exakte Ionenmasse bezogen.

Peak	RT [min]	m/z [M-H] ⁻	Abweichung [mDa] (ppm)	m/z Fragment-Ionen	Postulierte Struktur
Q1	6,89	705,1077	+0,35 (+0,50)	543, 300, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q2	7,92	785,0728	-0,88 (-1,12)	687, 543, 301, 241, 97, 79	Quercetin-diphosphodiglykosid
Q3	9,90	705,1078	+0,45 (+0,64)	543, 301, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q4	10,47	705,1069	-0,45 (-0,64)	543, 463, 301, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q5	11,10	705,1073	-0,05 (-0,07)	543, 463, 301, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q6	11,76	705,1068	-0,55 (-0,78)	543, 463, 381, 301, 241, 97, 79	Quercetin-diglykosyl-phosphatester
Q7	12,49	705,1057	-1,65 (-2,34)	543, 301, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q8	12,92	625,1394	-1,62 (-2,59)	463, 301, 179, 151	Quercetin-3,4'-diglucosid ¹
Q9a	13,89	705,1072	-0,15 (-0,21)	607, 543, 301, 241, 97, 79	Quercetin-phosphodiglykosid
Q9b	13,89	543,0539	-0,63 (-1,16)	381, 301, 241, 151, 97, 79	Quercetin-glykosylphosphatester
Q10	14,34	625,1491	+8,08 (+12,9)	463, 301	Quercetin-diglykosid
Q11	14,91	625,1396	-1,42 (-2,27)	463, 301	Quercetin-diglykosid
Q12	16,14	463,0874	-0,80 (-1,73)	301, 151, 107	Quercetin-7-O-glucosid ¹
Q13	17,34	463,0875	-0,70 (-1,51)	301, 179, 151, 121, 107	Quercetin-3-O-glucosid ¹
Q14	17,82	543,0532	-1,33 (-2,45)	445, 301, 241, 151, 97, 79	Quercetin-phosphoglykosid
Q15	20,46	463,0872	-1,00 (-2,16)	301, 179, 151, 121, 107	Quercetin-4'-O-glucosid ¹
Q16	20,62	543,0529	-1,63 (-3,00)	301, 241, 179, 151, 97, 79	Quercetin-phosphoglykosid
Q17	23,11	463,0878	-0,40 (-0,86)	301, 179, 151, 121, 107	Quercetin-glykosid
Quercetin	26,84	301,0359	+0,52 (+1,73)	179, 151, 121, 107	Quercetin

¹Über Referenzsubstanz identifiziert.

Umsetzung von Quercetin mit *C. elegans*-Homogenat

Ein Homogenat aus *C. elegans* L₄-Larven wurde 48 Stunden mit UDPG und Quercetin inkubiert, extrahiert und durch HPLC analysiert. Im Chromatogramm bei 370 nm waren elf Peaks Q_A–Q_M neben Quercetin zu detektieren, die weder in der Kontrolle ohne UDPG, noch in der Kontrolle ohne Homogenat vorhanden waren (Abbildung 5.11). Nach Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie konnte den elf Metaboliten eine von zwei Molekülionenmassen zugeordnet werden: m/z 463,0882 bzw. m/z 625,1410. Diese entsprechen, ausgehen von ihrer Summenformel,

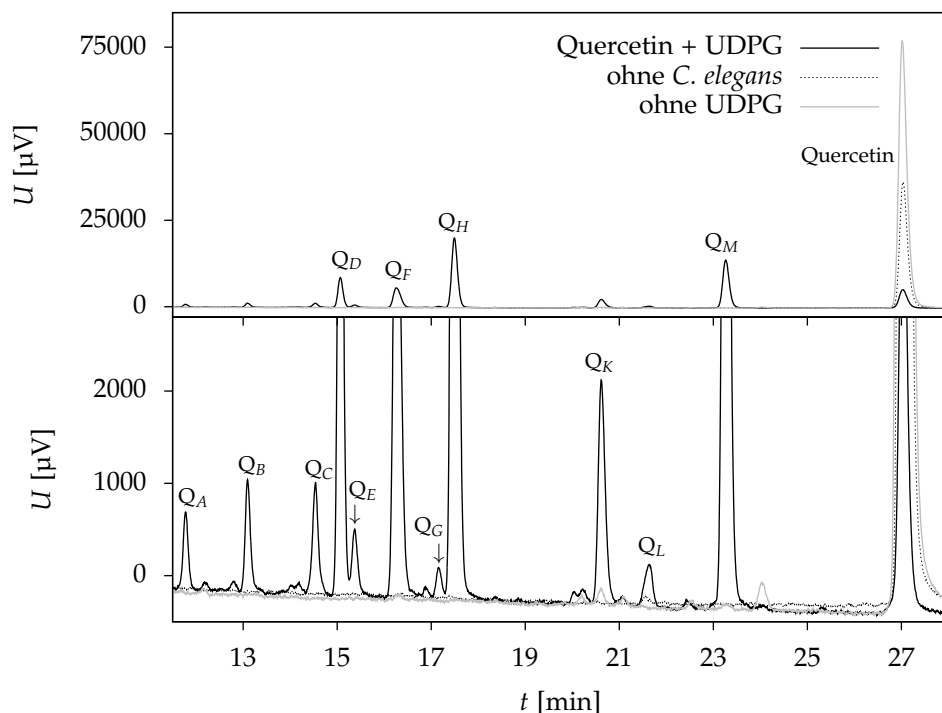


Abbildung 5.11: UV-Chromatogramm ($\lambda = 370 \text{ nm}$) der Umsetzung von Quercetin durch ein Homogenat aus *C. elegans* L₄-Larven mit Uridin-5'-diphosphoglucose (schwarze Linie). Die gekennzeichneten Metaboliten sind nicht in den Kontrollen ohne UDPG (graue Linie) oder ohne Homogenat (schwarz gepunktet) enthalten.

Quercetin-glykosiden (Q_E , Q_F , Q_H , Q_K , Q_M) bzw. -diglykosiden (Q_A – Q_D , Q_G , Q_L). Da als Substrat für die Konjugation nur UDP-Glucose zur Verfügung stand, werden die Metaboliten im weiteren Verlauf als Quercetin-glucoside und -diglucoside bezeichnet.

Die im hochauflösenden Massenspektrometer aufgenommenen Fragmentspektren (Anhang C.3, S. 113) der einzelnen Metaboliten gaben keine Hinweise auf die Position der Konjugation. In allen Spektren war das Molekülion des Aglykons Quercetin mit m/z 301,0254 zu detektieren. Bei den Quercetin-diglucosiden wurde jeweils der Verlust eines Glucoserests (-162 Da) durch ein Fragment-Ion mit m/z 463,0882 dokumentiert. Darüber hinaus wurden RDA-Fragmente von Quercetin detektiert: In jedem Fragmentspektrum waren das $^{1,2}A^-$ - und das $^{1,3}A^-$ -RDA-Fragment mit m/z 178,9986 bzw. 151,0037 vorhanden.

Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen konnten die Quercetin-glucoside Q_F , Q_H und Q_K als Quercetin-7-O-, -3-O-, bzw. -4'-O-glucosid identifiziert werden. Q_A und Q_B wurden als Quercetin-7,4'- bzw. -3,4'-diglucosid identifiziert. Retentionszeit, Molekülion, UV- und Fragmentspektren der Metaboliten stimmten mit denen der Referenzsubstanzen überein. Da Quercetin fünf Hydroxylgruppen hat, an denen ein Glucosid gebunden sein kann, müssen die zwei verbleibenden Quercetin-glucoside Q_E und Q_M Quercetin-5-O- und -3'-O-glucosid sein, wobei die Zuordnung ohne Referenzsubstanzen nicht zu klären war. Die übrigen Quercetin-diglucoside Q_C , Q_D , Q_G und

Q_L konnten ohne Referenzsubstanzen ebenfalls nicht identifiziert werden. Aus den Fragmentspektren konnten keinerlei Hinweise erhalten werden, an welcher Position einzelne oder miteinander verknüpfte Glucoside gebunden waren.

Einige der im Homogenat detektierten Metaboliten wurden auch schon bei der Inkubation von L_4 -Larven mit Quercetin gefunden. Neben den bereits identifizierten drei Glucosiden und Quercetin-3,4'-diglucosid stimmten die Retentionszeit sowie UV- und massenspektrometrische Parameter von Q_C mit Q_{10} , Q_D mit Q_{11} , sowie von Q_M mit Q_{17} überein. Q_{10} und Q_{11} können daher als Quercetin-diglucoside bezeichnet werden, Q_{17} als Quercetin-glucosid.

Da schon Glucoside an den Hydroxylgruppen in Position 3, 7 und 4' identifiziert wurden, bleiben für die Konjugation des Glucosids bei Q_{17} noch die Positionen 5 und 3'. Das Proton der Hydroxylgruppe in Position 5 bildet mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom an C4 eine Wasserstoffbrücke, weswegen diese Position für Konjugationen anscheinend nicht verwendet wird (Boersma et al., 2002). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei Q_{17} wahrscheinlich um Quercetin-3'-O-glucosid handelt.

Quantifizierung der Metaboliten

Quercetin und alle in *C. elegans* gebildeten Quercetin-Metaboliten wurden mittels HPLC-DAD über die Peakfläche bei 370 nm quantifiziert. Als Referenzsubstanzen zur externen Kalibrierung standen das Aglykon, Quercetin-3-O-, -7-O- und -4'-O-glucosid sowie Quercetin-3,4'-diglucosid zur Verfügung. Andere als die genannten Glucoside und Diglucoside wurden über Quercetin-7-O- bzw. Quercetin-3,4'-diglucosid, die übrigen, phosphathaltigen Konjugate über Quercetin-7-O-glucosid quantifiziert. Ermittelte Konzentrationen wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

Die Konzentrationen von Quercetin-Metaboliten aus *C. elegans*, die 24 bzw. 48 h auf NGM-Agar inkubiert wurden, sind in Tabelle 5.8 angegeben. Die Gesamtkonzentration nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation betrug $4,47 \pm 0,61$ bzw. $6,74 \pm 0,50$ μM . Davon fielen 13,4 bzw. 37,1% auf unmetabolisiertes Quercetin. Hauptmetabolit nach beiden Inkubationszeiten (22,5% bzw. 20,1% aller Metaboliten) war die Summe aus Q_{9a} und Q_{9b} (Quercetin-phosphodiglykosid bzw. -glykosylphosphatester), die durch UV-Detektion nicht getrennt werden konnten. Alle anderen Metaboliten hatten nach 24 und 48 h Konzentrationsanteile unter 10%.

Beim Vergleich der Konzentrationen nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten fällt vor allem die starke Zunahme unmetabolisierten Quercetins auf. Durch kontinuierliche Aufnahme des Aglykons über 48 h sind die für Konjugationen verantwortlichen Enzyme möglicherweise bereits ausgelastet, sodass Quercetin in *C. elegans* akkumuliert. Die Konzentrationsanteile der einzelnen Konjugate blieben zwischen 24 und 48 h weitestgehend unverändert, außer bei Q_2 , Q_3 sowie Q_{13} , Q_{15} und Q_{17} . Die absolute und relative Konzentration der Metaboliten Q_2 und Q_3 stieg nach 48-stündiger Inkubation bedeutend an, wohingegen die von Q_{13} , Q_{15} und Q_{17} sank. Die letzteren drei Metaboliten wurden als Quercetin-glucoside identifiziert, während Q_2 und Q_3 Diphosphodiglykosid- bzw. Phosphodiglykosid-Konjugate sind. Diese wechselseitigen Konzentrationsveränderungen sind vergleichbar mit den Konzentrationsverläufen der Flavon-Metaboliten F_5 und F_6 (Tabelle 5.2) und der verschiedenen Resveratrol-Metaboliten (Abbildung 5.7). Die Metabolisierung

Tabelle 5.8: Quantifizierbare Metaboliten von Quercetin in *C. elegans* nach 24- und 48-stündiger Inkubation auf NGM-Agar. Angegeben sind der Mittelwert und die halbe Spannweite aus zwei Bestimmungen, jeweils normiert auf den Proteingehalt der Probe. Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LLOQ) lagen bei 0,01 bzw. 0,02 $\mu\text{mol/g}$ Protein. RT, Retentionszeit.

Peak	RT [min]	Konzentration [$\mu\text{mol/g}$ Protein]		Anteil [%]	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Q1	6,89	0,08 \pm 0,01	0,04 \pm 0,05	1,8	0,6
Q2	7,92	0,15 \pm 0,07	0,37 \pm 0,03	3,3	5,6
Q3	9,90	0,10 \pm 0,01	0,25 \pm 0,04	2,1	3,8
Q4	10,47	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	1,5	1,3
Q5	11,10	0,42 \pm 0,12	0,46 \pm 0,04	9,3	6,9
Q6	11,76	0,14 \pm 0,03	0,15 \pm 0,00	3,0	2,3
Q7	12,49	0,25 \pm 0,06	0,32 \pm 0,06	5,7	4,9
Q8	12,92	0,05 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	1,1	0,3
Q9a+b	13,89	1,02 \pm 0,39	1,33 \pm 0,11	22,5	20,1
Q10	14,34	0,04 \pm 0,04	Spuren	0,9	< 0,1
Q11	14,91	0,04 \pm 0,01	Spuren	1,0	< 0,1
Q12	16,14	0,06 \pm 0,00	Spuren	1,4	< 0,1
Q13	17,34	0,44 \pm 0,06	0,30 \pm 0,03	9,9	4,6
Q14	17,82	0,32 \pm 0,10	0,43 \pm 0,03	7,1	6,5
Q15	20,46	0,37 \pm 0,06	0,03 \pm 0,03	8,5	0,5
Q16	20,62	0,17 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02	3,9	4,3
Q17	23,11	0,16 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	3,5	1,2
Quercetin	26,84	0,58 \pm 0,11	2,45 \pm 0,20	13,4	37,1
Summe	—	4,47 \pm 0,61	6,74 \pm 0,50	100	100

in *C. elegans* scheint in erster Stufe durch Glucosylierung zu erfolgen, worauf zu späterer Zeit eine Phosphorylierung bzw. weitere Glykosylierung folgt.

Ausscheidung der Metaboliten

Zur Untersuchung der Ausscheidung gebildeter Quercetin-Metaboliten wurden synchronisierte L₄-Larven von *C. elegans* in Flüssigmedium kultiviert und 48 h mit 100 μM Quercetin inkubiert. Extrakte der Würmer und des gefriergetrockneten Mediums wurden wie bei den anderen Experimenten analysiert. Abbildung 5.12 zeigt die Chromatogramme der Extrakte aus Würmern und Medium mit jeweiliger Lösungsmittelkontrolle.

Das Metabolitenprofil in *C. elegans* bei Kultivierung in Flüssigmedium unterschied sich von dem bei Kultivierung auf NGM-Agar. Allgemein war der unmetabolisierte Anteil von Quercetin höher in der Flüssigkultur. Von den 18 Metaboliten, die nach Kultivierung von *C. elegans* mit Quercetin auf NGM-Agar detektiert wurden, konnten lediglich elf in den Nematoden aus Flüssigkultur detektiert werden (Abbildung 5.12, oben). Ihre Retentionszeiten und massenspektrometrischen Eigenschaften stimmten mit denen der Metaboliten aus NGM-Agar-Kultur überein. Den größten Anteil nahm unmetabolisiertes Quercetin ein; Hauptkonjugat war Q13.

Zwei weitere Metaboliten Q_x und Q_y konnten in *C. elegans* aus Flüssigkultur detektiert werden und waren nicht in den auf NGM-Agar kultivierten Nematoden zu finden. Hochauflösende Massenspektrometrie zeigte, dass beide Metaboliten die gleiche akkurate Ionenmasse von

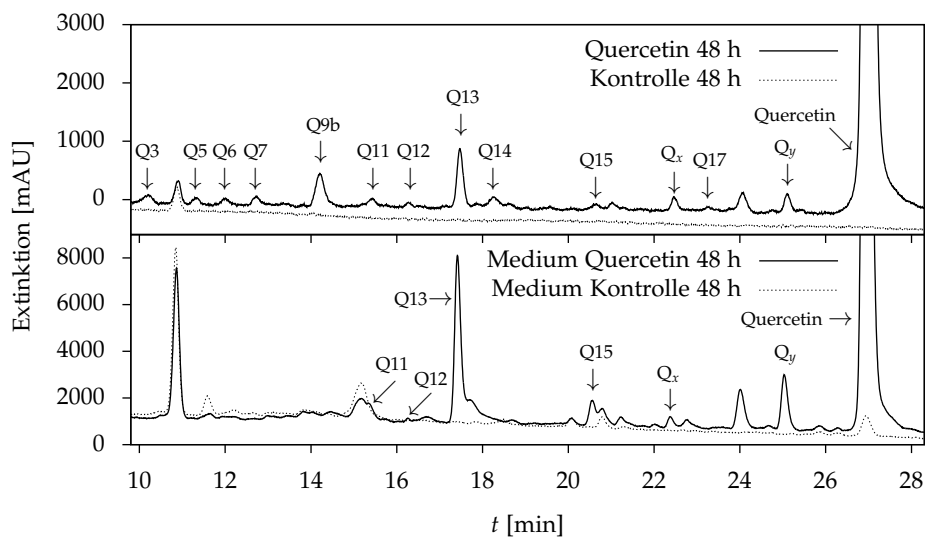


Abbildung 5.12: UV-Chromatogramme ($\lambda = 370$ nm) der Extrakte aus einer Flüssigkultur von *C. elegans*. Oben: Extrakte aus *C. elegans*, die 48 h mit Quercetin (durchgezogene Linie) oder Lösungsmittel (gepunktete Linie) inkubiert wurden. Unten: Extrakte des Flüssigmediums mit Quercetin (durchgezogene Linie) oder Lösungsmittel (gepunktete Linie).

m/z 447,0933 hatten. Im Fragmentspektrum wurden Anion und RDA-Fragmente von Quercetin detektiert; es handelte sich demnach um Quercetin-Konjugate. Ausgehend von der akkuraten Ionenmasse wurde den Metaboliten Q_x und Q_y die Struktur von Quercetin-desoxyhexosiden zugeordnet.

Im gefriergetrockneten, extrahierten Medium konnten durch chromatographische Analyse sechs Quercetin-Metaboliten sowie das Aglykon detektiert werden (Abbildung 5.12, unten). Quercetin, das vor der Inkubation in hoher Konzentration zum Medium gegeben worden war, hatte im extrahierten Medium immer noch den größten Anteil. Der Hauptmetabolit war wie in den Proben aus *C. elegans* das Quercetin-3-O-Glucosid (Q13). Die in Nematoden aus Flüssigkultur detektierten Quercetin-desoxyhexoside Q_x und Q_y konnten auch im extrahierten Flüssigmedium detektiert werden.

Außer Q11, einem Quercetin-diglucosid, waren alle im Medium detektierten Konjugate Glykoside (bzw. Desoxyglykoside im Fall von Q_x und Q_y). Phosphorylierte Konjugate, wie sie in Würmern (sowohl in Flüssig- als auch in Agar-Kultur) detektiert wurden, konnten im Medium nicht nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine kontrollierte Ausscheidung der Konjugate durch *C. elegans* hindeuten. Glykoside werden ausgeschieden, phosphorylierte Metaboliten hingegen bewusst zurückgehalten, möglicherweise um den Verlust von Phosphat zu verhindern. Phosphorylierte Quercetin-Metaboliten könnten auch als Transport- oder Speicherformen dienen, die vor der Ausscheidung wieder zu Glykosiden hydrolysiert werden. Bei unspezifischer Ausscheidung aller Metaboliten hätten phosphathaltige Metaboliten zumindest in Spuren detektiert werden müssen, da sie von *C. elegans* auch in Flüssigkultur in nicht unbedeutender Menge gebildet werden (Q3–Q9).

Zur besseren Beurteilung der Ausscheidung wurden alle im Flüssigmedium und in *C. elegans* aus Flüssigkultur detektierten Metaboliten quantifiziert. Wie bei den Proben aus NGM-Agar-

Kultivierung wurden dazu die Peakflächen der Metaboliten im UV-Chromatogramm bei 370 nm verwendet und auf die entsprechenden Referenzsubstanzen bezogen. In Tabelle 5.9 sind alle quantifizierten Metaboliten zusammengefasst.

Die Beobachtungen aus dem Chromatogramm werden durch die Quantifizierung bestätigt: Nach unmetabolisiertem Quercetin war Quercetin-3-O-glucosid der am höchsten konzentrierte Analyt, sowohl in *C. elegans* als auch im Flüssigmedium. Phosphorylierte Quercetin-Metaboliten machten 3% der Gesamtkonzentration in *C. elegans* aus, reine Glucoside und Diglucoside 4,2%. Dass im Medium nur knapp 17% der Gesamtkonzentration den ausgeschiedenen Quercetin-Konjugaten zugeschrieben werden konnten, bedeutet nicht, dass die Konjugation und die darauf folgende Ausscheidung der Konjugate gering war. Bei relativer Betrachtung wird deutlich, dass intrazellulär nur knapp 8% aller Metaboliten Konjugate von Quercetin waren, also weniger als halb so viel wie im Medium detektiert wurden. Quercetin war vor der Inkubation im Überschuss (100 µM) im Medium vorhanden. Nach Trocknung und Extraktion des Mediums detektiertes Quercetin stammte wahrscheinlich größtenteils oder komplett von der anfänglich zugefügten Menge. Eine Ausscheidung unmetabolisierten Quercetins aus *C. elegans* kann zwar nicht ausgeschlossen werden, wäre aber unlogisch in Anbetracht des extensiven Metabolismus.

Tabelle 5.9: Metaboliten von Quercetin in *C. elegans* nach 48-stündiger Inkubation in Flüssigmedium sowie ausgeschiedene Metaboliten im Medium. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$), bei *C. elegans* normiert auf den Proteingehalt der Probe. Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LLOQ) lagen bei 0,01 bzw. 0,02 µmol/g Protein.

Peak	RT [min]	Konzentration in		Konzentration im	
		Würmern [µmol/g Protein]	Anteil [%]	Medium [µM]	Anteil [%]
Q1	< LOD	< LOD	—	< LOD	—
Q2	< LOD	< LOD	—	< LOD	—
Q3	10,20	0,29 ± 0,02	0,5	< LOD	—
Q4	< LOD	< LOD	—	< LOD	—
Q5	11,29	0,13 ± 0,15	0,2	< LOD	—
Q6	11,97	0,14 ± 0,16	0,3	< LOD	—
Q7	12,74	0,15 ± 0,17	0,3	< LOD	—
Q8	< LOD	< LOD	—	< LOD	—
Q9b	14,17	0,61 ± 0,29	1,1	< LOD	—
Q10	< LOD	< LOD	—	< LOD	—
Q11	15,34	0,37 ± 0,01	0,6	0,09 ± 0,05	1,4
Q12	16,27	0,20 ± 0,01	0,4	0,01 ± 0,02	0,2
Q13	17,46	0,95 ± 0,61	1,7	0,80 ± 0,20	12,6
Q14	18,24	0,25 ± 0,05	0,4	< LOD	—
Q15	20,62	0,45 ± 0,04	0,8	0,17 ± 0,03	2,6
Q16	21,02	0,13 ± 0,14	0,2	< LOD	—
Q17	23,26	0,39 ± 0,10	0,7	< LOD	—
Quercetin	26,96	52,53 ± 9,35	92,6	5,24 ± 1,19	82,9
Summe		56,6 ± 11,3		6,3 ± 1,5	

Umsetzung von Quercetin durch Knockout-Würmer

Durch gezieltes Ausschalten der Genexpression von Phase-II-Enzymen sollte untersucht werden, ob Hinweise auf die für die Konjugation verantwortlichen Enzyme erhalten werden können. Durch RNAi wurde die Expression der Gene *ugt-13* sowie *ugt-63* in *C. elegans* ausgeschaltet. Diese kodieren für zwei UDP-Glucuronosyl-/UDP-Glykosyltransferasen (UGT), die möglicherweise für die Konjugation von Quercetin verantwortlich sind. Das Gen *ugt-13* ist homolog zum humanen *ugt3a2*, welches für eine UGT kodiert, die Substrate mit UDP-Glucose konjugiert (MacKenzie et al., 2011). Dass *ugt-13* in *C. elegans* die Konjugation von Quercetin zu Glucosiden katalysiert, wäre daher denkbar.

L₄-Larven aus Wurmkulturen mit ausgeschaltetem *ugt-13*- bzw. *ugt-63*-Gen wurden 48 h lang mit Quercetin inkubiert. Die Kontrollinkubation wurde mit L₄-Larven von *C. elegans* durchgeführt, die nur mit dem Vektor ohne aktive interferierende RNA (siRNA) behandelt wurden. Nach Homogenisation und Extraktion wurden die Proben chromatographisch getrennt.

In allen Proben konnten die gleichen acht Quercetin-Metaboliten sowie unkonjugiertes Quercetin detektiert werden. Weitere Analysen im Massenspektrometer zeigten, dass die gebildeten Metaboliten bereits aus den Inkubationen von Wildtyp-*C. elegans* bzw. *C. elegans*-Homogenat mit Quercetin bekannt waren (Abbildung 5.13). Der einzige Unterschied zwischen den Knockout- und Wildtyp-Würmern waren die Konzentrationen der einzelnen Metaboliten. In der Kontrolle waren die Anteile der Glucoside Q13, Q15 und Q17 höher, während die Diglucoside Q10 und Q11 in den Knockout-Würmern bevorzugt wurden. Das komplette Fehlen eines oder mehrerer Konjugate konnte jedoch nicht beobachtet werden.

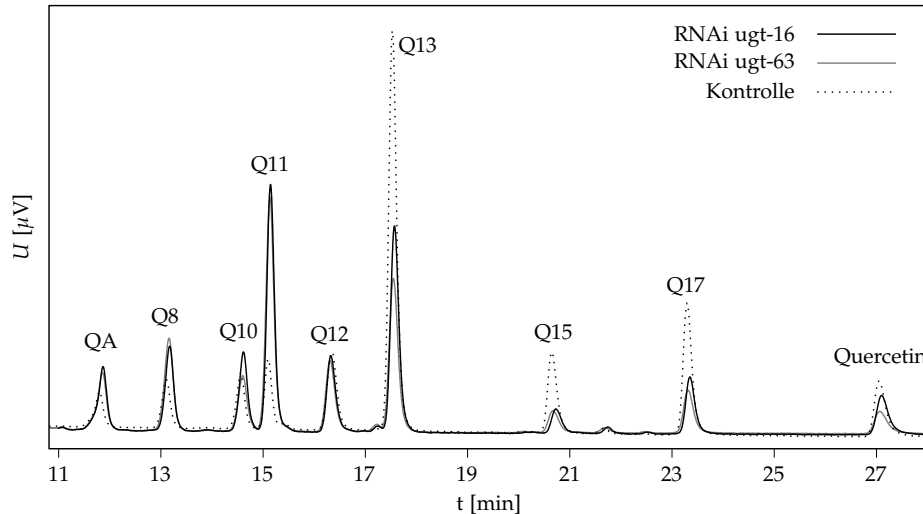


Abbildung 5.13: UV-Chromatogramme ($\lambda = 370$ nm) der Extrakte aus den *ugt-13*- und *ugt-63*-Knockout-Würmern bzw. der RNAi-Vektor-Kontrolle (gepunktete Linie). In allen Proben wurden die gleichen Metaboliten detektiert, die sich lediglich in der Konzentration leicht unterschieden.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Metabolisierung von Quercetin zu den detektierten Konjugaten wahrscheinlich nicht durch die zwei ausgeschalteten UDP-Glucuronosyl-/UDP-Glykosyltransferasen, sondern durch andere Enzyme katalysiert wird. Das Ausschalten weiterer Gene, um nach einer Versuch-und-Irrtum-Methode das für die Konjugation verantwortli-

5.1 Metabolismus in *Caenorhabditis elegans*

che Enzym zu identifizieren, wäre theoretisch möglich. Diese Aufgabe sollte jedoch nicht Kern der vorliegenden Arbeit sein. Zukünftige Untersuchungen könnten aber an diese Ergebnisse anknüpfen und damit zum besseren Verständnis des Fremdstoffmetabolismus in *C. elegans* beitragen.

5.2 Metabolisierung von Resveratrol in *Drosophila melanogaster*

Mehrere Kulturen zu je 50 nach Geschlecht getrennten Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) wurden neun Tage lang bei 25 °C kultiviert und erhielten mit 0,5 mM Resveratrol versetztes oder unbehandeltes Nährmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Fliegen homogenisiert, extrahiert und durch HPLC sowie hochauflösende Massenspektrometrie (TOFMS) analysiert.

Optimierung der Extraktion

Die Extraktion der Fliegen wurde zunächst wie bei *C. elegans* durchgeführt. Jeweils 25 Fliegen wurden in einem geringem Volumen Puffer (0,9% NaCl, pH = 7,0) homogenisiert. Ein Aliquot aus dem Homogenat wurde mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt, durch Vortexen extrahiert und zentrifugiert. Auf diese Art erhaltene Extrakte waren stark verunreinigt und sehr gering konzentriert, sodass die Analyten nur qualitativ detektiert werden konnten.

In der optimierten Extraktionsmethode wurden die Fliegen nicht in wässrigem Puffer suspendiert und homogenisiert, sondern direkt in einem Überschuss Extraktionsmittel (ACN und Methanol), das mit geringer Menge Triethylammoniumacetatpuffer (200 mM, pH = 7,0) versetzt wurde. Zusätzlich wurden die Proben nach Homogenisation im Ultraschallbad behandelt. Auf diese Weise konnte die Extraktion verbessert werden. Nach Abzentrifugieren der Feststoffe wurde das Lösungsmittel aus dem Extrakt verdampft und der Rückstand in einem geringeren Volumen aufgenommen, was eine weitere Konzentrierung der Analyten zur Folge hatte. Diese optimierte Homogenisations- und Extraktionsmethode wurde auf alle Proben angewendet.

Einfluss von Methyl-4-hydroxybenzoat auf die Konjugation

Das in diesen Experimenten verwendete Standardmedium für *D. melanogaster* (Hoffmann et al., 2013) enthält zu einem Anteil von 0,3% den Konservierungsstoff Methyl-4-hydroxybenzoat („Nipagin“). Weil dieser zusammen mit dem Medium von den Fliegen aufgenommen wird, muss davon ausgegangen werden, dass eine Metabolisierung des Stoffes stattfindet. Wie die Testsubstanz *trans*-Resveratrol trägt auch Nipagin eine Hydroxylgruppe an einem aromatischen Ring, an der eine Konjugation stattfinden kann. Da Nipagin in höherer Konzentration als *trans*-Resveratrol im Medium vorliegt, besteht die Möglichkeit der Konkurrenz von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus um die Konjugation der zwei Substanzen.

Aus diesem Grund wurden alle Experimente einmal mit Standardmedium sowie einmal mit Standardmedium ohne den Konservierungsstoff Nipagin durchgeführt, um einen Einfluss von Nipagin auf die Konzentration von Resveratrolmetaboliten festzustellen. Die gemessenen Konzentrationen der detektierten Resveratrolmetaboliten in weiblichen bzw. männlichen Fliegen mit und ohne Nipagin im Medium sind in den Abbildungen 5.14 und 5.15 dargestellt.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die gemessenen Konzentrationen jeweils auf die Einwaage der Fliegen normiert. Die Mittelwerte der Konzentrationen waren bei nipaginfreiem Medium etwas niedriger als bei Standardmedium mit Nipagin. Dies ist verwunderlich, da durch die zusätzlich stattfindende Konjugation von Nipagin eigentlich eine geringe Konzentration von Resveratrol-Konjugaten zu erwarten wäre. Möglicherweise wurde durch die hohe Konzentration von Nipagin

5.2 Metabolisierung von Resveratrol in *Drosophila melanogaster*

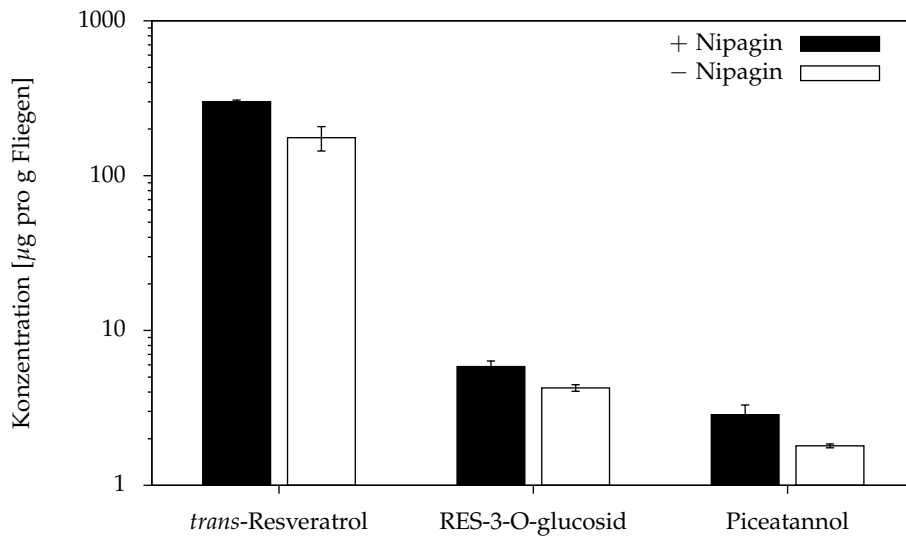


Abbildung 5.14: Konzentrationen der in weiblichen *D. melanogaster* detektierten Resveratrolmetaboliten bei Nährmedium mit (■) und ohne Nipagin (□), normiert auf die Probeneinwaage. Dargestellt sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$).

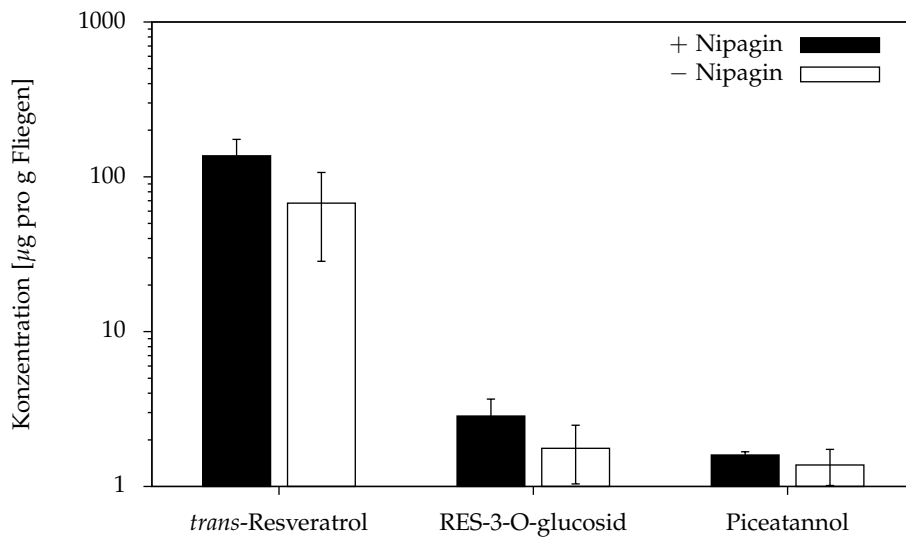


Abbildung 5.15: Konzentrationen der in männlichen *D. melanogaster* detektierten Resveratrolmetaboliten bei Nährmedium mit (■) und ohne Nipagin (□), normiert auf die Probeneinwaage. Dargestellt sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$).

die Aufnahme von Resveratrol begünstigt. Es wäre auch denkbar, dass das Medium ohne Nipagin durch fehlende Konservierung bereits während der Inkubationszeit zu verderben begonnen hat. Durch die veränderten sensorischen Eigenschaften könnten die Fliegen weniger des unkonservierten Mediums zu sich genommen haben als Fliegen, die konserviertes Medium erhielten.

Durch die Streuung und den geringen Probenumfang ($n = 2$) könnten die gemessenen Unterschiede jedoch nicht signifikant sein. Die Frage, ob die Konjugation von Resveratrol durch Anwesenheit von Nipagin im Medium herabgesetzt wird, kann auf Basis der Daten klar verneint werden. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Auswertung die Proben mit Standardmedium, das Nipagin enthielt, verwendet. Diese Strategie ist auch sinnvoller im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, in denen Standardmedium mit Nipagin verwendet wird.

Konjugation

Die anfänglichen Probleme bei der Detektion der Metaboliten konnten durch die geänderte Extraktionsart zum Teil beseitigt werden. Die UV-Chromatogramme der Proben hatten jedoch immer noch eine zu geringe Intensität bzw. waren mit Peaks von unbekanntem Nebenkomponenten behaftet, sodass nicht über die UV-Signale detektiert oder quantifiziert werden konnte. Stattdessen wurden hochaufgelöste Massenspektren der Extrakte aufgezeichnet, die nach der akkuraten Masse möglicher Resveratrolmetaboliten gefiltert wurden (XICs). Eine Übersicht aller Metaboliten, nach denen gescreent wurde, findet sich in Tabelle 4.5 auf Seite 29.

In den XICs der extrahierten Proben aus *D. melanogaster* konnten neben unmetabolisiertem Resveratrol drei Metaboliten detektiert werden: Piceatannol (3'-Hydroxyresveratrol), Resveratrol-3-Glucosid sowie ein Resveratrol-phosphoglykosid (Abbildung 5.16). Neben der akkuraten Masse der Molekülonen wurden auch die Fragmentspektren der Metaboliten zur Identifikation hinzugezogen (Anhang C.4, S. 118). Detektierte Metaboliten sind mit ihren akkuraten Molekülonenmassen und Fragmenten in Tabelle 5.10 zusammengefasst.

Tabelle 5.10: Akkurate Masse von Molekül- und Fragment-Ionen im NI-Modus sowie postulierte Strukturen der Resveratrol-Metaboliten in *Drosophila melanogaster*. Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete exakte Ionenmasse bezogen.

RT [min]	m/z [M-H] ⁻	Abweichung [mDa] (ppm)	m/z Fragment-Ionen	Postulierte Struktur
11,46	469,0903	-0,22 (-0,47)	241, 227, 97, 79	Resveratrol-phosphoglykosid
13,71	389,1238	-0,39 (-1,00)	227, 185, 143	Resveratrol-3-glucosid ¹
15,25	243,0666	+0,32 (+1,32)	225, 201, 159	Piceatannol ¹
20,00	227,0721	+0,73 (+3,21)	185, 159, 143, 117	Resveratrol ¹

¹Über entsprechende Referenzsubstanz identifiziert.

Das Resveratrol-phosphoglykosid (m/z 469,0903) fragmentierte im Massenspektrometer zum Resveratrol-Aglykon (m/z 227,0697) und einem Phosphoglykosidrest (m/z 241,0180). Letzteres Fragment ist ein Beweis dafür, dass Phosphat- und Glykosylrest aneinander gebunden waren. Fragmente des Phosphatrests wurden mit m/z 96,9689 und 78,9593 detektiert.

Resveratrol-3-Glucosid wurde mit einem Molekülon mit m/z 389,1238 detektiert und über die Referenzsubstanz zweifelsfrei identifiziert. Beide Substanzen hatten die gleiche Retentionszeit; in den Fragmentspektren sowohl des Metaboliten als auch der Referenzsubstanz konnten das

5.2 Metabolisierung von Resveratrol in *Drosophila melanogaster*

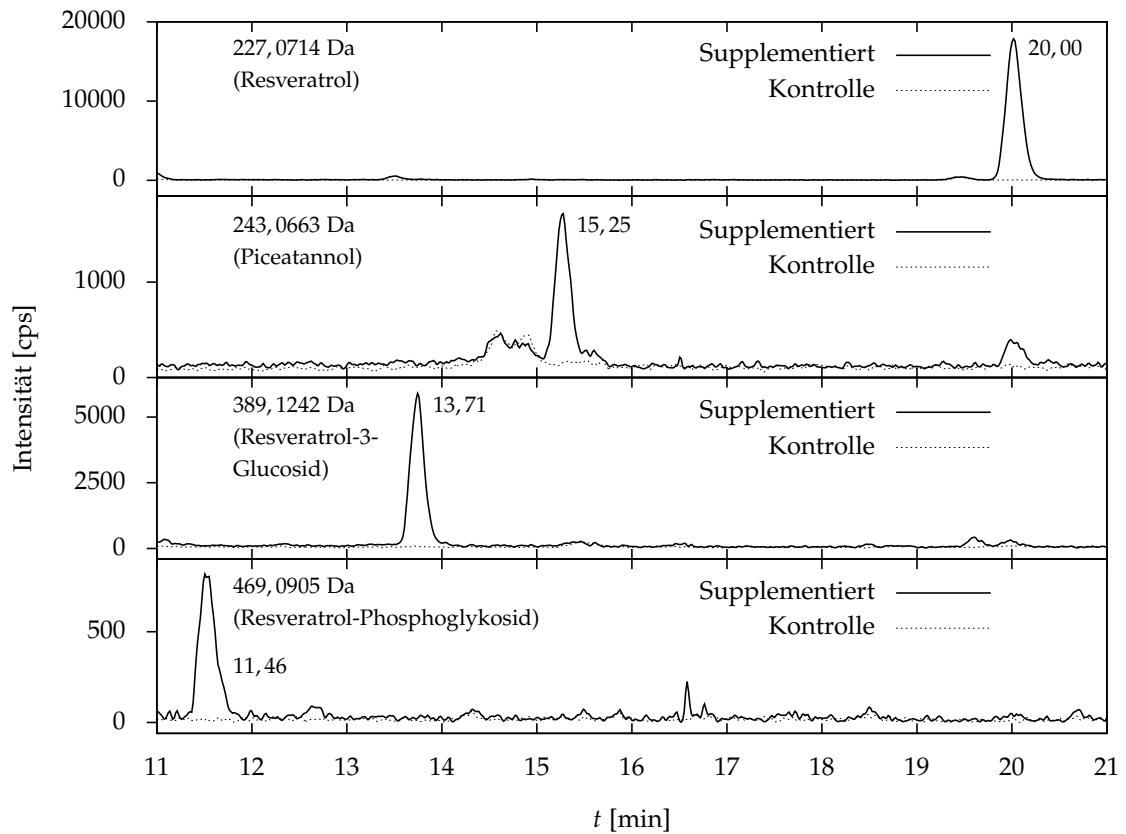


Abbildung 5.16: Aus dem Massenstrom gefilterte Chromatogramme (XICs) der akkuraten Masse von Resveratrol und Resveratrol-Metaboliten aus *Drosophila melanogaster*. Dargestellt sind jeweils die XICs der Fliegen, die mit Resveratrol supplementiertes (durchgezogene Linie) oder Kontrollfütter (gepunktete Linie) erhielten.

Resveratrol-Aglykon (m/z 227,0717) sowie zwei typische Resveratrol-Fragmente (m/z 185,0594 bzw. 143,0389) detektiert werden.

Ein dritter Metabolit mit m/z 243,0652 konnte durch eine Referenzsubstanz als Piceatannol (3'-Hydroxyresveratrol) identifiziert werden. Retentionszeit und typische Fragmente von Piceatannol (m/z 225,0568, 201,0547 und 159,0449) stimmten bei beiden Substanzen überein.

Das Resveratrol-Anion wurde mit m/z 227,0721 detektiert. Auch hier war der Vergleich mit der Referenzsubstanz positiv. Spezifische Fragmente von Resveratrol (m/z 185,0611, 159,0819, 143,0496 sowie 117,0349) wurden im Fragmentspektrum beider Substanzen detektiert. Weitere Metaboliten konnten nicht detektiert werden.

Quantifizierung der Metaboliten

Die Metaboliten aus den Probenextrakten aus *D. melanogaster* konnten wegen ihrer geringen Konzentration nicht über das UV-Chromatogramm quantifiziert werden. Stattdessen wurde aus dem TIC des Massenspektrometers die akkuraten Molekülionennmassen jener Metaboliten extrahiert, für die Referenzsubstanzen vorlagen (Abbildung 5.16). Durch Vergleich der Peakflächen der Metaboliten mit denen der Referenzsubstanzen, die unter gleichen Bedingungen in un behandelter Fliegenmatrix aufgearbeitet wurden, konnten Resveratrol, Piceatannol und Resveratrol-3-Glucosid quantifiziert werden. Die Quantifizierung von Resveratrol-phosphoglykosid, welches in allen Proben detektiert wurde, musste wegen fehlender Referenzsubstanz ausbleiben.

Die Gesamtkonzentration aller Metaboliten betrug 21,59 μmol pro Gramm Fliegen (Tabelle 5.11). Davon nahm unmetabolisiertes Resveratrol mehr als 97% ein. Entsprechend gering konzentriert waren Resveratrol-3-Glucosid und Piceatannol (1,9 bzw. 0,9%). Diese Konzentrationsunterschiede könnten bedeuten, dass Resveratrol in *D. melanogaster* nur langsam metabolisiert wird. Wahrscheinlicher ist aber die Hypothese, dass Resveratrol aufgrund seiner Fettlöslichkeit im Gewebe besser gespeichert wird, wohingegen polare Metaboliten ausgeschieden werden können und daher immer nur in geringen intrazellulären Konzentrationen messbar sind. Die Ausscheidung der Metaboliten durch *D. melanogaster* konnte methodenbedingt nicht untersucht werden.

Tabelle 5.11: Quantifizierbare Metaboliten von Resveratrol in *Drosophila melanogaster* nach 9-tägiger Supplementierung im Nährmedium. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite aus zwei Bestimmungen, jeweils normiert auf die Einwaage der Probe. Die Bestimmungsgrenze (LLOQ) ist in $\mu\text{mol/g}$ Fliegen angegeben. RT, Retentionszeit.

Peak	RT [min]	Konzentration [$\mu\text{mol/g}$ Fliegen]	LLOQ	Anteil [%]
1	11,46	— ¹	— ¹	— ¹
2	13,71	0,41 \pm 0,04	0,08	1,9
3	15,25	0,20 \pm 0,03	0,04	0,9
4	20,00	20,98 \pm 0,44	0,15	97,2
Summe	—	21,59 \pm 0,43	—	100,0

¹Keine Referenzsubstanz zum Quantifizieren vorhanden.

5.3 Metabolisierung von Resveratrol in Säugetieren

Zur exemplarischen Untersuchung der Metabolisierung von Resveratrol in Säugetieren wurden neben dem Menschen die Spezies *Mus musculus* (Hausmaus) sowie *Sus scrofa domestica* (Hausschwein) ausgewählt. Im Unterschied zu *C. elegans* und *D. melanogaster* besitzen Säugetiere eine Darmmikrobiota, die zur Metabolisierung von Fremdstoffen beitragen und somit das im Organismus vorhandene Metabolitenspektrum beeinflussen kann. Besonderes Augenmerk sollte daher auf die Analyse reduktiver, durch die Darmmikrobiota gebildeter Resveratrolmetaboliten gelegt werden.

5.3.1 Metabolisierung von Resveratrol im Menschen

Zwölf gesunde männliche Probanden wurden randomisiert in zwei Gruppen ($n = 6$) eingeteilt und erhielten 0,5 mg/kg Körpergewicht *trans*-Resveratrol *per os* in Form eines Weinrebenextrakts oder dessen kolloider Formulierung. Unmittelbar vor der Einnahme, sowie in definierten Intervallen danach, wurden Blutproben entnommen und Urin gesammelt. Nach einwöchiger Washout-Phase wurde das Experiment unter Umkehr der Gruppen wiederholt, sodass für beide Formulierungen $n = 12$ Messwerte vorhanden waren. Da durch die kolloide Formulierung eine schnellere und höhere Bioverfügbarkeit erzielt werden konnte (Bode, 2012), wurden ausschließlich die Proben dieser Darreichungsform zur Analyse des Metabolismus verwendet.

Metaboliten im Urin

Um einen Überblick über die Metabolisierung von Resveratrol zu erhalten, wurden zunächst Urinproben analysiert, die 12–24 h nach Einnahme des Weinrebenextrakts gesammelt wurden. Die Proben wurden während der Aufarbeitung enzymatisch hydrolysiert, damit nur Aglykone erfasst werden mussten, deren Quantifizierung über Referenzsubstanzen möglich war. Mit *cis*- und *trans*-Resveratrol, Dihydroresveratrol, Piceatannol und Lunularin wurden Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich zwischen 0,8 nM und 2 500 nM in Blank-Urin mittels MRM gemessen. Alle aus den Proben erhaltenen Messwerte wurden auf den Kreatiningehalt jeder einzelnen Probe normiert, um die unterschiedlichen Volumina der Proben auszugleichen.

In den Proben konnten *trans*-Resveratrol sowie vier weitere Metaboliten detektiert und über entsprechende Referenzsubstanzen quantifiziert werden (Tabelle 5.12). Dihydroresveratrol war wie *trans*-Resveratrol in allen Proben vorhanden, hatte im Mittel aber eine mehr als dreimal so hohe Konzentration. Piceatannol war nur in zwei Proben und mit geringer Konzentration nachweisbar. Der reduktive Metabolit Lunularin wurde mit stark variierenden Konzentrationen (130–3000 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin) in fünf der zwölf Proben quantifiziert. Ein weiterer Metabolit wurde in den selben fünf Proben zu einer Retentionszeit 0,3 min nach Lunularin detektiert. Seine Konzentration war am höchsten in Proben mit hohem Lunularingehalt, insgesamt jedoch immer geringer als die von Lunularin (15–800 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin). Im hochauflösenden Massenspektrometer hatte der unbekannte Metabolit die gleiche akkurate Ionenmasse wie Lunularin (m/z 213,0921), jedoch ein unterschiedliches Fragmentspektrum: Das bei Lunularin am häufigsten detektierte Fragment mit m/z 107,0502 war nicht zu beobachten; das zweithäufigste Lunularin-Fragment mit

5 Ergebnisse

m/z 106,0424 war hingegen als Hauptfragment zu detektieren (vgl. Abbildungen B.1 und B.2 im Anhang). Da in chemisch synthetisiertem Lunularin zur selben Retentionszeit wie der unbekannte Metabolit eine Substanz mit gleichen akkuraten Ionen- und Fragmentmassen nachweisbar war, wurden Isomere von Lunularin, die bei der Synthese als Nebenprodukte entstanden sind, untersucht und als Reinsubstanzen isoliert. Auf diese Art konnte der unbekannte Metabolit in den Urinproben als 3,3'-Dihydroxybibenzyl identifiziert und nachträglich quantifiziert werden.

Tabelle 5.12: Resveratrol-Metaboliten in humanen Urinproben nach enzymatischer Hydrolyse. Sammelurin $t = 12\text{--}24$ h nach Einnahme eines Weinrebenextrakts in kolloider Formulierung. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 12$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD) nach Normierung auf die ausgeschiedene Kreatininmenge.

Metabolit	Konzentration [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin]	LLOQ [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Kreatinin]	LOD
<i>trans</i> -Resveratrol	1173 ± 1024	2,3	0,7
<i>cis</i> -Resveratrol	< LOD	0,5	0,1
Dihydroresveratrol	3685 ± 2858	1,1	0,4
Piceatannol	$3,0 \pm 7,3$	1,3	0,4
Lunularin	457 ± 892	4,2	1,3
3,3'-Dihydroxybibenzyl	152 ± 285	3,9	1,1

Nach Auswertung dieser Ergebnisse wurden alle Urinproben erneut analysiert, diesmal jedoch ohne vorherige enzymatische Hydrolyse. Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurde gezielt nach Konjugaten der detektierten Aglykone gesucht. In Tabelle 5.13 sind alle in Urin- und Plasmaproben detektierten Konjugate zusammen mit ihren spezifischen Fragmenten aufgelistet (Massenspektren in Anhang C.5, S. 122). Besonders hervorzuheben ist hier die Detektion eines Dihydroresveratrol-Ribosylsulfats. Ein solches Konjugat ist bisher nur bei der Metabolisierung von Resveratrol in Schweinen beschrieben worden (Azorín-Ortuño et al., 2011); dort war es an *trans*-Resveratrol gebunden. Die Konjugation an dieses Aglykon konnte in den humanen Urinproben jedoch nicht detektiert werden.

Metaboliten im Plasma

Plasmaproben, die 40 min und 4,5 h nach Einnahme des Weinrebenextrakts genommen wurden, wurden zunächst qualitativ mit hochauflösender Massenspektrometrie analysiert (Anhang C.6, S. 146). Viele der in den Urinproben detektierten Konjugate konnten auch im Plasma gefunden werden, jedoch kein Lunularin-Konjugat, Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronid, -Diglucuronid oder -Ribosylsulfat. Dagegen wurden drei Resveratrol-Disulfate detektiert, die nicht in den Urinproben vorhanden waren (Tabelle 5.13). Viele der Konjugate waren zu gering konzentriert, um über das UV-Chromatogramm semi-quantifiziert zu werden.

In den Plasmaproben, die 40 min nach Darreichung des Weinrebenextrakts genommen wurden, konnten sechs Konjugate von Resveratrol quantifiziert werden (Tabelle 5.14). Die Konzentrationen von *trans*-Resveratrol und den anderen Aglykonen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Neben Resveratrol-3-sulfat und den zwei Glucuroniden, zu denen Referenzsubstanzen vorlagen, wurden ein weiteres Sulfat, ein Disulfat sowie ein Sulfoglucuronid detektiert. Da das unbekannte Sulfat auch in Spuren in der Referenzsubstanz Resveratrol-3-sulfat vorhanden war, lag die Vermutung

Tabelle 5.13: Massenspektrometrische Eigenschaften von Resveratrol-, Dihydroresveratrol- und Lunularin-Konjugaten im Menschen. Analysiert wurden Urinproben 12–24 h bzw. Plasmaproben 40 min und 4, 5 h nach Verabreichung eines resveratrolhaltigen Weinrebenextrakts. Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete akkurate Ionenmasse bezogen. RES, Resveratrol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin.

Konjugat	Isomere Urin/Plasma	m/z [M-H] ⁻	Abweichung [mDa] (ppm)	Fragmente
RES-Sulfoglucuronid	2/3	483,0604	-0,13 (-0,27)	403 (RES-Glucuronid), 307 (RES-Sulfat), 227 (RES), 175 (Glucuronat), 185, 143 (RES-Fragmente)
RES-Glucuronid	2/2	403,1037	-0,24 (-0,60)	227 (RES), 175 (Glucuronat), 185, 143 (RES-Fragmente)
RES-Disulfat	—/3	386,9856	-0,60 (-1,55)	307 (RES-Sulfat), 227 (RES), 143 (RES-Fragment), 80 (Sulfatrest)
RES-Sulfat	2/2	307,0287	-0,52 (-1,69)	227 (RES), 185, 143 (RES-Fragmente), 80 (Sulfatrest)
DHR-Diglucuronid	2/—	581,1516	+0,41 (+0,71)	405 (DHR-Glucuronid), 229 (DHR), 175 (Glucuronat), 113 (DHR-Fragment)
DHR-Sulfoglucuronid	5/—	485,0753	-0,62 (-1,28)	405 (DHR-Glucuronid), 309 (DHR-Sulfat), 229 (DHR), 175 (Glucuronat), 113 (DHR-Fragment)
DHR-Glucuronid	3/1	405,1191	-0,01 (-0,02)	229 (DHR), 175 (Glucuronat), 123, 113 (DHR-Fragmente)
DHR-Ribosylsulfat	1/—	441,0861	+0,01 (+0,02)	229 (DHR), 210 (Ribosylsulfatrest), 122 (DHR-Fragment), 80 (Sulfatrest)
DHR-Sulfat	2/1	309,0437	-0,13 (-0,42)	229 (DHR), 123 (DHR-Fragment), 80 (Sulfatrest)
LUN-Sulfoglucuronid	3/—	469,0806	-0,41 (-0,87)	389 (LUN-Glucuronid), 293 (LUN-Sulfat), 213 (LUN), 175 (Glucuronat)
LUN-Glucuronid	1/—	389,1246	+0,41 (+1,05)	213 (LUN), 175 (Glucuronat), 107, 106 (LUN-Fragmente)
LUN-Sulfat	1/—	293,0499	+0,98 (+3,34)	213 (LUN), 107, 106 (LUN-Fragmente)

Tabelle 5.14: Resveratrol-Metaboliten in humanem Plasma, 40 min und 4,5 h nach Einnahme eines Weinrebeneextrakts in kolloider Formulierung. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 12$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]		LLOQ [nM]	LOD [nM]
	$t = 40$ min	$t = 4,5$ h		
Resveratrol-sulfoglucuronid ¹	632 \pm 190	187 \pm 53	40	17
<i>cis</i> -Resveratrol-3-sulfat ¹	161 \pm 45	< LOD	40	17
Resveratrol-disulfat ¹	1046 \pm 510	< LOD	40	17
Resveratrol-3-O-glucuronid	707 \pm 278	46 \pm 41	5,0	1,6
Resveratrol-4'-O-glucuronid	493 \pm 207	51 \pm 49	5,6	1,6
Resveratrol-3-sulfat	2716 \pm 816	292 \pm 185	1,4	0,8
<i>trans</i> -Resveratrol	< LOD	Spuren	1,4	0,2
<i>cis</i> -Resveratrol	< LOD	2,2 \pm 0,2	1,0	0,2
Dihydroresveratrol	< LOD	< LOD	2,2	1,6
Piceatannol	< LOD	< LOD	1,8	0,6
Lunularin	< LOD	< LOD	7,0	2,2
3,3'-Dihydroxybibenzyl	< LOD	< LOD	0,8	0,3

¹Über RES-3-Sulfat (UV) semi-quantifiziert.

nahe, dass es sich dabei um das *cis*-Isomer handeln könnte. Durch gezielte Isomerisierung der Referenzsubstanz über Einstrahlung von UV-Licht konnten größere Mengen des *cis*-Isomers in Lösung erzeugt und zum Abgleich verwendet werden. Das zweite Resveratrolsulfat wurde daraufhin als *cis*-Resveratrol-3-sulfat identifiziert und über die Peakfläche in der UV-Spur mit Referenz auf das *trans*-Isomer semi-quantifiziert. Das Disulfat und Sulfoglucuronid konnten nicht genauer charakterisiert werden, ihre Semi-Quantifizierung gelang jedoch über die Auswertung des UV-Signals mit Referenz auf Resveratrol-3-sulfat.

Resveratrol-3-sulfat war nach 40 min der Hauptmetabolit im Plasma und nahm fast die Hälfte der Gesamtkonzentration aller Metaboliten ein. Die Konzentration von *cis*-Resveratrol-3-sulfat entsprach ca. 6% des *trans*-Isomers. Dieses Konjugat entstand möglicherweise nicht durch Metabolisierung, sondern könnte durch UV-Einstrahlung durch falsche Handhabung der Probe aus dem *trans*-Isomer gebildet worden sein. Da die Studie und Probenahme extern durchgeführt wurden, kann allerdings keine genaue Aussage über fehlerhafte Probenhandhabung getroffen werden.

Die Konzentrationen des Resveratrol-3-O- und -4'-O-Glucuronids sowie des Sulfoglucuronids lagen zwischen 9% und 12% der Gesamtkonzentration aller Metaboliten, und damit nur ein Viertel so hoch wie Resveratrol-3-sulfat.

In den Plasmaproben, die nach 4,5 h genommen wurden, konnten vier Resveratrol-Konjugate sowie die Aglykone *trans*- und *cis*-Resveratrol detektiert werden (Tabelle 5.14). Die in den 40 min-Proben detektierten Konjugate Resveratrol-disulfat und *cis*-Resveratrol-3-sulfat lagen nach 4,5 h unterhalb der Nachweisgrenze. Die mittlere Konzentration aller Metaboliten war geringer als in den Proben, die nach 40 min genommen wurden.

Konjugate von Dihydroresveratrol (Tabelle 5.13) konnten zu allen analysierten Zeitpunkten der Probenahme nur im Spurenbereich durch hochauflösende Massenspektrometrie detektiert werden. In den Plasmaproben der Probanden 7, 8, 11, 13, 17 und 18 konnte ein Dihydroresveratrol-glucuronid mit m/z 405,1191 detektiert werden, dessen Molekülion zum Aglykon (m/z 229,0880), einem

Glucuronsäure-Anion (m/z 175,0274) und zwei Dihydroresveratrol-Fragmenten (m/z 123,0445 bzw. 113,0254) gespalten wurde. Weiterhin konnte ein Dihydroresveratrol-sulfat in allen Plasmaproben außer bei Proband 12 detektiert werden (m/z 309,0386). Es koeluierte mit Resveratrol-3-sulfat, das in allen Proben vorhanden war. Im Fragmentspektrum konnten Anionen des Aglykons (m/z 229,0850), eines Sulfatrests (m/z 79,9583) sowie zweier Dihydroresveratrol-Fragmente (m/z 123,0455 bzw. 113,0228) detektiert werden. Die Konzentration dieser Dihydroresveratrol-Konjugate war nicht ausreichend, um über die UV-Spur mit Referenz auf Dihydroresveratrol semi-quantifiziert zu werden. Konjugate der anderen Resveratrol-derivate, die im Urin detektiert wurden (Tabelle 5.12), konnten im Plasma nicht gefunden werden.

Um reduktive Resveratrolmetaboliten im Plasma unabhängig von ihrer Konjugation zu messen, wurden die nach 4,5 h entnommenen Plasmaproben enzymatisch hydrolysiert und analysiert. Es konnten *trans*-Resveratrol und seine vier Derivate *cis*-Resveratrol, Dihydroresveratrol, Piceatannol und 3,3'-Dihydroxybibenzyl detektiert werden; Lunularin lag unterhalb der Nachweisgrenze (Tabelle 5.15). Mehr als 90% der Gesamtkonzentration (893 ± 219 nM) wurden von *trans*-Resveratrol eingenommen. Entgegen den Ergebnissen aus den hydrolysierten Urinproben (Tabelle 5.12) war Dihydroresveratrol nicht Hauptmetabolit, sondern konnte nur in sieben der zwölf Proben mit einer mittleren Konzentration von 25 nM detektiert werden. 3,3'-Dihydroxybibenzyl war nur bei sechs der zwölf Probanden oberhalb der Nachweisgrenze zu detektieren.

Tabelle 5.15: Resveratrol-Metaboliten in humanem Plasma nach enzymatischer Hydrolyse, 4,5 h nach Einnahme eines Weinrebenextrakts in kolloider Formulierung. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 12$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]	LLOQ [nM]	LOD [nM]
<i>trans</i> -Resveratrol	893 ± 219	1,0	0,6
<i>cis</i> -Resveratrol	37 ± 11	0,3	0,2
Dihydroresveratrol	25 ± 30	1,2	0,7
Piceatannol	$8,7 \pm 3,1$	0,5	0,3
Lunularin	< LOD	1,6	1,0
3,3'-Dihydroxybibenzyl	$0,5 \pm 1,0$	0,2	0,1

Der zeitliche Verlauf der Metabolisierung von Resveratrol wurde anhand des Metabolitenspektrums im Plasma bestimmt. Ausgehend von den Probanden mit der größten Gesamtausscheidung von *trans*-Resveratrol bzw. Dihydroresveratrol und Lunularin wurden die Plasmaproben aller Zeitpunkte gemessen und zu jedem Zeitpunkt der Mittelwert gebildet. Dabei wurden Resveratrol-3-sulfat, Resveratrol-3-O- und -4'-O-glucuronid über MRM mit internem Standard quantifiziert (Abbildung 5.17 A und B), Resveratrol-sulfoglucuronid und Resveratrol-disulfat über ihre Peakfläche im UV-Chromatogramm ($\lambda = 305$ nm) mit Bezug auf Resveratrol-3-sulfat semi-quantifiziert (Abbildung 5.17 C).

Die Konzentrationen von Resveratrol-3-sulfat und der zwei Glucuronide erreichten ihr Maximum bereits nach 40 min und fielen bis nach 3 h wieder stark ab. Das Resveratrol-sulfoglucuronid sowie das Disulfat wurden mit maximaler Konzentration erst nach 1–2 h detektiert. Hieraus wird ersichtlich, dass die Konjugation in einem mehrstufigen Prozess ablief. Gebildete Sulfo- oder Glucuronsäure-Konjugate wurden in einem zweiten Schritt weiter zu Sulfoglucuroniden oder Disulfaten konjugiert.

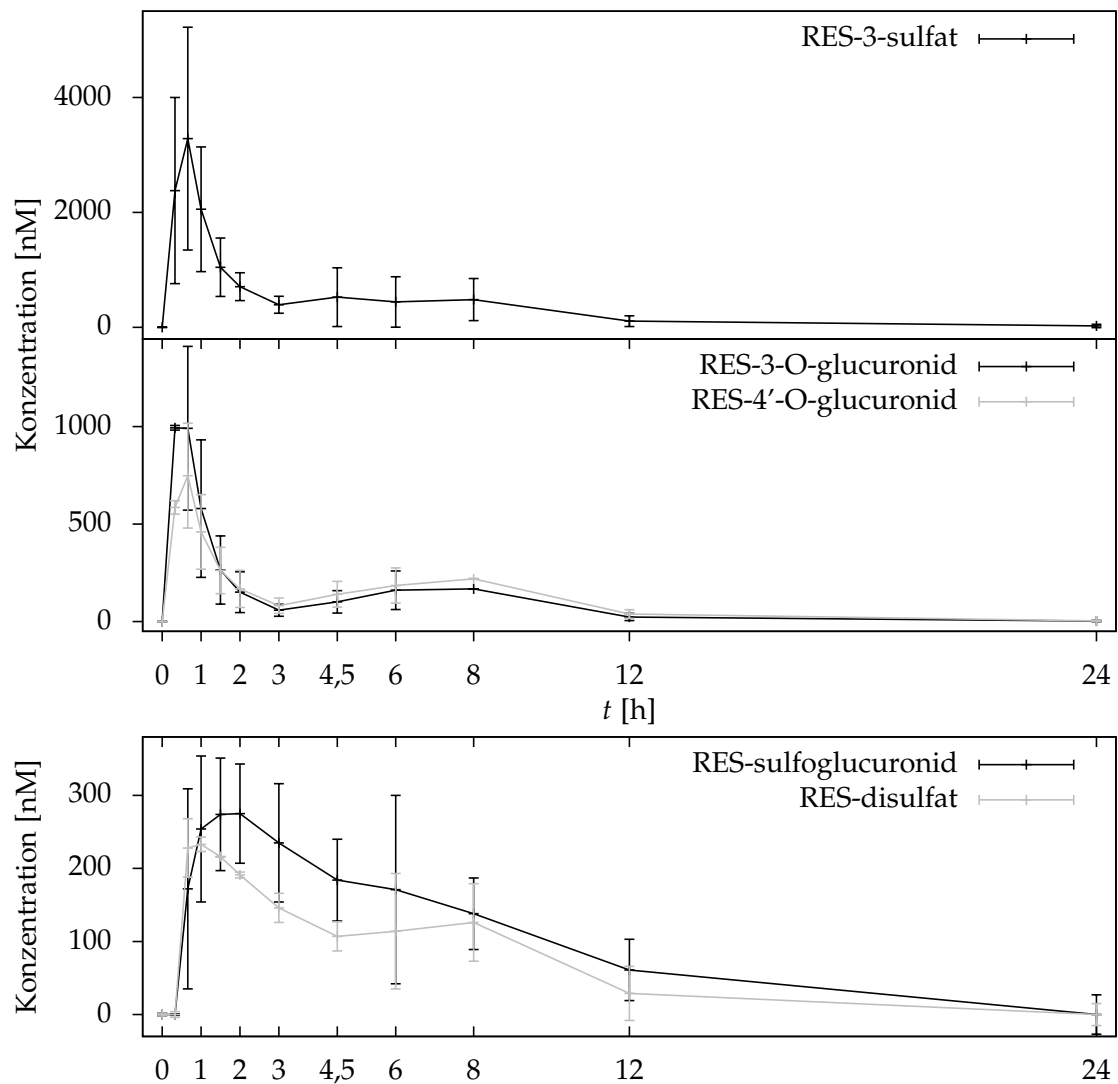


Abbildung 5.17: Zeitlicher Verlauf der Hauptmetaboliten von Resveratrol in humanem Plasma. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung. Quantifiziert über MRM (A, B) mit internem Standard bzw. UV-Detektion (C) mit Bezug auf Resveratrol-3-sulfat.

Besonders beim Konzentrationsverlauf der zwei Glucuronide fällt auf, dass nach 6–8 h ein zweites Maximum auftrat. Dieser Verlauf ist typisch für Fremdstoffe, die einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. In der Leber gebildete Konjugate werden in den Darm abgeführt, wo sie durch bakterielle Hydrolasen zu ihrem Aglykon abgebaut werden, erneut zur Leber gelangen und konjugiert werden, sodass ein zweites Konzentrationsmaximum entsteht.

5.3.2 Metabolisierung von Resveratrol in Mäusen

Zwölf männliche Hausmäuse (*Mus musculus*), die in Kontroll- und Resveratrolgruppe eingeteilt wurden, erhielten 14 Tage lang Standardfutter bzw. mit Resveratrol angereichertes Futter. Nach der Behandlung wurden Plasma- und Urinproben mittels HPLC-MS qualitativ und quantitativ analysiert. Übersichts- und Fragment-Spektren sind in Anhang C.7 (S. 159) zu finden.

Tabelle 5.16 enthält Molekül- und Fragment-Ionen aller Resveratrol- und Dihydroresveratrol-Konjugate, die in den Urin- und Plasma-Proben detektiert werden konnten. Bei Konjugaten, für die keine Referenzsubstanz verfügbar war, wurden die Strukturen auf Basis der akkuraten Masse ihrer Molekül- und Fragment-Ionen sowie biochemischer Plausibilität postuliert.

Zur Quantifizierung der Metaboliten wurden Kalibrierkurven mit Resveratrol, Resveratrol-3- und -4'-O-glucuronid, Resveratrol-3-sulfat, Dihydroresveratrol, Piceatannol, Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl in Blank-Plasma und -Urin im Konzentrationsbereich zwischen 0,8 nM und 2500 nM gemessen. Über diese wurden Metaboliten mittels MRM-Experimenten im Massenspektrometer nach Korrektur durch internen Standard quantifiziert. Nicht für jeden Metaboliten stand eine Referenzsubstanz zur Verfügung, sodass Resveratrol-sulfoglucuronid sowie Konjugate von Dihydroresveratrol über die Fläche der Peaks im UV-Chromatogramm semi-quantifiziert wurden.

Metaboliten im Urin

Um einen Überblick über die reduktive Metabolisierung von Resveratrol durch die Darmmikrobiota zu erhalten, wurden Urinproben enzymatisch hydrolysiert und die Aglykone analysiert. Zur Quantifizierung standen Referenzsubstanzen von *cis*- und *trans*-Resveratrol, Dihydroresveratrol, Piceatannol, Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl zur Verfügung. *trans*-Resveratrol und Dihydroresveratrol konnten in allen Proben detektiert werden (Tabelle 5.17). Interessanterweise war die Konzentration von Dihydroresveratrol in fünf Proben um ein Vielfaches höher als jene von *trans*-Resveratrol; in der sechsten Probe war dieses Verhältnis umgekehrt. *cis*-Resveratrol war in allen Proben nur in geringer Konzentration vorhanden. Piceatannol konnte nur in einer Probe oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. Lunularin und sein Isomer 3,3'-Dihydroxybibenzyl konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

Metaboliten im Plasma

In den Plasmaproben konnten acht Resveratrolmetaboliten detektiert werden, die nicht in den Kontrollproben vorhanden waren (Tabelle 5.18, Spektren in Anhang C.8, S. 172). Konjugate von Resveratrol und Dihydroresveratrol dominierten das Metabolitenspektrum. Über Referenzsubstanzen konnten *trans*- und *cis*-Resveratrol, Resveratrol-3-O- und -4'-O-glucuronid, Resveratrol 3-sulfat sowie Dihydroresveratrol quantifiziert werden. Die Aglykone waren nur in sehr geringer Konzentra-

Table 5.16: Massenspektrometrische Eigenschaften von Resveratrol- und Dihydroresveratrol-Konjugaten, die in Plasma- und Urinproben von Mäusen detektiert wurden, welche 14 Tage lang mit Resveratrol versetztes Futter erhielten. Die Abweichung der gemessenen m/z ist auf die berechnete akkurate Ionenmasse bezogen. RES, Resveratrol; DHR, Dihydroresveratrol.

Konjugat	Isomere Urin/Plasma	m/z [M-H] ⁻	Abweichung [mDa] (ppm)	Fragmente
RES-Digluconuronid	1/—	579,1349	-0,64 (-1,11)	403 (RES-Gluconuronid), 227 (RES), 175 (Gluconuronat)
RES-Sulfogluconuronid	3/1	483,0603	+0,03 (+0,06)	403 (RES-Gluconuronid), 307 (RES-Sulfat), 227 (RES), 175 (Gluconuronat)
RES-Gluconuronid	2/2	403,1020	+1,46 (+3,62)	227 (RES), 175 (Gluconuronat), 185, 143 (RES-Fragmente)
RES-Sulfat	1/1	307,0258	+2,38 (+7,75)	227 (RES), 185, 143 (RES-Fragmente), 80 (Sulfatrest)
DHR-Digluconuronid	1/—	581,1514	+0,21 (+0,36)	405 (DHR-Gluconuronid), 229 (DHR), 175 (Gluconuronat), 113 (DHR-Fragment)
DHR-Sulfogluconuronid	2/—	485,0766	+0,68 (+1,40)	405 (DHR-Gluconuronid), 309 (DHR-Sulfat), 229 (DHR), 175 (Gluconuronat), 113 (DHR-Fragment)
DHR-Gluconuronid	1/1	405,1191	-0,01 (-0,02)	229 (DHR), 175 (Gluconuronat), 123, 113 (DHR-Fragmente)
DHR-Disulfat	—/1	388,9989	-1,75 (-4,50)	309 (DHR-Sulfat), 229 (DHR), 123 (DHR-Fragment), 80 (Sulfatrest)
DHR-Sulfat	2/1	309,0442	+0,37 (+1,20)	229 (DHR), 123 (DHR-Fragment), 80 (Sulfatrest)

Tabelle 5.17: Resveratrol-Metaboliten nach enzymatischer Hydrolyse, detektiert in Urin aus Mäusen, die 14 Tage lang mit Resveratrol versetztes Futter erhielten. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 6$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [μM]	LLOQ [μM]	LOD [μM]
<i>trans</i> -Resveratrol	200 \pm 231	0,38	0,12
<i>cis</i> -Resveratrol	6,1 \pm 4,4	0,08	0,02
Dihydroresveratrol	673 \pm 307	0,22	0,06
Piceatannol	0,7 \pm 1,7	0,18	0,06
Lunularin	< LOD	0,70	0,22
3,3'-Dihydroxybibenzyl	< LOD	0,12	0,05

Tabelle 5.18: Resveratrol-Metaboliten, detektiert in Plasma aus Mäusen, die 14 Tage lang mit Resveratrol versetztes Futter erhielten. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 6$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]	LLOQ [nM]	LOD [nM]
Resveratrol-sulfoglucuronid ¹	149 \pm 148	40	13
Resveratrol-3-O-glucuronid	417 \pm 324	30	10
Resveratrol-4'-O-glucuronid	Spuren	30	10
Resveratrol-3-sulfat	104 \pm 73	9,2	3,1
<i>trans</i> -Resveratrol	8,0 \pm 4,0	7,6	2,5
<i>cis</i> -Resveratrol	Spuren	1,6	0,5
Dihydroresveratrol	8,0 \pm 12	4,4	1,5
Dihydroresveratrol-glucuronid ²	875 \pm 298	100	33
Piceatannol	< LOD	2,1	0,7
Lunularin	< LOD	3,2	1,1
3,3'-Dihydroxybibenzyl	< LOD	0,8	0,3

¹Über RES-3-Glucuronid (UV, 305 nm) semi-quantifiziert.

²Über Dihydroresveratrol (UV, 285 nm) semi-quantifiziert.

tion vorhanden; Piceatannol, Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl konnten nicht detektiert werden. Über das Signal im UV-Chromatogramm konnten ein Resveratrol-sulfoglucuronid sowie ein Dihydroresveratrol-glucuronid semi-quantifiziert werden. Ein Dihydroresveratrol-Sulfat koeluierte mit Resveratrol-3-Sulfat, sodass keine Semi-Quantifizierung über das UV-Chromatogramm vorgenommen werden konnte. Ausgehend von der Intensität der zwei Sulfate im Massenspektrum, nahm das Dihydroresveratrol-Konjugat wahrscheinlich den größeren Anteil des UV-Signals ein. Zusammen mit dem Dihydroresveratrol-Glucuronid waren somit Dihydroresveratrol-Konjugate die Hauptmetaboliten in allen Proben.

Zur Detektion reduktiver Resveratrolmetaboliten wurden Plasmaproben enzymatisch hydrolysiert und erneut analysiert. Die Quantifizierung erfolgte dabei über die Referenzsubstanzen der Aglykone mittels MRM. Analog zu den Konzentrationen der Konjugate im Plasma war bei der Analyse der Aglykone Dihydroresveratrol höher konzentriert als *trans*-Resveratrol (Tabelle 5.19). Durch die geänderte Aufarbeitung konnten Bestimmungs- und Detektionsgrenze leicht herabgesetzt werden. Piceatannol und 3,3'-Dihydroxybibenzyl wurden nun im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich detektiert. Möglicherweise wurden Konjugate dieser zwei Substanzen gebildet, die konzentrationsbedingt jedoch nicht detektiert werden konnten. Durch Hydrolyse wur-

den die Aglykone freigesetzt und konnten spezifisch und empfindlich durch MRM quantifiziert werden. Lunularin war jedoch in allen Proben unterhalb der Detektionsgrenze.

Tabelle 5.19: Resveratrol-Metaboliten nach enzymatischer Hydrolyse, detektiert in Plasma aus Mäusen, die 14 Tage lang mit Resveratrol versetztes Futter erhielten. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 6$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]	LLOQ [nM]	LOD [nM]
<i>trans</i> -Resveratrol	978 \pm 987	1,0	0,6
<i>cis</i> -Resveratrol	54 \pm 54	0,3	0,2
Dihydroresveratrol	1290 \pm 481	1,2	0,7
Piceatannol	4,2 \pm 5,0	0,5	0,3
Lunularin	< LOD	1,6	1,0
3,3'-Dihydroxybibenzyl	1,0 \pm 1,1	0,2	0,1

5.3.3 Metabolisierung von Resveratrol in Schweinen

Zwei Gruppen aus jeweils zwei männlichen, kastrierten Hausschweinen erhielten drei Tage lang Futter, das mit einem resveratrolhaltigen Weinrebenextrakt in zwei verschiedenen Konzentrationen versetzt war. Unmittelbar vor der Studie sowie während der drei Interventionstage wurden regelmäßig Blutproben genommen.

Plasmaproben nach 45 min und 4 h der Gruppe mit höherer Resveratrol-Konzentration im Futter wurden mittels HPLC-MS qualitativ und quantitativ analysiert. Alle detektierten Metaboliten wurden mittels MRM-Experiment im Massenspektrometer über die entsprechende Referenzsubstanz quantifiziert (Tabelle 5.20). Übersichts- und Fragmentspektren sind in Anhang C.9 (S. 178) zu finden.

In den nach 45 min genommenen Plasmaproben konnten sechs Resveratrol-Metaboliten detektiert werden. Hauptmetabolit war das Resveratrol-3-O-glucuronid; das 4'-O-glucuronid war nur in Spuren zu detektieren. Das freie Aglykon von Resveratrol wurde in etwa gleich großer Menge als *cis*- wie als *trans*-Isomer detektiert. Der vergleichsweise hohe Anteil des *cis*-Isomers ist ungewöhnlich und könnte durch UV-induzierte Isomerisierung von *trans*-Resveratrol entstanden sein. Eine unsachgemäße Handhabung der Proben unter Tageslichteinwirkung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Studie und Probenahme extern durchgeführt wurden.

Im Gegensatz zu den Maus-Plasma-Proben konnten im Schwein-Plasma keine Dihydroresveratrol-Konjugate detektiert werden. Das Aglykon selbst lag nur in Spuren vor. Der Grund dafür liegt in der Zeit der Probenahme. Dihydroresveratrol wird durch die Darmmikrobiota aus Resveratrol gebildet und ist nach 45 min noch zu gering konzentriert, um bereits als Konjugat vorzuliegen.

Aus diesem Grund wurden Plasmaproben analysiert, die 4 h nach Gabe des resveratrolhaltigen Futters genommen wurden. Nach dieser Zeit war Resveratrol-3-O-glucuronid geringer konzentriert als nach 45 min; *trans*-Resveratrol war nicht mehr zu detektieren (Tabelle 5.20). Freies Resveratrol war demnach bereits vollständig konjugiert, gebildete Konjugate möglicherweise bereits teilweise ausgeschieden. Freies Dihydroresveratrol lag auch nach 4 h im Spurenbereich. Ein Dihydroresveratrol-Glucuronid konnte jedoch durch hochauflösende Massenspektrometrie in Spuren

detektiert werden. Die Konzentration des Konjugats war jedoch nicht ausreichend, um über die Peakfläche im UV-Chromatogramm quantifiziert zu werden.

Um ein Maß für die Reduktion und Oxidation von Resveratrol vor der Konjugation zu erhalten, wurden die Plasmaproben zum Zeitpunkt $t = 4$ h enzymatisch hydrolysiert. Nach Abspaltung aller Konjugate konnten vier verschiedene Aglykone von Resveratrolderivaten detektiert werden (Tabelle 5.21). Immer noch war *trans*-Resveratrol am höchsten konzentriert; die Konzentration von Dihydroresveratrol betrug etwa ein Sechstel davon. Piceatannol und *cis*-Resveratrol wurden in geringer Konzentration detektiert. Lunularin und das isomere 3,3'-Dihydroxybenzyl konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

Tabelle 5.20: Resveratrol-Metaboliten, detektiert in Plasmaproben aus Schweinen, 45 min bzw. 4 h nach Gabe von resveratrolhaltigem Futter. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]		LLOQ [nM]	LOD [nM]
	$t = 45$ min	$t = 4$ h		
Resveratrol-4'-O-glucuronid	Spuren	Spuren	14,8	4,4
Resveratrol-3-O-glucuronid	825 ± 357	417 ± 65	15,4	4,6
Resveratrol-3-sulfat	$26 \pm 9,2$	$43 \pm 2,4$	4,6	1,4
<i>trans</i> -Resveratrol	$6,0 \pm 1,7$	< LOD	3,8	1,2
<i>cis</i> -Resveratrol	$8,9 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,0$	0,8	0,2
Dihydroresveratrol	Spuren	Spuren	2,2	0,6
Piceatannol	< LOD	< LOD	1,8	0,6
Lunularin	< LOD	< LOD	7,0	2,2

Tabelle 5.21: Resveratrol-Metaboliten nach enzymatischer Hydrolyse, detektiert in Plasmaproben aus Schweinen, 4 h nach Gabe von resveratrolhaltigem Futter. Angegeben sind Mittelwert und halbe Spannweite ($n = 2$) sowie Bestimmungs- (LLOQ) und Nachweisgrenze (LOD).

Metabolit	Konzentration [nM]	LLOQ [nM]	LOD [nM]
<i>trans</i> -Resveratrol	431 ± 76	1,0	0,6
<i>cis</i> -Resveratrol	17 ± 9	0,3	0,2
Dihydroresveratrol	76 ± 100	1,2	0,7
Piceatannol	50 ± 10	0,5	0,3
Lunularin	< LOD	1,6	1,0
3,3'-Dihydroxybibenzyl	< LOD	0,2	0,1

6 Diskussion

6.1 Fremdstoffmetabolismus in *C. elegans*

Über den Fremdstoffmetabolismus in *C. elegans* ist bisher nur wenig bekannt. Einzelne Publikationen beschreiben die Konjugation bestimmter Fremdstoffe mit Glucosiden, Phospho-Glucosiden und Sulfaten (Laing et al., 2010; Surco-Laos et al., 2011; Soukup et al., 2012; Stupp et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die Metabolisierung ausgewählter Stoffklassen in *C. elegans* untersucht, um unterschiedliche Aspekte des Fremdstoffmetabolismus in dem Fadenwurm zu beleuchten und dessen Stoffwechselfvorgänge weiter aufzuklären.

Funktionalisierung und Konjugation

Synchronisierte L₄-Larven von *Caenorhabditis elegans* wurden mit den natürlich vorkommenden Substanzen Flavon, Quercetin, *trans*-Resveratrol und *p*-Aminobenzoesäure inkubiert, um deren Metabolisierung im Fadenwurm zu untersuchen. Alle Substanzen wurden von *C. elegans* aufgenommen und metabolisiert. Eine Metabolisierung durch die als Nahrung zugegebenen Bakterien (*E. coli* OP50) konnte ausgeschlossen werden, da diese vor der Zugabe durch Erhitzen inaktiviert wurden.

Flavon wurde durch *C. elegans* zu vier verschiedenen Hydroxyflavonen sowie zu einem Dihydroxyflavon umgesetzt. Durch Analyse im Massenspektrometer konnte gezeigt werden, dass die Hydroxylierung bevorzugt am B-Ring des Flavons stattfindet.

Diese Hydroxylierungsreaktionen werden durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert, die im Genom von *C. elegans* durch 86 Gene kodiert sind (Lindblom und Dodd, 2006). Die Aktivität unterschiedlicher CYP-Enzyme in *C. elegans* wurde durch die Umsetzung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Kulas et al., 2008) sowie Aflatoxin B₁ (Leung et al., 2010) zu deren oxidativen Metaboliten bereits nachgewiesen. Untersuchungen von Menzel et al. (2005) sowie Laing et al. (2010) belegen, dass die Genexpression bestimmter CYP-Isoformen durch organische Fremdstoffe wie das Herbizid Atrazin oder die Pharmazeutika Lansoprazol und Albendazol induziert werden kann. Eine reduzierte Metabolisierung nach Ausschalten bestimmter CYP-Gene durch RNAi konnte ebenfalls gezeigt werden: Das polychlorierte Biphenyl PCB52 wurde durch *C. elegans* zu drei hydroxylierten Metaboliten umgesetzt, deren Konzentration nach RNAi mit den Genen *cyp-14A3* und *cyp-34A6* um 55–78% abnahm (Schäfer et al., 2009).

Die CYP-vermittelte Funktionalisierung von Flavon zu hydroxylierten Metaboliten dient auch in *C. elegans* dem Zweck der Konjugation, was die rasche und umfangreiche Bildung von Phase-II-Konjugaten belegt. Nach Inkubation von *C. elegans* mit Flavon oder Resveratrol konnten jeweils 9 Konjugate detektiert werden, mit Quercetin sogar 17. Alle Konjugate bestanden aus Hexose- und

Phosphatresten in unterschiedlicher Kombination; bei Resveratrol und Quercetin konnte durch ein zweites Experiment gezeigt werden, dass es sich bei den Hexoseresten um Glucose handelt. Der Hauptmetabolit bei allen eingesetzten Substanzen war ein Konjugat aus je einem Hexose- und Phosphatrest, dessen Konzentration bis zu 83% der Gesamtkonzentration betrug. Dabei war stets der Hexosereist an das Aglykon und der Phosphatrest an den Hexosereist gebunden (bei zwei Quercetin-Metaboliten wurden Hinweise gefunden, dass diese Reihenfolge vermutlich umgekehrt war).

Eine andere Untersuchung mit *C. elegans* und Albendazol beschreibt ausschließlich die Bildung von Glucosiden (Laing et al., 2010), wie sie auch bei allen in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen in geringer Konzentration detektiert wurden. Surco-Laos et al. (2011) inkubierten *C. elegans* mit Quercetin und identifizierten ebenfalls mehrere Glucoside, allerdings auch Sulfo-Glucoside. Sulfathaltige Metaboliten konnten in der vorliegenden Arbeit bei keiner Substanz, mit der *C. elegans* inkubiert wurde, detektiert werden. Die Unterscheidung von Sulfat- und Phosphatresten über die Masse von Molekül- und Fragment-Ionen ist nur möglich, wenn ein Massenspektrometer mit ausreichender Auflösung verwendet wird. Das in den Analysen von Surco-Laos et al. (2011) verwendete Gerät zeigt sowohl für Sulfat- als auch für Phosphatreste ein Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) von 80,0 an. Für die vorliegende Arbeit wurde hingegen ein hochauflösendes Massenspektrometer verwendet, das Sulfat- und Phosphatreste mit m/z 79,9574 bzw. m/z 79,9669 misst und somit zweifelsfrei unterscheiden kann. Bei der Analyse von Konjugaten aller Testsubstanzen (inklusive Quercetin) wurden nur Fragmente detektiert, die von phosphathaltigen Konjugaten stammen, nicht jedoch von sulfathaltigen. Die Bildung sulfathaltiger Quercetin-Konjugate durch *C. elegans* konnte nicht reproduziert werden, obwohl die experimentellen Bedingungen äquivalent waren. Die Beschreibung solcher Konjugate durch Surco-Laos et al. ist daher fehlerhaft.

Bei der Umsetzung von *p*-Aminobenzoesäure durch *C. elegans* konnten ein Gykosid sowie ein Phosphoglykosid detektiert werden, deren Konjugation in beiden Fällen über die Aminogruppe stattfand. Über die Position des Phosphatrests am Glucosid konnten auf Basis der durchgeführten Experimente keine Aussagen getroffen werden. Die Konjugation von stickstoffhaltigen Substanzen mit Glucose und Phosphat durch *C. elegans* ist bereits beschrieben worden (Stupp et al., 2012). Die Umsetzung des von Bodenbakterien gebildeten Indols führte zu einem β -D-Glucopyranosid sowie zu einem 3'-O-Phospho- β -D-Glucopyranosid, die jeweils als N-Glykosid vorlagen.

Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass *C. elegans* aufgenommene Fremdstoffe umfangreich und effizient umsetzt. Die Umsetzung von Flavon zu verschiedenen Hydroxy- und Dihydroxyflavonen belegt zum ersten Mal in diesem Umfang die Fähigkeit von *C. elegans* zur Phase-I-Metabolisierung. Phosphoglykoside wurden bei allen mit *C. elegans* eingesetzten Substanzen als Hauptkonjugate beobachtet; sie waren über Sauerstoff- oder Stickstoffatome des Aglykons gebunden. Die Bildung dieser Konjugate kann daher als allgemein gültiger und hauptsächlicher Metabolisierungsweg von Fremdstoffen in *C. elegans* angesehen werden. Sowohl 3'-O-Phosphoglycoside, als auch 6'-O-Glucosylglucoside (Gentiobioside) sind in der Literatur beschrieben worden (Stupp et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit hingegen konnten mehrere Hinweise auf ein 6'-O-Phosphoglycosid gefunden werden. Diese sollten jedoch nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Stupp et al. gesehen werden. Wie die Bildung des Gentiobiosids zeigte, ist die weitere Konjugation nach Glucosylierung nicht auf Position 3' des Zuckermoleküls beschränkt.

Strukturaufklärung des Resveratrolmetaboliten R6

Experimente mit saurer Phosphatase, Glucose-6-Phosphatase sowie Messungen mit NMR-Spektroskopie wurden durchgeführt, um weitere Anhaltspunkte für die Strukturaufklärung des Hauptmetaboliten von Resveratrol in *C. elegans* zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass der Hauptmetabolit R6 ein *trans*-Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid ist, welches am Glucoserest mit einer Phosphatgruppe verestert ist. Diese Art der Konjugation in *C. elegans* ist bereits für andere Substanzen gezeigt worden. Bei der Inkubation mit Indol (Stupp et al., 2012) oder dem Isoflavon Genistein (Soukup et al., 2012) wurden ebenfalls Phosphoglucosid-Konjugate als Hauptmetaboliten identifiziert.

Die Umsetzung von R6 mit saurer Phosphatase wurde durchgeführt, um den Phosphatrest unabhängig von seiner Position hydrolytisch vom Rest des Moleküls abzuspalten, egal, in welcher Position sich dieser befand. Durch Isolation und Analyse des Spaltungsprodukts sowie dem Vergleich mit einer Referenzsubstanz konnte gezeigt werden, dass R6 *trans*-Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid zu Grunde lag. Um genauere Informationen über die Position des Phosphatrests zu erhalten, wurde R6 mit Glucose-6-Phosphatase umgesetzt, was zum gleichen Produkt wie im vorherigen Experiment führte. Dieses Enzym spaltet spezifisch den Phosphatrest von Glucose-6-Phosphat. Die Reinheit und Spezifität des verwendeten Enzyms wurde zwar durch den Hersteller bescheinigt, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Enzymaktivität zur Spaltung anderer Glucose-Phosphate außer dem 6-Phosphat vorliegt. Da die Spezifität nicht experimentell untersucht und bestätigt wurde, kann die Spaltung von R6 zum *trans*-Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid lediglich als Hinweis, nicht jedoch als Beweis genommen werden, dass die Phosphatgruppe in Position 6' des Zuckermoleküls gebunden ist.

Auch 1-Hydroxyphenazin, das von Bodenbakterien gebildet wird, wurde von *C. elegans* durch Konjugation zu einem Phosphoglucosid entgiftet (Stupp et al., 2012). Mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie beschrieben Stupp et al. den gebildeten Metaboliten als 1-O-(3'-O-phospho- β -D-glucopyranosyl)-phenazin. Wegen der begrenzten Menge des *ex vivo* isolierten Hauptmetaboliten R6 konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich eindimensionale $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie angewendet werden. Das Spektrum von R6 wurde mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosids verglichen; Unterschiede in der chemischen Verschiebung von Protonen waren auf den abschirmenden Einfluss der Phosphatgruppe zurückzuführen. Auf diese Art wurde die Änderung der chemischen Verschiebung einer Gruppe aus zwei chemisch identischen Protonen des Glucoserests beobachtet, wenn ein Phosphatrest an diesem gebunden war. Da einzig die zwei Protonen in Position 6' des Glucoserests chemisch identisch sind, wurde diese Änderung der Verschiebung als Hinweis gewertet, dass die Phosphorylierung an dieser Position stattgefunden hat.

Auch in den Daten von Stupp et al. kann diese Veränderung der chemischen Verschiebung beobachtet werden. Neben dem Hydroxyphenazin-phosphoglucosid beschrieben die Autoren ein Hydroxyphenazin-glucosid, das als Metabolit in *C. elegans* gebildet wird. Beim Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dieser zwei Substanzen kann eine Änderung der chemischen Verschiebung des Protons an Position 3' des Glucoserests um 0,65 ppm beobachtet werden; andere Protonen des Glucoserests erfuhren eine Änderung von maximal 0,2 ppm. Die stärkere Änderung der chemischen Verschiebung des Protons an Position 3' kann durch die abschirmende Wirkung eines Phos-

phatrests an dieser Position erklärt werden. In den Spektren, die von Resveratrol-3-O- β -D-glucopyranosid und dessen phosphorylierten Derivats gemessen wurden, betrug die Unterschiede in der chemischen Verschiebung ca. 0,5 ppm bzw. 0,02 ppm.

Die Phosphorylierung von glucosylierten Metaboliten scheint in *C. elegans* ein allgemeiner Stoffwechselweg zu sein. Die Bindung dieses Phosphatrests an den Glucoserest kann hingegen an verschiedenen Positionen stattfinden. Sowohl die Ergebnisse aus den Experimenten für die vorliegende Arbeit, als auch andere in der Literatur publizierte Ergebnisse (Soukup et al., 2012; Stupp et al., 2012) weisen darauf hin, dass die Positionen 3' und 6' des Glucoserests für die Phosphorylierung verwendet werden. Der Grund für die Bildung strukturell unterschiedlicher Metaboliten könnte an den unterschiedlichen Substanzen liegen, die aus sterischen Gründen die Bildung eines bestimmten Isomers bevorzugen. Ob die Konjugation in einem oder zwei Schritten stattfindet, kann einen Einfluss auf die Struktur der gebildeten Konjugate haben und vom Substrat abhängig sein.

Ausscheidung

Die Untersuchung des Mediums nach der Inkubation von *C. elegans* mit Quercetin in Flüssigkultur erlaubte zum ersten Mal einen Einblick auf die Ausscheidung gebildeter Metaboliten. Von den in Flüssigkultur gebildeten zwölf Quercetin-Konjugaten konnten vier im Medium detektiert werden. Drei davon waren Quercetin-glucoside, eines ein -diglucosid. Die höchste Konzentration erreichte Quercetin-3-O-glucosid sowohl intrazellulär als auch im Medium.

Phosphathaltige Konjugate, die intrazellulär in nur marginal geringerer Konzentration gemessen wurden, konnten im Medium nicht detektiert werden. Möglicherweise ist Phosphat in *C. elegans* in zu geringer Konzentration vorhanden, sodass es vor der Ausscheidung hydrolysiert und rückgewonnen wird. Andererseits könnten diese Konjugate auch als Speicher- oder Transportform für *C. elegans* dienen. Die Ausscheidung kann bei *C. elegans* über den Darm oder die Exkretionszellen bzw. -kanäle erfolgen (Altun und Hall, 2009). Bis eine endgültige Eliminierung der Konjugate stattfinden kann, werden diese möglicherweise als phosphorylierte Derivate transportiert und zwischengelagert, bevor sie zur Ausscheidung dephosphoryliert werden.

Bisher ist über die Elimination von Fremdstoffen und deren Konjugaten aus *C. elegans* nur wenig bekannt. Die Akkumulierung und Ausscheidung von Phenanthren durch *C. elegans* wurde erst kürzlich untersucht (Spann et al., 2015). Dabei konnte eine verzögerte Ausscheidung, verursacht durch Zwischenspeicherung der Substanz bzw. ihrer Metaboliten, beobachtet werden. Da die Quantifizierung der Substanz in dieser Studie über radioaktive Markierung stattfand, konnte nicht zwischen Metaboliten und der ursprünglichen Substanz unterschieden werden. Es bleibt daher unklar, ob überhaupt eine Konjugation stattfand und welche Metaboliten akkumuliert bzw. ausgeschieden wurden.

Hier könnte der Anschluss für weiterführende Forschungsarbeiten liegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bereits die Tendenz, dass von *C. elegans* ausgeschiedene Metaboliten einfache Glucoside und Diglucoside sind. Obwohl im Metabolitenspektrum der eingesetzten Substanz auch phosphathaltige Konjugate detektiert wurden, die nicht niedriger konzentriert waren als Glucoside und Diglucoside, konnten keine phosphathaltigen Metaboliten als Ausscheidungsprodukte identifiziert werden. Ob diese Metaboliten gezielt zurückgehalten werden, weil sie eine physiologische Rolle spielen, wäre ebenfalls in zukünftigen Arbeiten zu klären.

6.2 Metabolisierung von Resveratrol

Die verschiedenen Spezies, die für diese Arbeit betrachtet wurden, können trotz ihrer phänotypischen Unterschiede in zwei Gruppen, basierend auf der Metabolisierung von Resveratrol, eingeteilt werden: *C. elegans* und *D. melanogaster* konjugierten Resveratrol zu Hexosiden und Phosphohexosiden; bei Säugetieren fand sowohl eine Konjugation mit Sulfat und Glucuronsäure, als auch eine reduktive Umsetzung durch die Darmmikrobiota statt.

Unterschiedliche Konjugation in verschiedenen Spezies

Speziesspezifische Differenzen im Metabolismus von Resveratrol bei Säugetieren wurden bei der Konzentration der verschiedenen Konjugate in den untersuchten Spezies festgestellt. In humanem Plasma dominierten Resveratrol-3-Sulfat sowie ein Disulfat das Metabolitenspektrum; Glucuronide nahmen eine geringere Konzentration ein. In Mäusen und Schweinen war hingegen Resveratrol-3-O-Glucuronid als Hauptmetabolit zu detektieren. Das 4'-O-Glucuronid war in beiden Spezies nur in Spuren vorhanden. Auch die Bildung reduktiver Metaboliten unterschied sich zwischen den einzelnen Spezies. In hydrolysierten Proben konnte Dihydroresveratrol im Menschen bis zu dreimal höher konzentriert detektiert werden als *trans*-Resveratrol. Zwei zusätzlich dehydroxylierte Metaboliten, Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl, waren darüber hinaus in nennenswerter Konzentration vorhanden. In Mäusen und Schweinen waren diese zwei Metaboliten nicht nachweisbar. Dihydroresveratrol war in hydrolysierten Plasmaproben aus Schweinen nur etwa ein Fünftel so hoch konzentriert wie *trans*-Resveratrol; in Mäusen waren beide Aglykone auf vergleichbarem Niveau. Die Konjugation der reduktiven Metaboliten fand ebenfalls in unterschiedlichem Ausmaß statt. In humanen Plasmaproben wurden mehrere Dihydroresveratrol-Konjugate detektiert. Konjugate von Lunularin waren darüber hinaus in Urinproben zu finden. In Plasma- und Urinproben von Mäusen wurden keine Lunularin-Konjugate detektiert; stattdessen war im Plasma ein Glucuronid von Dihydroresveratrol so stark konzentriert, dass eine Semi-Quantifizierung über das UV-Signal möglich war. In einzelnen Proben überschritt die Konzentration dieses Glucuronids jene von Resveratrol-Konjugaten.

Die Bildung von Glucuroniden und Sulfaten als Teil der Metabolisierung von Resveratrol in Mensch, Schwein und Maus ist bereits beschrieben worden (Azorín-Ortuño et al., 2011; Cottart et al., 2014; Yu et al., 2002). Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal einen umfassenden qualitativen Überblick aller Konjugate und reduktiven Metaboliten in Plasma und Urin, deren Identifikation durch hochaufgelöste Massenspektrometrie erfolgte. Die Ergebnisse sind untereinander besser vergleichbar, da bei allen untersuchten Spezies dieselben Methoden zur Probenaufarbeitung und Detektion verwendet wurden. Nach Quantifizierung der Hauptmetaboliten wurde deutlich, dass sich das Muster aller gebildeten Metaboliten zwischen den einzelnen Spezies unterschied. Diese Unterschiede müssen bei der Bewertung von Studien zur Wirkung von Resveratrol und der Übertragung deren Ergebnisse auf den Menschen berücksichtigt werden. Der Ursprung dieser spezies-spezifischen Metabolisierung könnte hingegen in der Expression verschiedener Enzyme des Fremdstoffmetabolismus liegen.

Die Bildung von Glucuronsäure- und Sulfo-Konjugaten wird in Säugetieren durch UDP-Glucuronyl- (UGT) bzw. Sulfotransferasen (SULT) katalysiert. Bisher sind 117 UGTs in Säugetie-

ren beschrieben worden (Mackenzie et al., 2005), von denen zahlreiche Isoformen in Menschen, Schweinen und Mäusen vorkommen¹. Innerhalb einer Enzymfamilie (z.B. UGT1A) bestimmt die N-terminale Domäne der unterschiedlichen Isoformen, welches Substrat durch dieses Enzym konjugiert wird (Ouzzine et al., 2003). In Abhängigkeit von der Expression und Aktivität der verschiedenen Isoformen entstehen unterschiedliche Glucuronsäure-Konjugate. Es ist daher schwer vorherzusagen, in welcher Spezies welche Konjugate eines Fremdstoffes in welchem Umfang gebildet werden.

Gleiches gilt für Sulfo-Konjugate, deren Bildung durch Sulfotransferasen katalysiert wird. Untersuchungen in humanem Lebercytosol deuten darauf hin, dass für die Bildung von Resveratrol-3-Sulfat hauptsächlich die humane Sulfotransferase SULT1A1 verantwortlich ist (Miksits et al., 2005). Die zwei Isoformen SULT1A2 und SULT1A3 katalysieren überwiegend die Bildung von Resveratrol-4'-sulfat und -3,4'-disulfat. Es ist nicht bekannt und wurde nicht untersucht, welche dieser Enzyme in den verschiedenen in der vorliegenden Arbeit diskutierten Spezies exprimiert werden. Neben der Expression dieser Enzyme bestimmt zudem auch die Verfügbarkeit ihres Substrats, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), in welchem Umfang sulfathaltige Metaboliten gebildet werden können.

Unter diesem Gesichtspunkt ist das quantitative Verhältnis von Sulfo- und Glucuronsäure-Konjugaten in den einzelnen Spezies auffällig. In Mäusen und Schweinen nahmen sulfathaltige Metaboliten nur einen geringen Anteil ein. In humanen Plasmaproben hingegen waren sulfathaltige Konjugate sowohl nach 40 min, als auch nach 4,5 h die am höchsten konzentrierten Metaboliten. Das zur Bildung von Sulfato-Konjugaten benötigte PAPS ist im Organismus nur in begrenzter Menge vorhanden, da sämtliche schwefelhaltigen Verbindungen von Außen zugeführt werden müssen. UDP-Glucuronsäure hingegen kann im Körper quasi unbegrenzt durch Oxidation von Glucose erzeugt werden. Bei Beanspruchung des Metabolismus durch große Mengen eines Fremdstoffes erscheint es daher plausibel, wenn Glucuronsäure-Konjugate in größerem Umfang als Sulfo-Konjugate gebildet werden. Genau dies wurde im Plasma von Mäusen und Schweinen beobachtet, während im Menschen die Sulfo-Konjugate fünfmal höher konzentriert waren als die Glucuronide. Die Erklärung für diesen Unterschied mag in der unterschiedlichen Aktivität von UGTs und Sulfotransferasen in den verschiedenen Spezies liegen. Quantitative Untersuchungen der Genexpression für diese Enzyme könnten weitere Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen Metabolitenspektren liefern.

Neben der unterschiedlichen Genexpression in den verschiedenen Spezies spielt auch die Darmmikrobiota eine Rolle in der Metabolisierung von Fremdstoffen. Da *C. elegans* und *D. melanogaster* keine so vielfältige und einflussreiche Darmmikrobiota wie Säugetiere besitzen, ist das Metabolitenspektrum schmäler und nicht direkt mit jenem von Säugetieren zu vergleichen. In diesen ist die Bildung reduktiver Metaboliten wie Dihydroresveratrol, Lunularin und 3,3'-Dihydroxybibenzyl durch bakterielle Enzyme möglich. Mit der großen Vielfalt an Darmbakterien (die Anzahl verschiedener Spezies im menschlichen Darmmikrobiom wird auf über 300 geschätzt (Guarner und Malagelada, 2003)) ist auch die Bildung verschiedener Metaboliten in unterschiedlichem Ausmaß verbunden. Andererseits können Bakterien nicht nur für die Bildung, sondern auch für den Abbau

¹<https://www.flinders.edu.au/medicine/sites/clinical-pharmacology/ugt-homepage.cfm> (UDP Glucuronosyltransferase Homepage der Flinders University School of Medicine)

von Metaboliten verantwortlich sein; bakterielle Glucuronidasen, Glucosidasen und Sulfatasen katalysieren die Spaltung von Konjugaten und ermöglichen eine Wiederaufnahme der Aglykone im Darm. Die im Vergleich zu Glucuroniden sehr hohe Konzentration von sulfathaltigen Metaboliten in humanem Plasma kann allerdings nicht durch den bakteriellen Abbau von Glucuroniden erklärt werden. Nach 40 min entnommene Proben spiegeln das Metabolitenspektrum wider, das durch humane Enzyme gebildet wurde. Die Ausscheidung in den Darm, der bakterielle Abbau und die Resorption der Aglykone würde eine längere Zeitspanne in Anspruch nehmen. Unter diesem Aspekt zeigen die Proben aus der Studie mit Mäusen ein differenzierteres Bild der Metabolisierung, da Resveratrol regelmäßig über einen längeren Zeitraum über das Futter aufgenommen wurde, bevor Blutproben entnommen wurden. Auf diese Weise konnte sich eine konstante Plasmakonzentration von Resveratrol und seiner Metaboliten einstellen.

Ungeachtet des unterschiedlichen Metabolitenspektrums in den verschiedenen untersuchten Spezies dürfen *in vivo* gebildete Metaboliten von *trans*-Resveratrol nicht als inaktive, unwichtige Nebenprodukte von Resveratrol angesehen werden. Der hydroxylierte Metabolit Piceatannol, in *C. elegans*, Menschen, Mäusen und Schweinen detektiert, hat beispielsweise ähnliche antioxidative, krebsschutzprotektive Eigenschaften wie Resveratrol selbst (Piotrowska et al., 2012). Andererseits verändert sich die dosisabhängige agonistische bzw. antagonistische Estrogenrezeptoraffinität von Resveratrol (Mueller et al., 2004) zu einer rein antagonistischen, wenn es als Resveratrol-3-O-Sulfat vorliegt (Ruotolo et al., 2012). Resveratrol-Glucuronide besitzen diese Eigenschaften nicht. Dass eine Konjugation mit Sulfat die estrogene Wirkung nicht aufhebt, sondern sogar verstärken kann, wurde bereits für das Phytoestrogen Daidzein aus Soja gezeigt (Pugazhendhi et al., 2008). Sulfate von Resveratrol konnten in einer Studie mit humanen Krebszellen Autophagie und Seneszenz auslösen; *in vivo* dienen sie als Transportform, um in Gewebe zu gelangen und Resveratrol intrazellulär freizusetzen (Patel et al., 2013). Die hohe Konzentration von Resveratrol-3-O-Sulfat in humanem Plasma sollte daher nicht in Bezug auf ihre bioaktive Wirkung unterschätzt werden. Weitere Untersuchungen in diese Richtung könnten eine höhere Bioverfügbarkeit von Resveratrol und damit ein Erreichen therapeutisch relevanter Konzentrationen in Zellen und Geweben ermöglichen.

Biologische Wirkung

Die umfangreiche Metabolisierung von Resveratrol hatte bei allen untersuchten Spezies eine sehr geringe intrazelluläre Konzentration des Aglykons zur Folge (mit Ausnahme von *D. melanogaster*, wo Resveratrol vermutlich im Fettkörper angereichert wurde). Die Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Metaboliten sowie das unterschiedliche Konjugationsmuster, muss bei der Beschreibung von Wirkungen auf den jeweiligen Organismus beachtet werden.

Mehrere Untersuchungen mit *C. elegans* beschreiben eine Verlängerung der mittleren Lebenszeit bei Gabe von Resveratrol in Konzentrationen zwischen 5 und 100 μM (Wood et al., 2004; Gruber et al., 2007; Zarse et al., 2010). Als Mechanismus wird die Verstärkung der Genexpression von *sir-2.1* diskutiert, welches für eine Proteindeacetylase kodiert. Die lebensverlängernde Wirkung von Resveratrol ist nicht messbar in *sir-2.1*-Null-Mutanten von *C. elegans*, was für einen Zusammenhang zwischen der Expression dieses Gens, Resveratrol und der Lebenszeitverlängerung spricht (Wood et al., 2004). Andererseits konnte nach Gabe des vielfach stärkeren *sir-2.1*-

Aktivators SRT1720 keine Verlängerung der Lebenszeit von *C. elegans* festgestellt werden (Zarse et al., 2010). Tatsächlich wird die Eigenschaft von Resveratrol, Sirtuine direkt zu aktivieren, in letzter Zeit immer häufiger in Frage gestellt. Eine indirekte Aktivierung über die Induktion von AMP-aktivierten Protein-Kinasen wurde vorgeschlagen (Cantó et al., 2010); ein anderer, noch nicht aufgeklärter Mechanismus wäre aber ebenfalls denkbar (Baur et al., 2012). Die Beteiligung von *sir-2.1* beim lebensverlängernden Effekt durch Resveratrol in *C. elegans* scheint erforderlich, wobei weitere Auswirkungen von Resveratrol wie dessen antioxidative Kapazität und die Hochregulierung von Phase-II-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus ebenfalls eine wichtige Rolle spielen müssen.

Auch bei *Drosophila melanogaster* wurde beobachtet, dass nicht Resveratrol alleine einen lebensverlängernden Effekt hat. Bei Betrachtung von Fliegen, die mit unterschiedlicher, definierter Nahrung („wenig Kohlenhydrate + viel Protein“ oder „viel Fett“) und Resveratrol-Gabe gehalten wurden, konnte eine Verlängerung der mittleren Lebenszeit gemessen werden (Wang et al., 2013). Mit Standard-Ernährung oder „viele Kohlenhydrate + wenig Protein“ blieb der Effekt aus. Diese Daten stellen eine mögliche Erklärung dar, warum die schon lange beschriebenen lebensverlängernden Eigenschaften von Resveratrol in *D. melanogaster* (Wood et al., 2004) nicht immer reproduziert werden konnten (Bass et al., 2007). Wie bei *C. elegans* wurde zunächst die Aktivierung von Sirtuinen als zu Grunde liegender Mechanismus vermutet (Wood et al., 2004). Diese Hypothese wurde jedoch ebenso häufig in Frage gestellt, wie sie reproduziert werden konnte (Baur et al., 2012).

Der Zusammenhang zwischen definierter Ernährung und der Lebenserwartung ist auch bei Säugetieren bekannt. Durch Verminderung der Energiezufuhr aus der Nahrung um etwa 20% gegenüber *ad libitum*-Diät, so genannter Kalorienrestriktion, verlängerte sich die gesunde Lebenszeit kurzlebiger Wirbeltiere wie Fische, Mäuse und Ratten (Heilbronn und Ravussin, 2003). Positive Auswirkungen der Kalorienrestriktion auf lebensverkürzende Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Insulinresistenz und Atherosklerose sind auch bei Menschen beschrieben worden (Redman et al., 2008; Lam et al., 2013). Gerade bei übergewichtigen Menschen (BMI 25–30) konnte durch monatelange Kalorienrestriktion die gleiche Reduktion von Fettgewebe und damit verbundene gesundheitliche Vorteile wie durch Ausdauertraining erzielt werden (Dengel et al., 1996; Murphy et al., 2011).

In überernährten, adipösen Mäusen wurden ähnliche gesundheitliche Verbesserungen beschrieben, wenn die Nahrung mit Resveratrol versetzt war (Pearson et al., 2008). Die Lebenserwartung der adipösen Mäuse wurde um ca. ein Viertel gegenüber der Gruppe ohne Resveratrol vergrößert; die Überlebensrate lag in etwa auf dem Niveau der normal ernährten Kontrollgruppe. Obwohl die größere Lebenserwartung durch Resveratrol-Supplementierung bei normal ernährten Mäusen nicht reproduziert werden konnte, gibt es Hinweise darauf, dass Resveratrol die Vorteile der Kalorienrestriktion in Säugetieren nachahmen kann (Lam et al., 2013).

Die in Humanstudien beobachteten positiven Effekte beziehen sich hauptsächlich auf die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit und Mobilisierung der Fettverbrennung durch Mitochondrien, sind aber nur festzustellen in Risikogruppen wie Adipositas- oder Diabetes-Patienten. Auch die oft beschriebenen kardioprotektiven Eigenschaften von Resveratrol wurden nur in Risikogruppen nachgewiesen (Lam et al., 2013). Einzig die Wirkung als Antioxidans konnte auch in gesunden Probanden konsistent gezeigt werden (Ghanim et al., 2010). Die für die vorliegende Arbeit durchgeführte Humanstudie mit *trans*-Resveratrol in gesunden, männlichen Probanden hatte die

Untersuchung der Metabolisierung und Bioverfügbarkeit zum Ziel, nicht aber die Beeinflussung biologischer Parameter durch Resveratrol. Über eine antioxidative oder andere Wirkung kann daher keine Aussage getroffen werden. Da über 99% des eingesetzten *trans*-Resveratrols bereits nach 40 min zu Konjugaten umgewandelt wurden, bleibt aber der Nutzen dieser Substanz als Antioxidans fraglich.

Die niedrige Bioverfügbarkeit (unter 1%) durch die extensive Metabolisierung im Menschen wurde bereits in früheren Arbeiten als limitierender Faktor beschrieben, Resveratrol als Medikament oder prophylaktisches Nahrungsergänzungsmittel einzusetzen (Walle, 2011). Formulierungen mit methylierten Resveratrolderivaten könnten die Metabolisierung verringern und Resveratrol in den Zielgeweben besser verfügbar machen. In dieser Richtung, aber ebenfalls in der Untersuchung der Verteilung und *in situ*-Erzeugung von Resveratrol aus Konjugaten, besteht noch Forschungsbedarf. Nicht zuletzt fehlen doppelblind durchgeführte Langzeitstudien mit den entsprechenden Formulierungen, um die Wirkungen und Effekte von Resveratrol auf Risikopatienten sowie gesunde Menschen abschließend beurteilen und mögliche Nebenwirkungen beschreiben zu können. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist die Metabolisierung von *trans*-Resveratrol in verschiedenen Säugetieren nicht identisch. Biochemische Mechanismen mögen zwischen Menschen und Mäusen, Schweinen, oder auch Fliegen und Fadenwürmern konserviert sein – die Aufnahme, Verteilung und Umwandlung von Fremdstoffen ist es jedoch nicht. Diese Tatsache muss auch in Zukunft bei der Beschreibung und Bewertung von Wirkungen durch vermeintlich positive Substanzen und Naturstoffe berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

- Agarwal, B. und Baur, J. A. (2011). Resveratrol and life extension, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**(1): 138–143.
- Altun, Z. F. und Hall, D. H. (2009). Excretory system, *WormAtlas*.
- Andres-Lacueva, C., Macarulla, M. T., Rotches-Ribalta, M., Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Rodríguez, V. M. und Portillo, M. P. (2012). Distribution of resveratrol metabolites in liver, adipose tissue, and skeletal muscle in rats fed different doses of this polyphenol, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(19): 4833–4840.
- Azorín-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M. J., Vallejo, F., Pallarés, F. J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J. C., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. und Espín, J. C. (2011). Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig, *Molecular Nutrition & Food Research* **55**(8): 1154–1168.
- Bass, T. M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D. und Partridge, L. (2007). Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, *Mechanisms of Ageing and Development* **128**: 546–552.
- Baur, J. A., Ungvari, Z., Minor, R. K., Le Couteur, D. G. und de Cabo, R. (2012). Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan?, *Nature reviews Drug discovery* **11**(6): 443–461.
- Bhatt, J. K., Thomas, S. und Nanjan, M. J. (2012). Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus, *Nutrition Research* **32**(7): 537–541.
- Bode, L. M. (2012). In-vitro- und in-vivo-Studien zur Biotransformation von trans-Resveratrol und oligomeren Derivaten, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Bode, L. M., Bunzel, D., Huch, M., Cho, G.-S., Ruhland, D., Bunzel, M., Bub, A., Franz, C. M. A. P. und Kulling, S. E. (2013). In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota, *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**(2): 295–309.
- Boersma, M., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N., van Iersel, M., van Bladeren, P. und Rietjens, I. (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases, *Chemical Research in Toxicology* **15**(5): 662–670.
- Cantó, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J. R. und Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle, *Cell metabolism* **11**(3): 213–219.
- Cottart, C.-H., Nivet-Antoine, V. und Beaudeau, J.-L. (2014). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans, *Molecular Nutrition & Food Research* **58**(1): 7–21.
- Crandall, J. P., Oram, V., Trandafirescu, G., Reid, M., Kishore, P., Hawkins, M., Cohen, H. W. und Barzilai, N. (2012). Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **67**: 1307–1312.
- Culetto, E. und Sattelle, D. B. (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes, *Human Molecular Genetics* **9**(6): 869–877.

- Dengel, D. R., Pratley, R. E., Hagberg, J. M., Rogus, E. M. und Goldberg, A. P. (1996). Distinct effects of aerobic exercise training and weight loss on glucose homeostasis in obese sedentary men, *Journal of Applied Physiology* **81**(1): 318–325.
- Egner, P. A., Yu, X., Johnson, J. K., Nathasingh, C. K., Groopman, J. D., Kensler, T. W. und Roebuck, B. D. (2003). Identification of aflatoxin M1-N7-guanine in liver and urine of tree shrews and rats following administration of Aflatoxin B1, *Chemical Research in Toxicology* **16**(9): 1174–1180.
- Ghanim, H., Sia, C. L., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K., Patnaik, P., Marumganti, A., Chaudhuri, A. und Dandona, P. (2010). An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **95**(9): E1–E8.
- Gruber, J., Tang, S. Y. und Halliwell, B. (2007). Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1100**(1): 530–542.
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S. E., Daniel, H. und Spanier, B. (2012). Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*, *Mechanisms of Ageing and Development* **133**: 1–10.
- Guarner, F. und Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease, *The Lancet* **361**(9356): 512–519.
- Heilbronn, L. K. und Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition* **78**(3): 361–369.
- Hoffmann, J., Romey, R., Fink, C., Yong, L. und Roeder, T. (2013). Overexpression of *Sir2* in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*, *Ageing* **5**(4): 315–327.
- Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K., Steward, W. und Gescher, A. J. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases – safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics, *Cancer Prevention Research* **4**(9): 1419–1425.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L. et al. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan, *Nature* **425**(6954): 191–196.
- Kulas, J., Schmidt, C., Rothe, M., Schunck, W.-H. und Menzel, R. (2008). Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **472**(1): 65–75.
- Laing, S. T., Ivens, A., Laing, R., Ravikumar, S., Butler, V., Woods, D. J. und Gilleard, J. S. (2010). Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites, *Biochemical Journal* **432**: 505–514.
- Lam, Y. Y., Peterson, C. M. und Ravussin, E. (2013). Resveratrol vs. calorie restriction: Data from rodents to humans, *Experimental Gerontology* **48**(10): 1018–1024.
- Leung, M. C. K., Goldstone, J. V., Boyd, W. A., Freedman, J. H. und Meyer, J. N. (2010). *Caenorhabditis elegans* generates biologically relevant levels of genotoxic metabolites from Aflatoxin B1 but not Benzo[a]pyrene in vivo, *Toxicological Sciences* **118**(2): 444–453.

- Lindblom, T. H. und Dodd, A. K. (2006). Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* **305A**(9): 720–730.
- Mackenzie, P. I., Bock, K. W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S.-i., Iyanagi, T., Miners, J. O., Owens, I. S. und Nebert, D. W. (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily, *Pharmacogenetics and genomics* **15**(10): 677–685.
- MacKenzie, P. I., Rogers, A., Elliot, D. J., Chau, N., Hulin, J.-A., Miners, J. O. und Meech, R. (2011). The novel UDP glycosyltransferase 3A2: Cloning, catalytic properties, and tissue distribution, *Molecular Pharmacology* **79**(3): 472–478.
- Menzel, R., Rödel, M., Kulas, J. und Steinberg, C. E. W. (2005). CYP35: Xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **438**(1): 93–102.
- Miksits, M., Maier-Salamon, A., Aust, S., Thalhammer, T., Reznicek, G., Kunert, O., Haslinger, E., Szekeres, T. und Jaeger, W. (2005). Sulfation of resveratrol in human liver: evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1, *Xenobiotica* **35**(12): 1101–1119.
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M. und Korach, K. S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells, *Toxicological Sciences* **80**(1): 14–25.
- Murphy, J. C., McDaniel, J. L., Mora, K., Villareal, D. T., Fontana, L. und Weiss, E. P. (2011). Preferential reductions in intermuscular and visceral adipose tissue with exercise-induced weight loss compared with calorie restriction, *Journal of Applied Physiology* **112**(1): 79–85.
- Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M. und Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome p450 (cyp) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants, *Pharmacogenetics and Genomics* **14**(1): 1–18.
- Ouzzine, M., Barré, L., Netter, P., Magdalou, J. und Fournel-Gigleux, S. (2003). The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation, *Drug metabolism reviews* **35**(4): 287–303.
- Patel, K. R., Andreadi, C., Britton, R. G., Horner-Glister, E., Karmokar, A., Sale, S., Brown, V. A., Brenner, D. E., Singh, R., Steward, W. P., Gescher, A. J. und Brown, K. (2013). Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence, *Science translational medicine* **5**(205): 205ra133–205ra133.
- Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J., Britton, R. G., Hemingway, D., Miller, A. S., West, K. P., Booth, T. D., Perloff, M., Crowell, J. A. et al. (2010). Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients, *Cancer research* **70**(19): 7392–7399.
- Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W. R., Kamara, D., Minor, R. K., Perez, E. et al. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span, *Cell metabolism* **8**(2): 157–168.
- Piotrowska, H., Kucinska, M. und Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol, *Mutation Research* **750**(1): 60–82.
- Pugazhendhi, D., Watson, K. A., Mills, S., Botting, N., Pope, G. S. und Darbre, P. D. (2008). Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells, *Journal of Endocrinology* **197**(3): 503–515.

- Redman, L. M., Martin, C. K., Williamson, D. A. und Ravussin, E. (2008). Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes, *Physiology & Behavior* **94**(5): 643–648.
- Ruotolo, R., Calani, L., Fietta, E., Brighenti, F., Crozier, A., Meda, C., Maggi, A., Ottonello, S. und Del Rio, D. (2012). Anti-estrogenic activity of a human resveratrol metabolite, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **23**(11): 1086–1092.
- Schäfer, P., Müller, M., Krüger, A., Steinberg, C. E. W. und Menzel, R. (2009). Cytochrome p450-dependent metabolism of {PCB52} in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **488**(1): 60–68.
- Shaye, D. D. und Greenwald, I. (2011). Ortholist: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs, *PLoS one* **6**(5): e20085–e20085.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons., *Drug metabolism and pharmacokinetics* **21**(4): 257–276.
- Siemann, E. H. und Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine, *American Journal of Enology and Viticulture* **43**(1): 49–52.
- Soukup, S. T., Spanier, B., Grünz, G., Bunzel, D., Daniel, H. und Kulling, S. E. (2012). Formation of phosphoglycosides in *Caenorhabditis elegans*: A novel biotransformation pathway, *PLoS ONE* **7**(10): e46914.
- Spann, N., Goedkoop, W. und Traunspurger, W. (2015). Phenanthrene bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Environmental Science & Technology* **49**(3): 1842–1850.
- Stupp, G. S., von Reuss, S. H., Izrayelit, Y., Ajredini, R., Schroeder, F. C. und Edison, A. S. (2012). Chemical detoxification of small molecules by *C. elegans*, *ACS Chemical Biology* .
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gómez-Orte, E., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C. und Dueñas, M. (2011). Effects of o-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*, *Food Funct.* **2**(8): 445–456.
- Timmers, S., Auwerx, J. und Schrauwen, P. (2012). The journey of resveratrol from yeast to human, *Aging (Albany NY)* **4**(3): 146.
- Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., García-Almagro, F. J., Avilés-Plaza, F., Parra, S., Yáñez-Gascón, M. J., Ruiz-Ros, J. A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A. et al. (2012). Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: A triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial, *Molecular nutrition & food research* **56**(5): 810–821.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. und Cellarino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate, *Current Biology* **16**(3): 296–300.
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1215**(1): 9–15.
- Wang, C., Wheeler, C. T., Alberico, T., Sun, X., Seeberger, J., Laslo, M., Spangler, E., Kern, B., de Cabo, R. und Zou, S. (2013). The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*, *Age* **35**(1): 69–81.

- Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M. und Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans, *Nature* **430**(7000): 686–689.
- Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J. W., Lee, Y. S., Hirschelman, W. H., Pezzuto, J. M., Mehta, R. G. und van Breemen, R. B. (2002). Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol, *Pharmaceutical research* **19**(12): 1907–1914.
- Zarse, K., Schmeisser, S., Birringer, M., Falk, E., Schmoll, D. und Ristow, M. (2010). Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*, *Hormone and Metabolic Research* **42**(12): 837–839.

Anhang

A MS-Parameter

Tabelle A.1: Optimierte Quellen- und Fragmentierungsparameter des Flugzeit-Massenspektrometers im NI-Modus. CE, collision energy; CES, collision energy spread; CUR, curtain gas; DP, declustering potential; GS1, nebuliser gas; GS2, heater gas; ISVF, ion spray voltage floating; TEM, heater temperature.

Quellenparameter		Parameter	Wert
		GS1 [psi]	60
		GS2 [psi]	70
		CUR [psi]	35
		TEM [°C]	650
		ISVF [V]	-4500
TOF-MS (High Resolution)		Parameter	Wert
		DP [V]	-110
		CE [V]	-10
		accumulation time [ms]	250
TOF-MS ² (High Resolution, accumulation time 100 ms)			
Substanz	<i>m/z</i>	Parameter	Wert
<i>trans</i> -Resveratrol	227, 1	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Resveratrol-Glykoside	389, 1	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Resveratrol-Phospho-Glykoside	469, 1	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Resveratrol-Diglykoside	551, 2	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Resveratrol-Phospho-Diglykoside	631, 1	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Resveratrol-Diphospho-Diglykoside	711, 1	DP [V]	-110
		CE [V]	-45
		CES [V]	±25
Quercetin	301, 1	DP [V]	-150
		CE [V]	-50
		CES [V]	±30

A MS-Parameter

Quercetin-Glykoside	463,1	DP [V]	-150
		CE [V]	-50
		CES [V]	±30
Quercetin-Phospho-Glykoside	543,1	DP [V]	-150
		CE [V]	-50
		CES [V]	±30
Quercetin-Diglykoside	625,2	DP [V]	-150
		CE [V]	-50
		CES [V]	±30
Quercetin-Phospho-Diglykoside	705,1	DP [V]	-150
		CE [V]	-50
		CES [V]	±30

Tabelle A.2: Optimierte Quellen- und Fragmentierungsparameter des Flugzeit-Massenspektrometers im PI-Modus zur Messung von *p*-Aminobenzoessäure und dessen Metaboliten. CE, collision energy; CES, collision energy spread; CUR, curtain gas; DP, declustering potential; GS1, nebuliser gas; GS2, heater gas; ISVF, ion spray voltage floating; TEM, heater temperature.

Quellenparameter	Parameter	Wert	
	GS1 [psi]	60	
	GS2 [psi]	70	
	CUR [psi]	40	
	TEM [°C]	650	
	ISVF [V]	+5200	
TOF-MS (High Resolution)	Parameter	Wert	
	DP [V]	+55	
	CE [V]	+11	
	accumulation time [ms]	250	
TOF-MS ² (High Resolution, accumulation time 100 ms)			
Substanz	<i>m/z</i>	Parameter	Wert
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	138,1	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25
<i>p</i> -Aminobenzoessäure-Phosphate	218,0	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25
<i>p</i> -Aminobenzoessäure-Glykoside	300,1	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25
<i>p</i> -Aminobenzoessäure-Phospho-Glykoside	380,1	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25
<i>p</i> -Aminobenzoessäure-Diglykoside	462,2	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25
<i>p</i> -Aminobenzoessäure-Phospho-Diglykoside	542,1	DP [V]	+55
		CE [V]	+40
		CES [V]	±25

Tabelle A.3: Optimierte Quellen- und Fragmentierungsparameter des Flugzeit-Massenspektrometers im PI-Modus zur Messung von Flavon und dessen Metaboliten. CE, collision energy; CES, collision energy spread; CUR, curtain gas; DP, declustering potential; GS1, nebuliser gas; GS2, heater gas; ISVF, ion spray voltage floating; TEM, heater temperature.

Quellenparameter		Parameter	Wert
		GS1 [psi]	60
		GS2 [psi]	70
		CUR [psi]	35
		TEM [°C]	650
		ISVF [V]	+4500
TOF-MS (High Resolution)		Parameter	Wert
		DP [V]	+110
		CE [V]	+10
		accumulation time [ms]	250
TOF-MS ² (High Resolution, accumulation time 100 ms)			
Substanz	<i>m/z</i>	Parameter	Wert
Flavon	223,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Hydroxyflavone	239,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Dihydroxyflavone	255,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Hydroxyflavon-Glykoside	401,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Hydroxyflavon-Diglykoside	563,2	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Hydroxyflavon-Phospho-Glykoside	481,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Hydroxyflavon-Phospho-Diglykoside	643,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30
Dihydroxyflavon-Phospho-Diglykoside	659,1	DP [V]	+150
		CE [V]	+40
		CES [V]	±30

Tabelle A.4: Fragmentierungs-Übergänge (MRM) zur Quantifizierung von Resveratrol-Metaboliten im QqLIT-Massenspektrometer. GS1, nebuliser gas; GS2, heater gas; CUR, curtain gas; TEM, heater temperature; ISVF, ion spray voltage floating; EP, entrance potential; DP, declustering potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

Quellenparameter					
	GS1 [psi]	70		TEM [°C]	600
	GS2 [psi]	70		ISVF [V]	-4500
	CUR [psi]	50		EP [V]	-10
Fragmentierungsparameter					
Substanz	Q ₁ Masse [Da]	Q ₃ Masse [Da]	RT [min]	Parameter	Wert [V]
<i>trans</i> -Resveratrol 1	227,0	185,0	10,3	DP	-98
				CE	-26
				CXP	-10
<i>trans</i> -Resveratrol 2	227,0	143,0	10,3	DP	-98
				CE	-34
				CXP	-6
<i>cis</i> -Resveratrol 1	227,0	185,0	11,5	DP	-90
				CE	-25
				CXP	-5
<i>cis</i> -Resveratrol 2	227,0	143,0	11,5	DP	-90
				CE	-35
				CXP	-7
Dihydroresveratrol 1	229,0	123,0	10,5	DP	-83
				CE	-22
				CXP	-7
Dihydroresveratrol 2	229,0	81,0	10,5	DP	-83
				CE	-36
				CXP	-10
Piceatannol 1	242,9	159,0	8,9	DP	-110
				CE	-35
				CXP	-5
Piceatannol 2	242,9	201,0	8,9	DP	-110
				CE	-28
				CXP	-6
Lunularin 1	213,1	107,0	13,7	DP	-90
				CE	-22
				CXP	-6
Lunularin 2	213,1	106,0	13,7	DP	-90
				CE	-22
				CXP	-6
3,3'-Dihydroxy- bibenzyl	213,1	106,0	14,0	DP	-90
				CE	-22
				CXP	-6
<i>trans</i> -Resveratrol- 3-O-glucuronid 1	403,1	112,9	7,2	DP	-85
				CE	-22
				CXP	-12

A MS-Parameter

<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-glucuronid 2	403,1	227,0	7,2	DP	-85
				CE	-34
				CXP	-7
<i>trans</i> -Resveratrol-4'-O-glucuronid 1	403,1	112,9	6,3	DP	-85
				CE	-20
				CXP	-11
<i>trans</i> -Resveratrol-4'-O-glucuronid 2	403,1	227,0	6,3	DP	-85
				CE	-34
				CXP	-10
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-sulfat 1	307,1	226,9	8,8	DP	-85
				CE	-28
				CXP	-7
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-sulfat 2	307,1	184,9	8,8	DP	-85
				CE	-42
				CXP	-15
¹³ C ₆ - <i>trans</i> -Resveratrol 1	233,0	191,0	10,3	DP	-94
				CE	-26
				CXP	-11
¹³ C ₆ - <i>trans</i> -Resveratrol 2	233,0	149,0	10,3	DP	-94
				CE	-36
				CXP	-8
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-glucuronid-D ₄ 1	407,1	112,9	7,2	DP	-79
				CE	-22
				CXP	-11
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-glucuronid-D ₄ 2	407,1	231,0	7,2	DP	-79
				CE	-35
				CXP	-10
<i>trans</i> -Resveratrol-4'-O-glucuronid-D ₄ 1	407,2	113,0	6,3	DP	-84
				CE	-21
				CXP	-11
<i>trans</i> -Resveratrol-4'-O-glucuronid-D ₄ 2	407,2	231,0	6,3	DP	-84
				CE	-35
				CXP	-5
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-sulfat-D ₄ 1	311,2	231,1	8,8	DP	-80
				CE	-30
				CXP	-10
<i>trans</i> -Resveratrol-3-O-sulfat-D ₄ 2	311,2	188,9	8,8	DP	-80
				CE	-42
				CXP	-11

B Ergänzende Grafiken und Tabellen

B.1 Validierungsergebnisse

Tabelle B.1: Präzision und Richtigkeit der Probenaufarbeitung und Analyse von humanen Urinproben, die enzymatisch hydrolysiert wurden („verdaut“). $c = 400 \text{ nM}$, $n = 6$. Vorextrakt, Zugabe des Standards vor Hydrolyse und Extraktion; tr-RES, *trans*-Resveratrol; cis-RES, *cis*-Resveratrol; PIC, Piceatannol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Probe	Konzentration [nM]				
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN
Vorextrakt-1_verdaut	356,3	346,7	337,7	358,5	365,0
Vorextrakt-2_verdaut	379,1	398,6	365,2	397,0	414,2
Vorextrakt-3_verdaut	429,6	426,7	412,0	417,5	439,4
Vorextrakt-4_verdaut	427,9	436,2	410,3	420,4	445,1
Vorextrakt-5_verdaut	390,7	431,1	335,9	403,3	411,2
Vorextrakt-6_verdaut	340,7	358,6	325,0	348,2	367,6
Mittelwert	387,4	399,7	364,4	390,8	407,1
SD	36,5	38,9	38,6	30,5	34,3
VK (%)	9,4	9,7	10,6	7,8	8,4
Richtigkeit (%)	97	100	91	98	102

Tabelle B.2: Präzision und Richtigkeit der Probenaufarbeitung und Analyse von humanen Plasmaproben, die enzymatisch hydrolysiert wurden („verdaut“). $c = 400 \text{ nM}$, $n = 6$. Vorextrakt, Zugabe des Standards vor Hydrolyse und Extraktion; tr-RES, *trans*-Resveratrol; cis-RES, *cis*-Resveratrol; PIC, Piceatannol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Probe	Konzentration [nM]				
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN
Vorextrakt-1_verdaut	408,4	402,8	405,7	390,1	418,1
Vorextrakt-2_verdaut	376,7	385,3	369,8	372,4	391,9
Vorextrakt-3_verdaut	384,9	401,9	388,6	387,7	403,8
Vorextrakt-4_verdaut	412,4	419,8	398,6	400,6	430,0
Vorextrakt-5_verdaut	415,2	424,3	398,3	402,5	445,7
Vorextrakt-6_verdaut	418,2	442,0	407,3	416,5	449,9
Mittelwert	402,6	412,7	394,7	395,0	423,2
SD	17,4	20,1	13,9	15,1	23,0
VK (%)	4,3	4,9	3,5	3,8	5,4
Richtigkeit (%)	101	103	99	99	106

B Ergänzende Grafiken und Tabellen

Tabelle B.3: Wiederfindung, Matrixeffekt und Extraktionseffizienz der Probenaufarbeitung (enzymatische Hydrolyse, Extraktion) und Analyse von humanen Urinproben. Kursive Werte in grau wurden als Ausreißer von der Berechnung ausgeschlossen. $c = 400 \text{ nM}$, $n = 6$. Vorextrakt/Nachextrakt, Zugabe des Standards vor/nach Hydrolyse und Extraktion; Standard, Messung des Standards in reinem Lösungsmittel; tr-RES, *trans*-Resveratrol; cis-RES, *cis*-Resveratrol; PIC, Piceatannol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin; 13C6-RES, *trans*- $^{13}\text{C}_6$ -Resveratrol; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Vorextrakt 1	186588,2	1426157,0	422588,4	429900,9	94623,3	81314,9
Vorextrakt 2	187247,4	1547358,9	431840,1	445227,3	100722,2	76911,0
Vorextrakt 3	203178,0	1592921,3	468439,2	448366,6	102484,5	74041,2
Vorextrakt 4	201127,9	1617377,4	463540,3	448344,2	103088,9	73573,6
Vorextrakt 5	163146,4	1415097,7	336643,5	382277,9	84686,4	65115,5
Vorextrakt 6	157274,5	1296987,4	357917,8	368564,1	83794,0	71533,1
Mittelwert	183093,7	1482650,0	413494,9	420446,8	94899,9	73748,3
SD	19092,4	123874,0	54658,2	35804,8	8788,8	5418,6
VK (%)	10,4	8,4	13,2	8,5	9,3	7,3

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Nachextrakt 1	209003,2	1803561,0	688161,7	481038,7	110066,2	93478,2
Nachextrakt 2	200083,8	1762768,5	668860,9	465579,2	108068,6	83480,2
Nachextrakt 3	208776,9	1726448,3	671949,5	468508,9	106483,6	91515,5
Nachextrakt 4	197451,8	1727051,1	658319,8	463241,5	103401,1	91461,9
Nachextrakt 5	174191,9	1592034,7	571234,4	419328,8	98282,1	80169,0
Nachextrakt 6	192398,0	1724181,5	649914,0	464099,4	103846,6	84073,1
Mittelwert	196984,2	1722674,2	651406,7	460299,4	105024,7	87363,0
SD	12914,1	71067,0	41364,7	21104,9	4154,4	5460,6
VK (%)	6,6	4,1	6,4	4,6	4,0	6,3

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Standard 1	242028,4	2084821,5	923759,0	494044,0	118931,8	116416,2
Standard 2	219753,0	1942464,1	836320,8	464047,3	112106,7	107065,9
Standard 3	237253,8	2101888,5	926952,0	498922,4	120025,2	108208,8
Standard 4	<i>1015,7</i>	<i>1422,9</i>	<i>521,1</i>	<i>1992,0</i>	<i>4466,1</i>	87975,7
Standard 5	194152,7	1825381,2	772795,3	421471,9	100048,3	N/A
Standard 6	221700,8	1987058,4	874548,9	462918,6	116389,1	N/A
Mittelwert	222977,7	1988322,8	866875,2	468280,8	113500,2	104916,7
SD	18772,7	112765,0	64591,9	30985,5	8113,6	12037,3
VK (%)	8,4	5,7	7,5	6,6	7,1	11,5

Parameter	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Wiederfindung (%)	92,9	86,1	63,5	91,3	90,4	84,4
Matrixeffekt (%)	88,3	86,6	75,1	98,3	92,5	83,3
Extraktionseffizienz (%)	82,1	74,6	47,7	89,8	83,6	70,3

Tabelle B.4: Wiederfindung, Matrixeffekt und Extraktionseffizienz der Probenaufarbeitung (enzymatische Hydrolyse, Extraktion) und Analyse von humanen Plasmaproben. Kursive Werte in grau wurden als Ausreißer von der Berechnung ausgeschlossen. $c = 400 \text{ nM}$, $n = 6$. Vorextrakt/Nachextrakt, Zugabe des Standards vor/nach Hydrolyse und Extraktion; Standard, Messung des Standards in reinem Lösungsmittel; tr-RES, *trans*-Resveratrol; cis-RES, *cis*-Resveratrol; PIC, Piceatannol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin; 13C6-RES, *trans*-¹³C₆-Resveratrol; SD, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient.

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Vorextrakt 1	248355,8	1836782,4	696836,7	466869,8	114403,9	105433,4
Vorextrakt 2	218024,2	1670175,7	603911,7	423809,3	102333,9	100214,4
Vorextrakt 3	216939,6	1697010,4	618126,8	429731,8	102513,4	97626,6
Vorextrakt 4	226994,7	1732865,5	619865,6	433951,2	106336,6	95448,1
Vorextrakt 5	229538,5	1759033,6	622019,5	437897,0	110450,7	95859,7
Vorextrakt 6	222759,7	1766044,6	612965,6	436613,8	107391,5	92382,8
Mittelwert	227102,1	1743652,0	628954,3	438145,5	107238,3	97827,5
SD	11508,3	58483,9	33878,4	14976,0	4666,5	4533,6
VK (%)	5,1	3,4	5,4	3,4	4,4	4,6

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Nachextrakt 1	255164,0	1948490,5	882471,9	473031,7	115053,3	121668,9
Nachextrakt 2	224942,1	1905300,9	791222,3	458588,8	111657,4	102996,7
Nachextrakt 3	225705,8	1841225,6	788382,0	446499,7	109175,5	107893,5
Nachextrakt 4	220660,9	1764116,0	755575,6	441898,7	107006,0	105564,5
Nachextrakt 5	220755,2	1841242,0	788864,6	449907,5	109057,3	103981,2
Nachextrakt 6	220849,5	1848609,2	764536,9	445497,1	108743,4	100419,9
Mittelwert	228012,9	1858164,0	795175,6	452570,6	110115,5	107087,4
SD	13490,5	63072,0	45230,8	11513,0	2839,5	7568,7
VK (%)	5,9	3,4	5,7	2,5	2,6	7,1

Probe	Peakflächen					
	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Standard 1	258598,2	2156433,4	946412,2	509003,9	119149,0	125228,8
Standard 2	231189,6	1998945,3	855794,6	475021,9	108453,4	118555,7
Standard 3	261253,7	2174805,6	946362,2	502373,4	125242,9	111530,1
Standard 4	<i>1014,4</i>	<i>1512,3</i>	<i>795,6</i>	<i>2716,0</i>	<i>6197,8</i>	130378,6
Standard 5	220568,4	1963394,9	840989,3	457202,7	106272,4	N/A
Standard 6	244509,4	2022517,6	884291,5	485860,7	117440,3	N/A
Mittelwert	243223,9	2063219,4	894770,0	485892,5	115311,6	121423,3
SD	17472,8	96037,8	49623,4	20898,8	7852,2	8180,8
VK (%)	7,2	4,7	5,5	4,3	6,8	6,7

Parameter	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	13C6-RES
Wiederfindung (%)	99,6	93,8	79,1	96,8	97,4	91,4
Matrixeffekt (%)	93,7	90,1	88,9	93,1	95,5	88,2
Extraktionseffizienz (%)	93,4	84,5	70,3	90,2	93,0	80,6

Tabelle B.5: Wiederfindung, Matrixeffekt und Extraktionseffizienz der Probenaufarbeitung und Analyse von Plasmaproben aus Mäusen und Schweinen. $c = 100 \text{ nM}$, $n = 2$. Vorextrakt/Nachextrakt, Zugabe des Standards vor/nach Extraktion; Standard, Messung des Standards in reinem Lösungsmittel; 13C6-RES, *trans*-¹³C₆-Resveratrol; tr-RES, *trans*-Resveratrol; cis-RES, *cis*-Resveratrol; PIC, Picotannol; DHR, Dihydroresveratrol; LUN, Lunularin; RES-3-GlcA(-D4), Resveratrol-3-O-Glucuronid (4 × deuteriert); RES-4'-GlcA(-D4), Resveratrol-4'-O-Glucuronid (4 × deuteriert); RES-3-Sulfat(-D4), Resveratrol-3-O-Sulfat (4 × deuteriert).

Probe	13C6-RES	tr-RES	cis-RES	PIC	DHR	LUN	RES-3-GlcA-D4	RES-3-GlcA	RES-4'-GlcA-D4	RES-4'-GlcA	RES-3-Sulfat-D4	RES-3-Sulfat
Maus Vorextrakt 1	20244	133402	152904	1808	189669	47167	81260	55372	154505	63051	161725	385272
Maus Nachextrakt 1	82222	149683	1136686	719904	318480	69055	182126	123903	331178	145522	371373	1021124
Maus Vorextrakt 2	21494	133996	200079	2186	199699	50910	82427	57843	153925	63139	167792	410004
Maus Nachextrakt 2	80342	151446	1137492	678566	314025	68692	185798	124996	331336	139925	372113	1026056
Schwein Vorextrakt 1	25855	74204	451257	275	180339	49855	102325	63448	207760	79965	183767	433738
Schwein Nachextrakt 1	82467	154393	1054189	448309	294643	72613	186195	136153	324044	145121	378169	1035638
Schwein Vorextrakt 2	15711	62111	348988	194	184898	52295	86105	58969	172338	72336	158168	395039
Schwein Nachextrakt 2	77320	137965	944431	278511	279224	70976	189637	129805	331606	142384	382549	1035771
Standard 100 nM 1	72314	138981	1015118	667109	288939	63923	143018	109437	261181	123222	293036	887915
Standard 100 nM 2	95836	158652	1041841	661790	291053	63082	172343	111666	303186	125974	337140	901093
Wiederfindung Maus	26%	89%	16%	0%	62%	71%	44%	45%	47%	44%	44%	39%
Extraktionseffizienz Maus	25%	90%	17%	0%	67%	77%	52%	51%	55%	51%	52%	44%
Matrixeffekt Maus	97%	101%	111%	105%	109%	108%	117%	113%	117%	115%	118%	114%
Wiederfindung Schwein	27%	46%	39%	0%	63%	75%	57%	50%	65%	57%	51%	43%
Extraktionseffizienz Schwein	25%	46%	39%	0%	63%	80%	60%	55%	67%	61%	54%	46%
Matrixeffekt Schwein	95%	98%	97%	55%	99%	113%	119%	120%	116%	115%	121%	116%

B.2 Identifikation eines Lunularin-Isomers

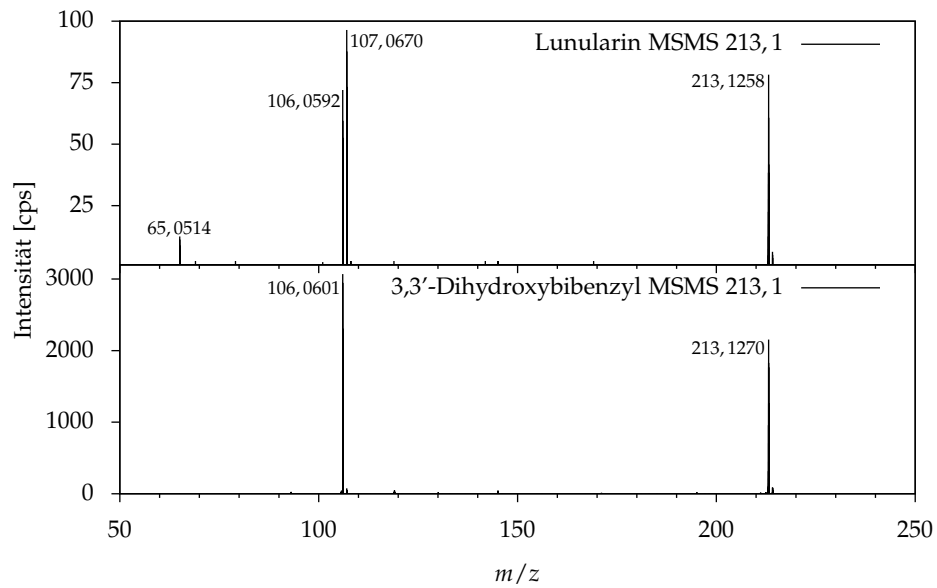


Abbildung B.1: Fragmentspektren im NI-Modus von Lunularin (oben) und 3,3'-Dihydroxybibenzyl (unten), aufgenommen im High-Resolution-Modus mit m/z 213,1 als Vorläuferion. Zur Bildung der Ionen mit m/z 106 bzw. 107 siehe Abbildung B.2.

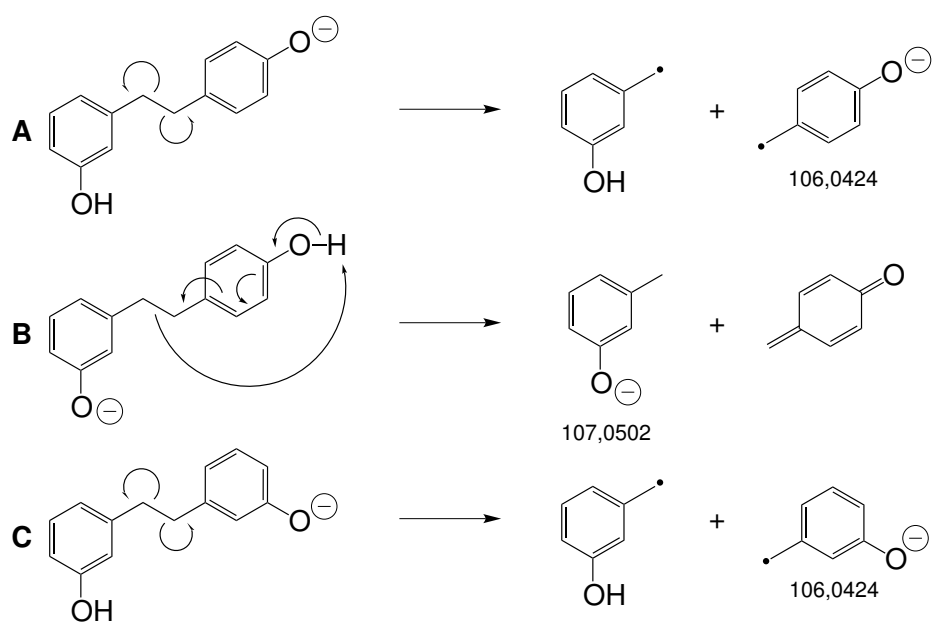


Abbildung B.2: Mögliche Fragmentierungswege von Lunularin (A, B) und 3,3'-Dihydroxybibenzyl (C). Nur bei Lunularin ist die heterolytische Spaltung der Ethylenbrücke zur Bildung eines Ions mit m/z 107,0502 möglich (B), da die Hydroxylgruppe in 4'-Position die Bildung von 4-Methylcyclohexa-2,5-dienon erlaubt. Bei 3,3'-DHB ist die homolytische Spaltung unter Bildung stabiler Benzylradikale bevorzugt.

B.3 UV-Chromatogramme

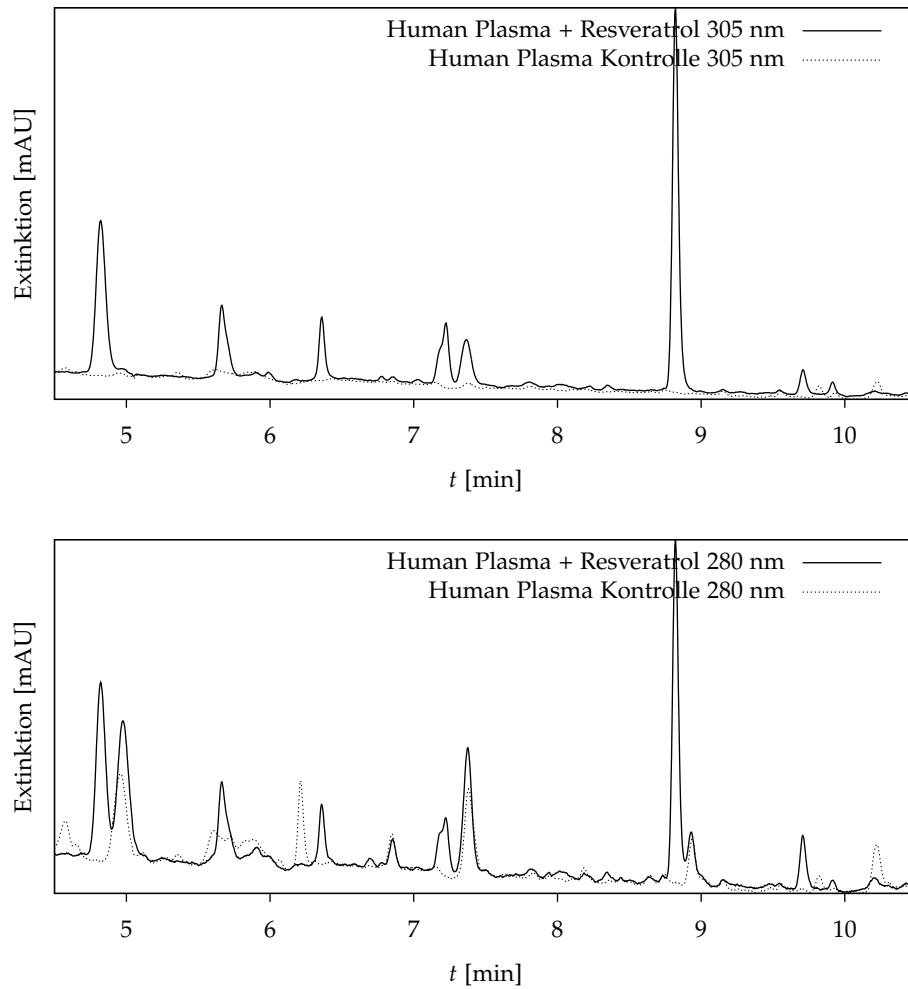


Abbildung B.3: Zur Semi-Quantifizierung verwendete UV-Chromatogramme ($\lambda = 305$ nm: Resveratrol-Metaboliten, $\lambda = 280$ nm: Dihydroresveratrol-Metaboliten) aus humanem Plasma.

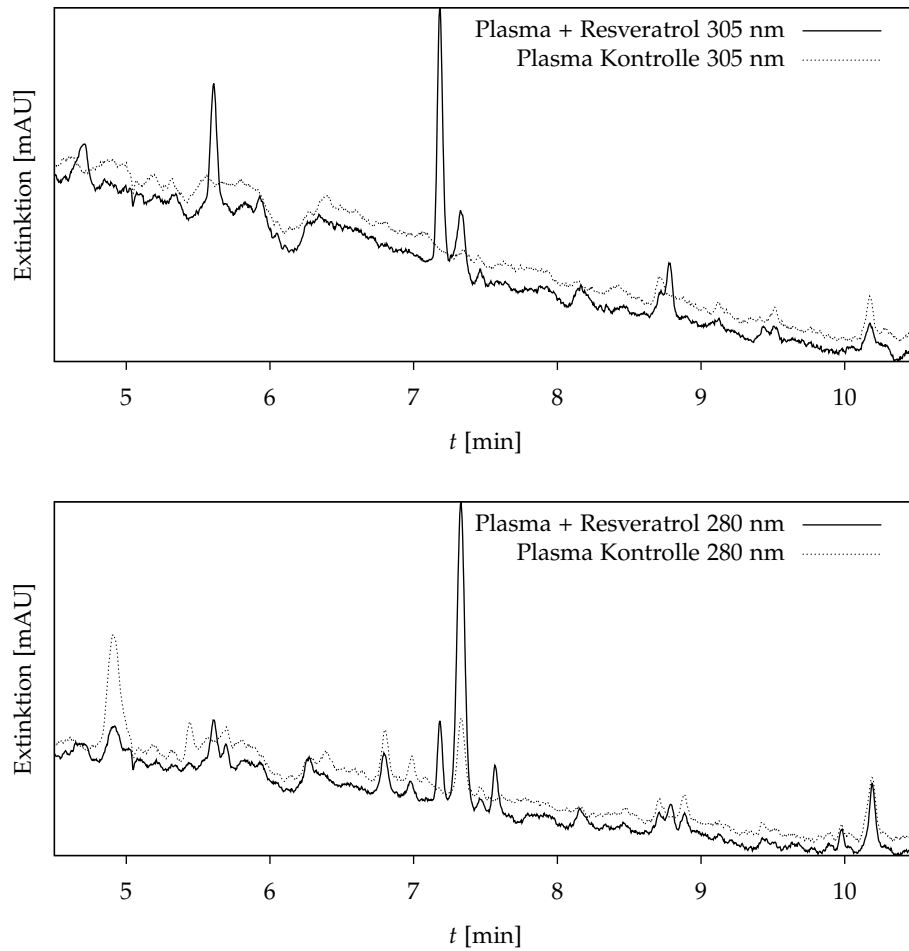
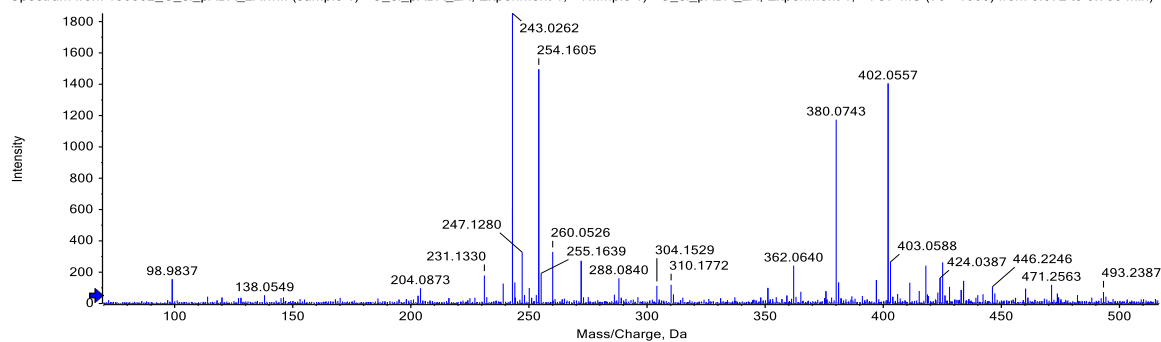


Abbildung B.4: Zur Semi-Quantifizierung verwendete UV-Chromatogramme ($\lambda = 305$ nm: Resveratrol-Metaboliten, $\lambda = 280$ nm: Dihydroresveratrol-Metaboliten) aus Maus-Plasma.

C Massenspektren

C.1 Metaboliten von *p*-Aminobenzoesäure in *C. elegans*

Spectrum from 150302_C_el_pABA_2A.wiff (sample 1) - C_el_pABA_2A, Experiment 1, +T...mple 1) - C_el_pABA_2A, Experiment 1, +TOF MS (70 - 1000) from 6.672 to 6.700 min)



Spectrum from 150302_C_el_pABA_2A.wiff (sample 1) - C_el_pAB...Experiment 6, +TOF MS² of 380.1 (50 - 500) from 6.632 min)

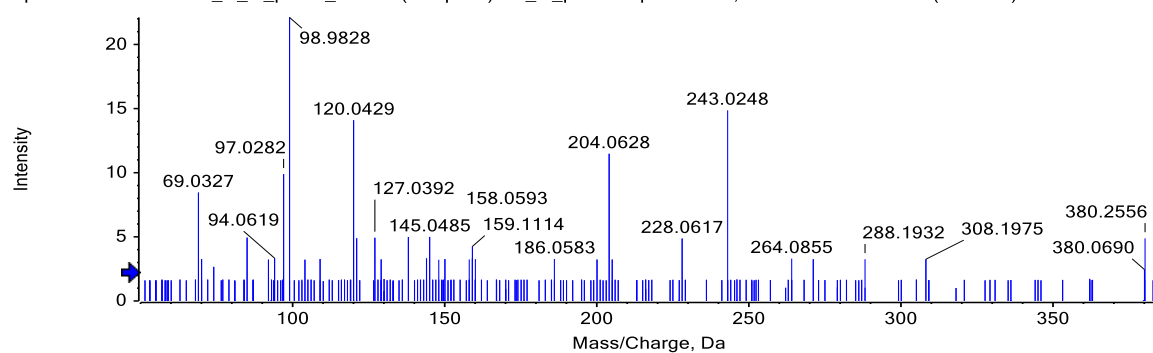


Abbildung C.1: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines *p*-Aminobenzoesäure-Phosphoglykosids (m/z 380, 1).

C Massenspektren

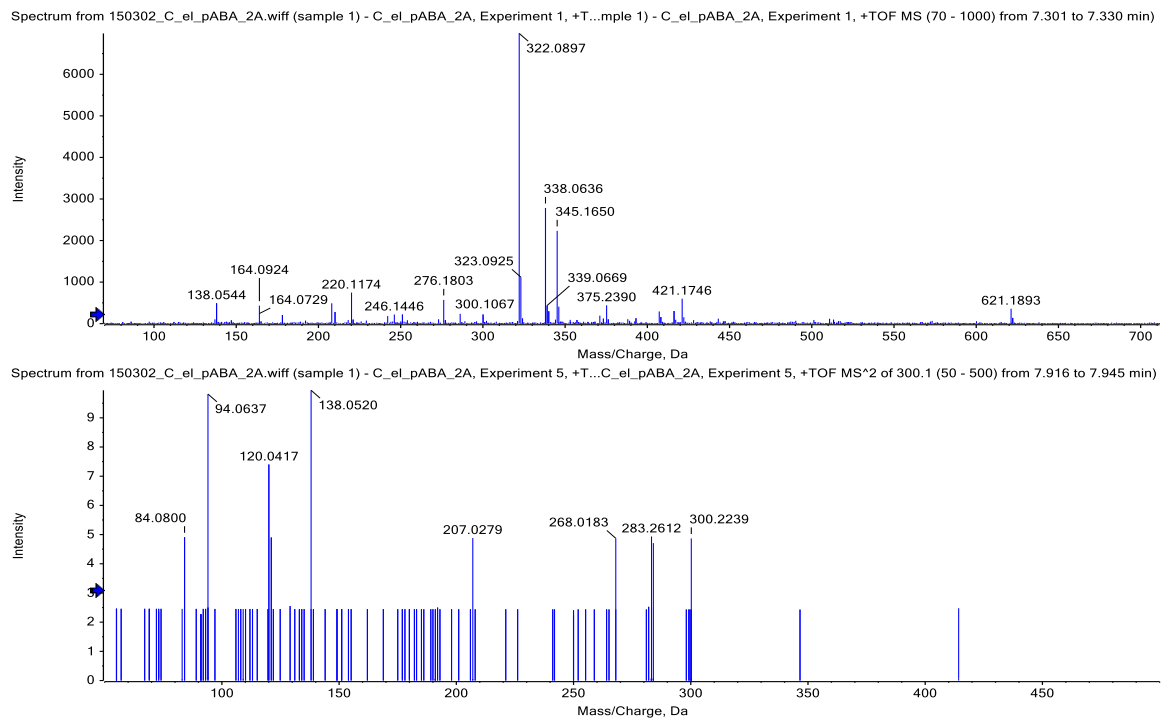


Abbildung C.2: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines *p*-Aminobenzoensäure-Glykosids (m/z 300, 1).

C.1 Metaboliten von *p*-Aminobenzoesäure in *C. elegans*

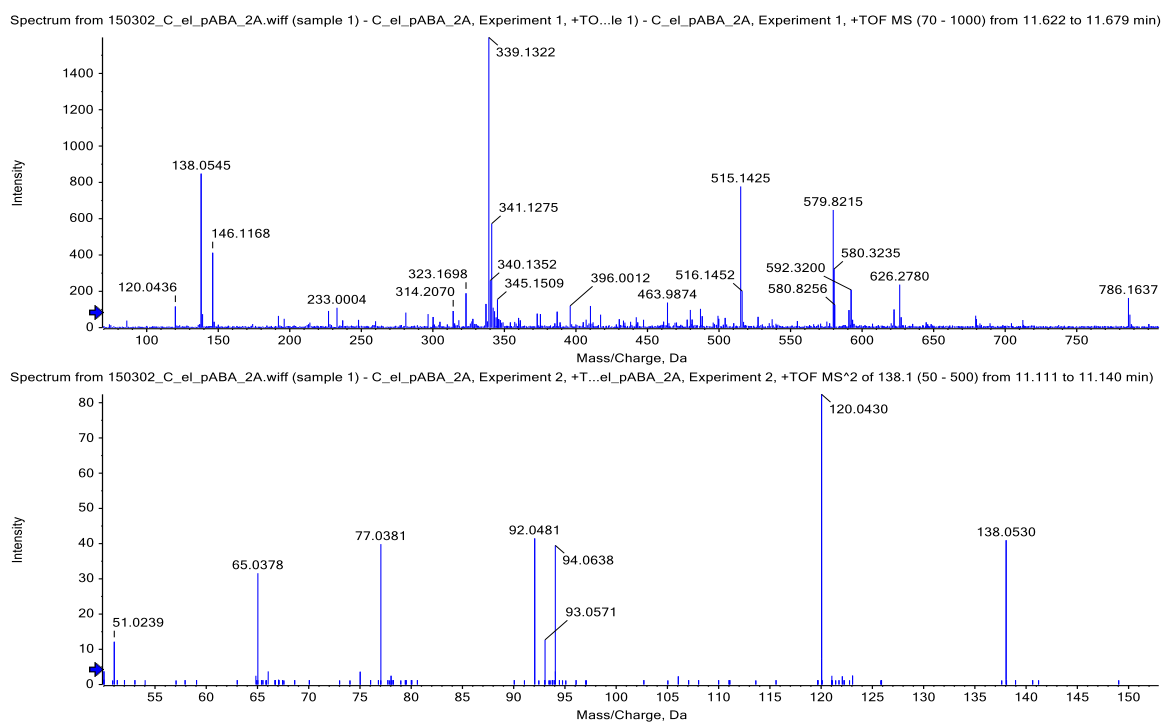
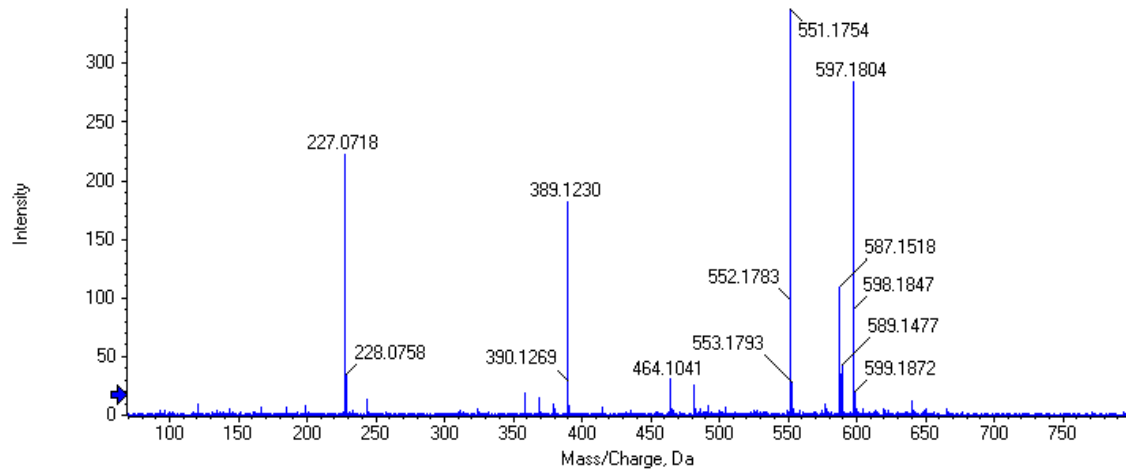


Abbildung C.3: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von *p*-Aminobenzoesäure (m/z 138, 1).

C.2 Resveratrol-Metaboliten in *C. elegans*-Homogenat

Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...lc-1, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 7.902 to 7.972 min)



Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...riment 4, -TOF MS² of 551.2 (50 - 600) from 7.908 to 7.960 min)

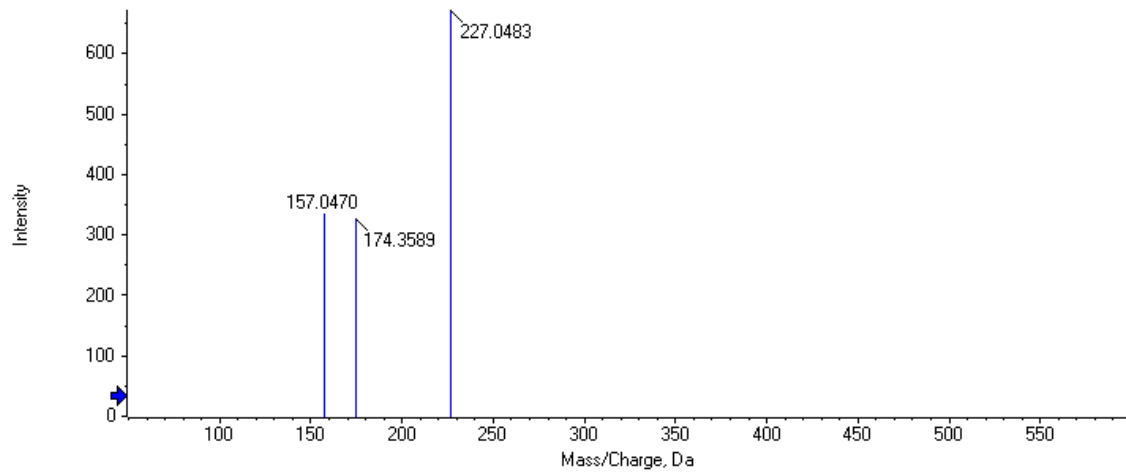
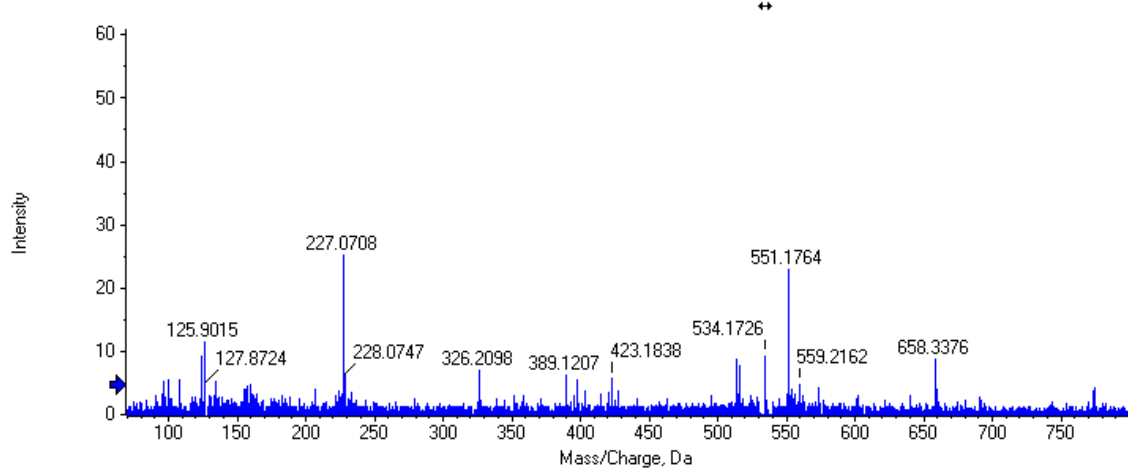


Abbildung C.4: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Diglucosids (m/z 551,2).

C.2 Resveratrol-Metaboliten in *C. elegans*-Homogenat

Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...-1, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 10.621 to 10.674 min)



Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...ent 4, -TOF MS² of 551.2 (50 - 600) from 10.610 to 10.680 min)

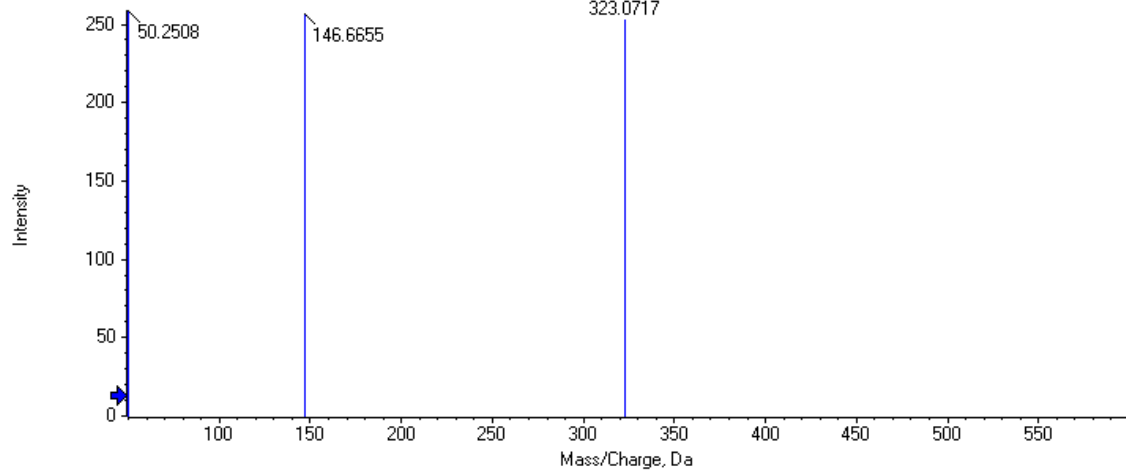
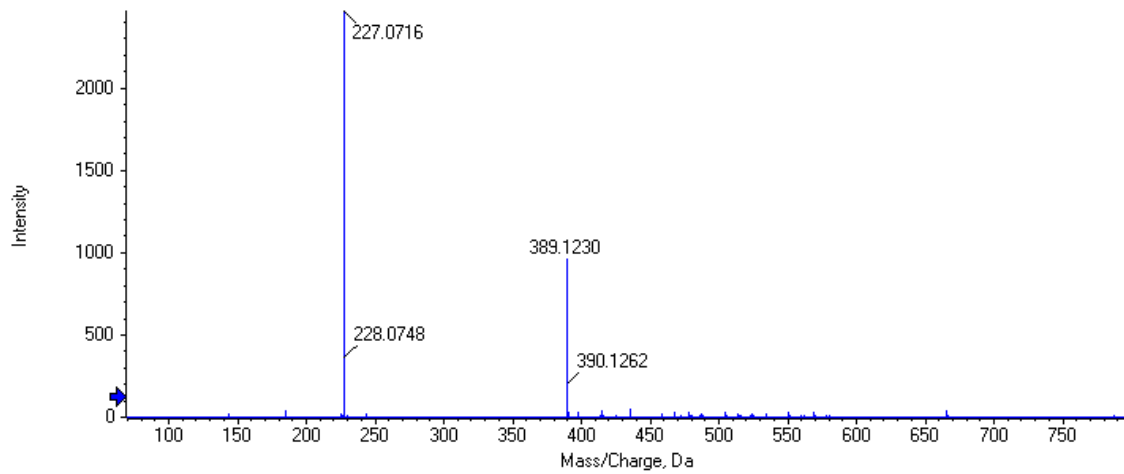


Abbildung C.5: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Disaccharids (m/z 551,2).

C Massenspektren

Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...-1, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 14.004 to 14.056 min)



Spectrum from 120926_C_elegans_Homogenat_Res_UDP-Glc-1.wiff (sam...ent 2, -TOF MS² of 389.1 (50 - 500) from 14.006 to 14.058 min)

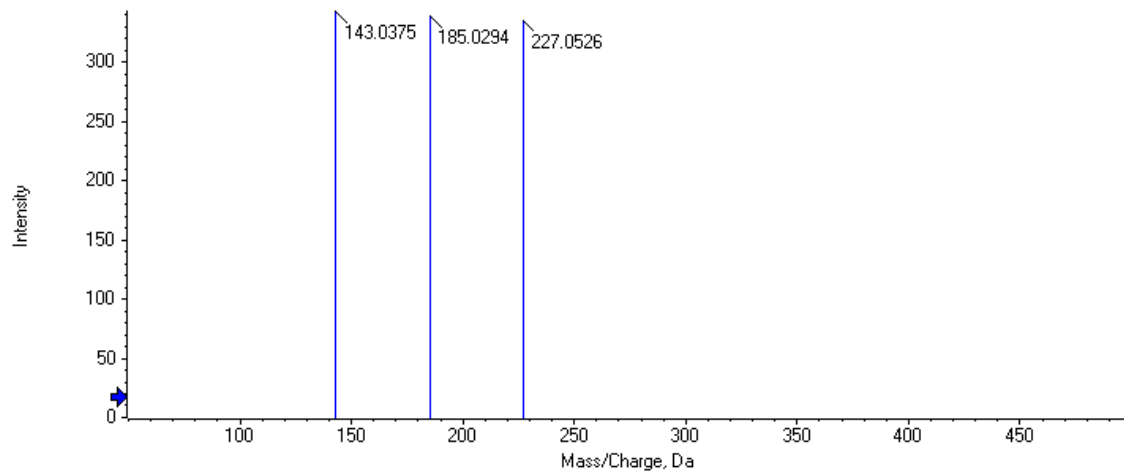


Abbildung C.6: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucosid (m/z 389,1).

C.3 Quercetin-Metaboliten in *C. elegans*-Homogenat

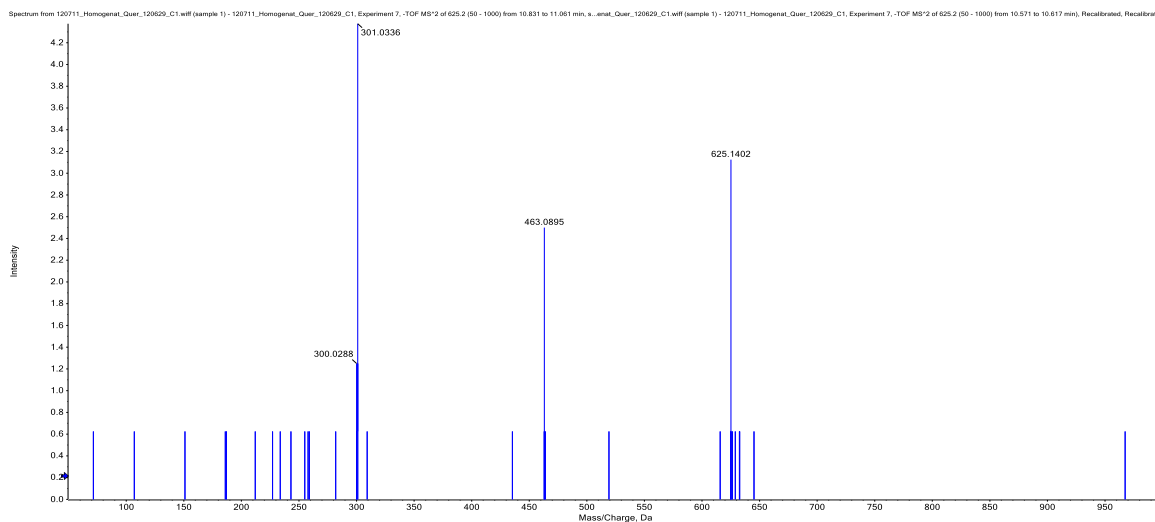


Abbildung C.7: Fragmentierungsspektrum von Quercetin-7,4'-Diglucosid (Q_A , m/z 625, 1).

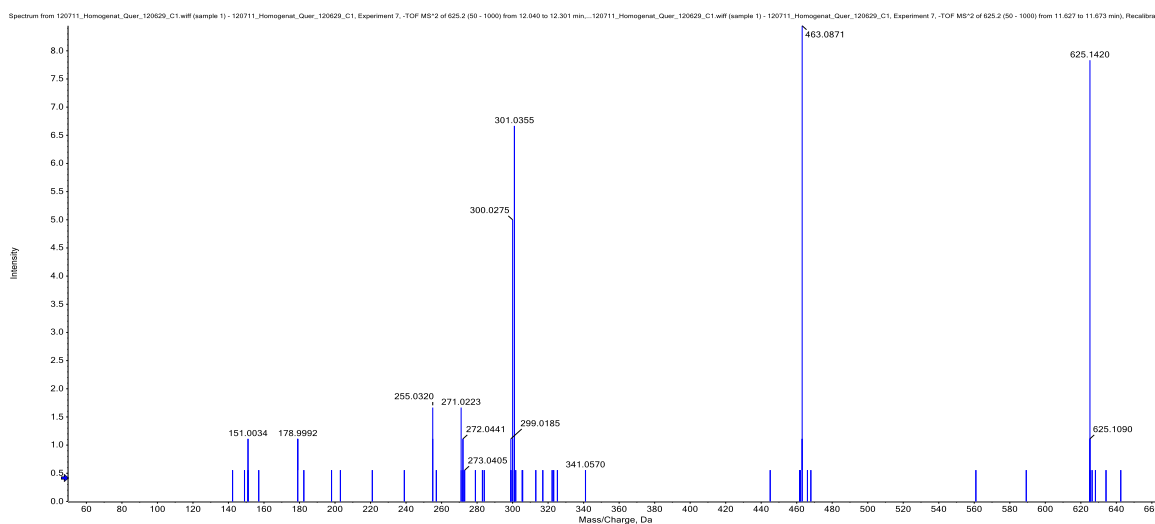


Abbildung C.8: Fragmentierungsspektrum von Quercetin-3,4'-Diglucosid (Q_B , m/z 625, 1).

C Massenspektren

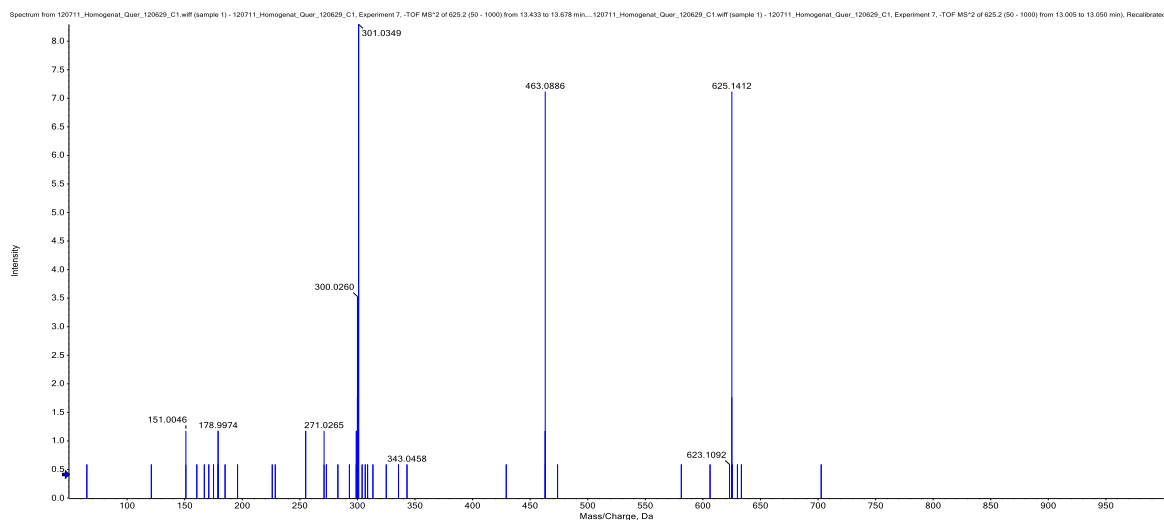


Abbildung C.9: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Diglucosids Q_C (m/z 625, 1).

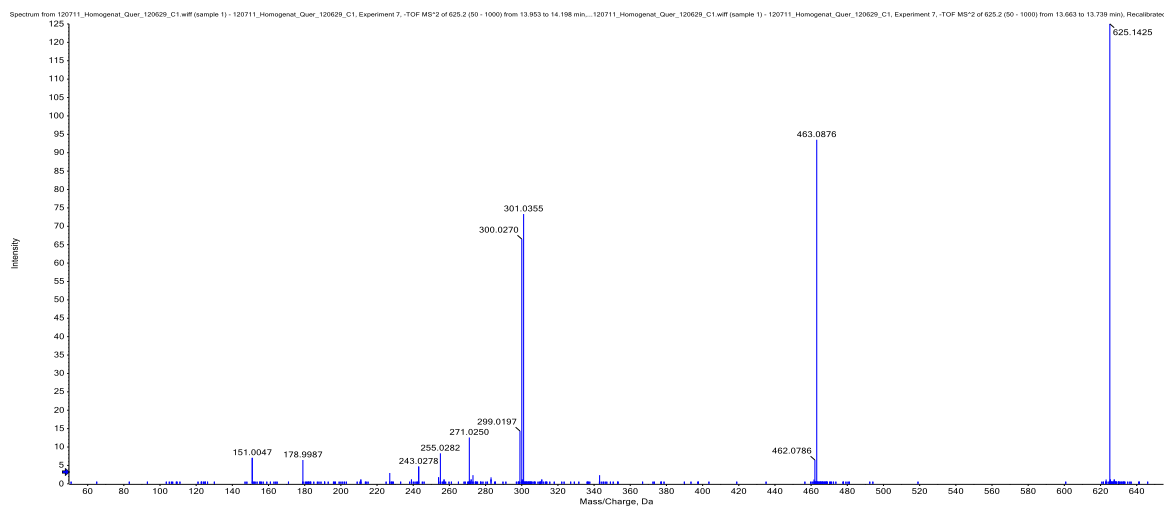


Abbildung C.10: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Diglucosids Q_D (m/z 625, 1).

C.3 Quercetin-Metaboliten in *C. elegans*-Homogenat

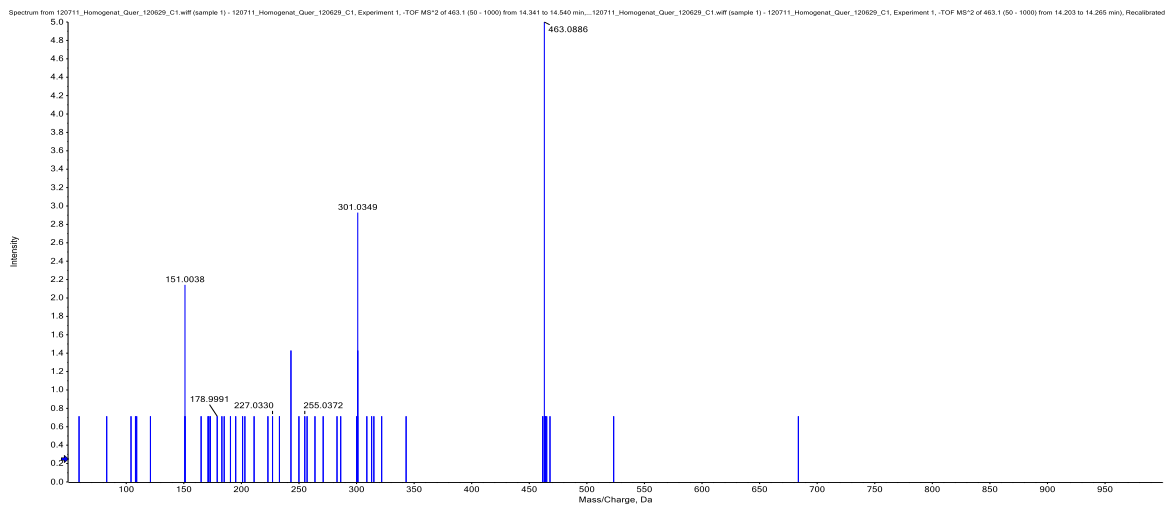


Abbildung C.11: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Glucosids Q_E (m/z 463, 1).

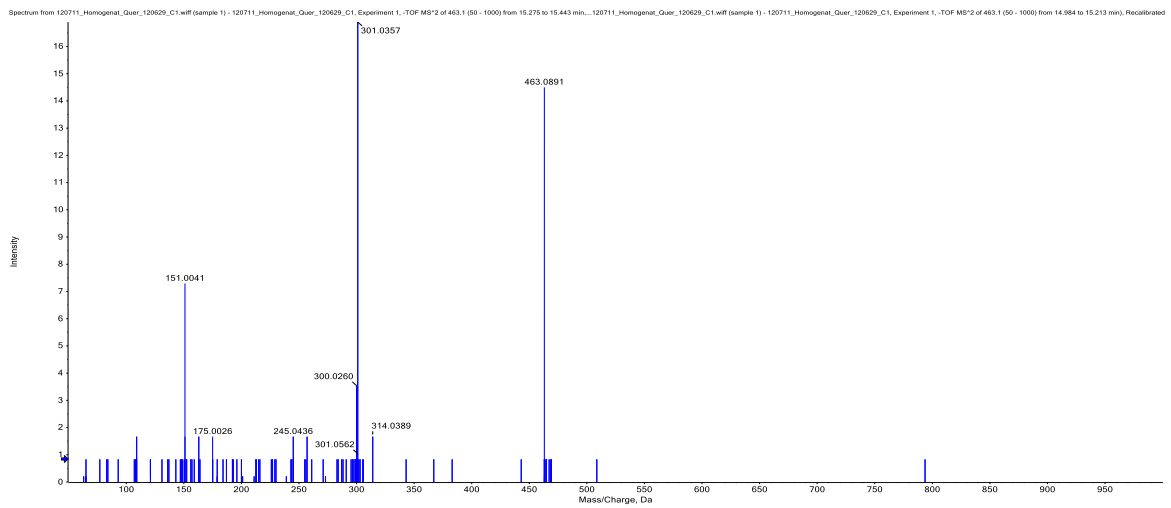


Abbildung C.12: Fragmentierungsspektrum von Quercetin-7-O-glucosid (Q_F , m/z 463, 1).

C Massenspektren

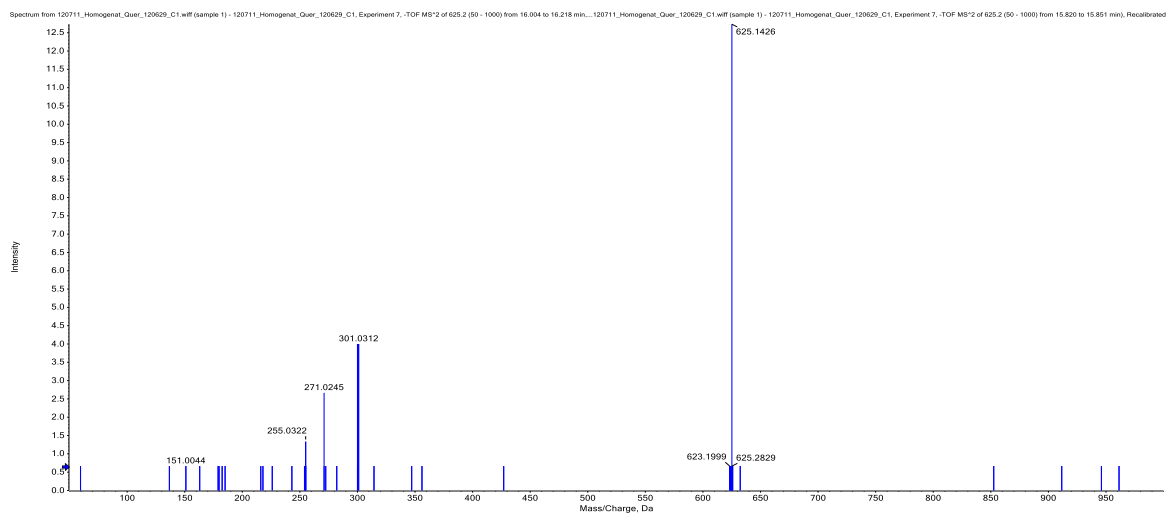


Abbildung C.13: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Diglucosids Q_G (m/z 625, 1).

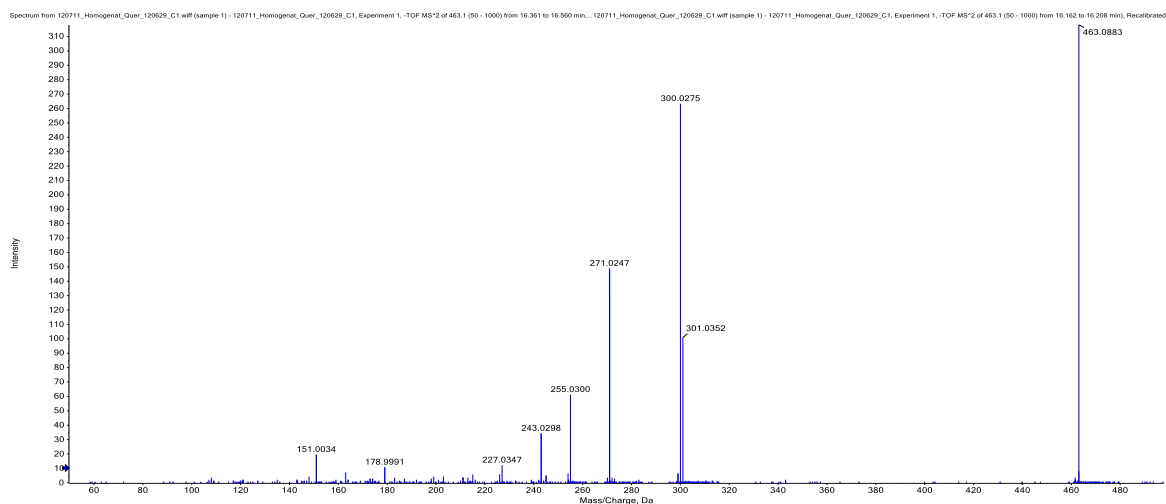


Abbildung C.14: Fragmentierungsspektrum von Quercetin-3-O-Glucosid (Q_H , m/z 463, 1).

C.3 Quercetin-Metaboliten in *C. elegans*-Homogenat

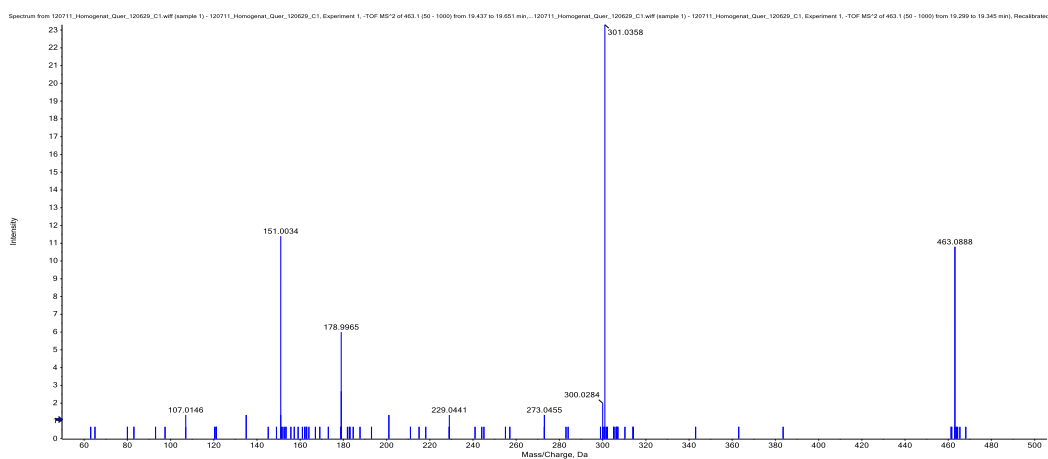


Abbildung C.15: Fragmentierungsspektrum von Quercetin-4'-O-Glucosid (G_K , m/z 463, 1).

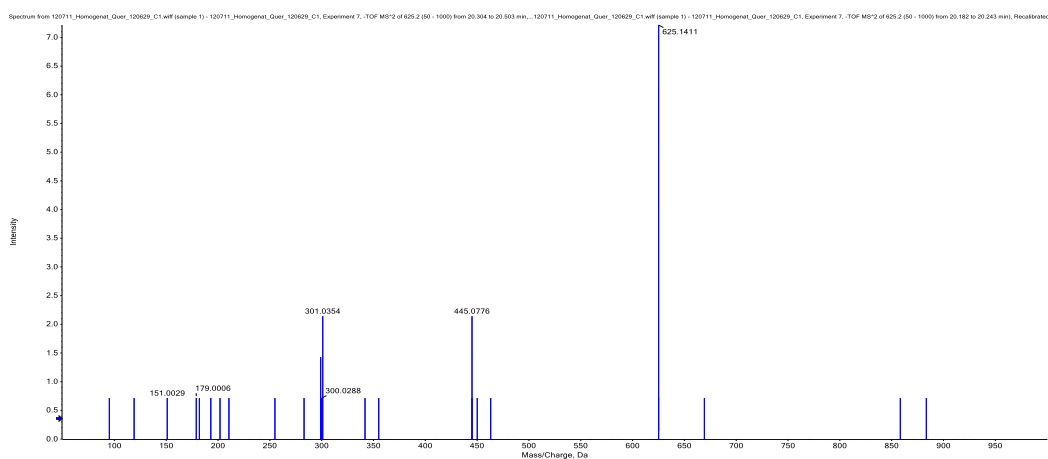


Abbildung C.16: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Diglucosids Q_L (m/z 625, 1).

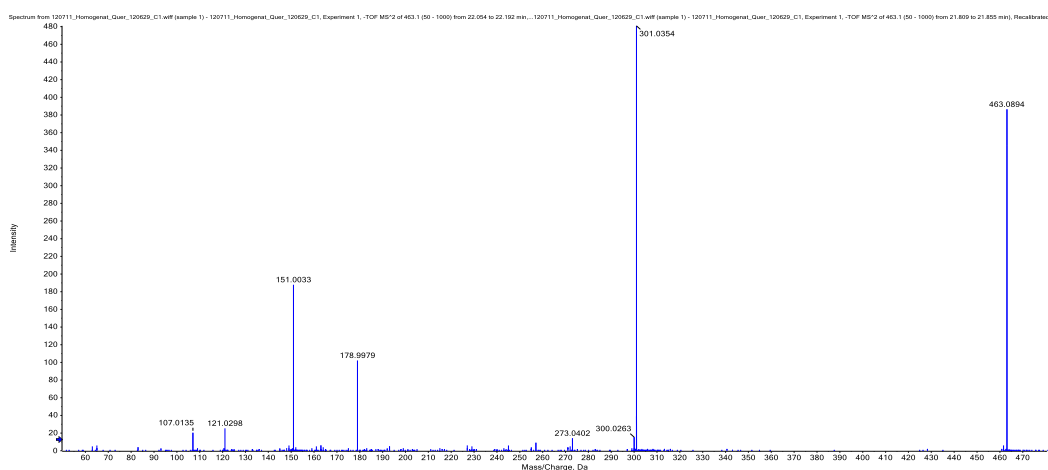


Abbildung C.17: Fragmentierungsspektrum des Quercetin-Glucosids Q_M (m/z 463, 1).

C.4 Metaboliten in *Drosophila melanogaster*

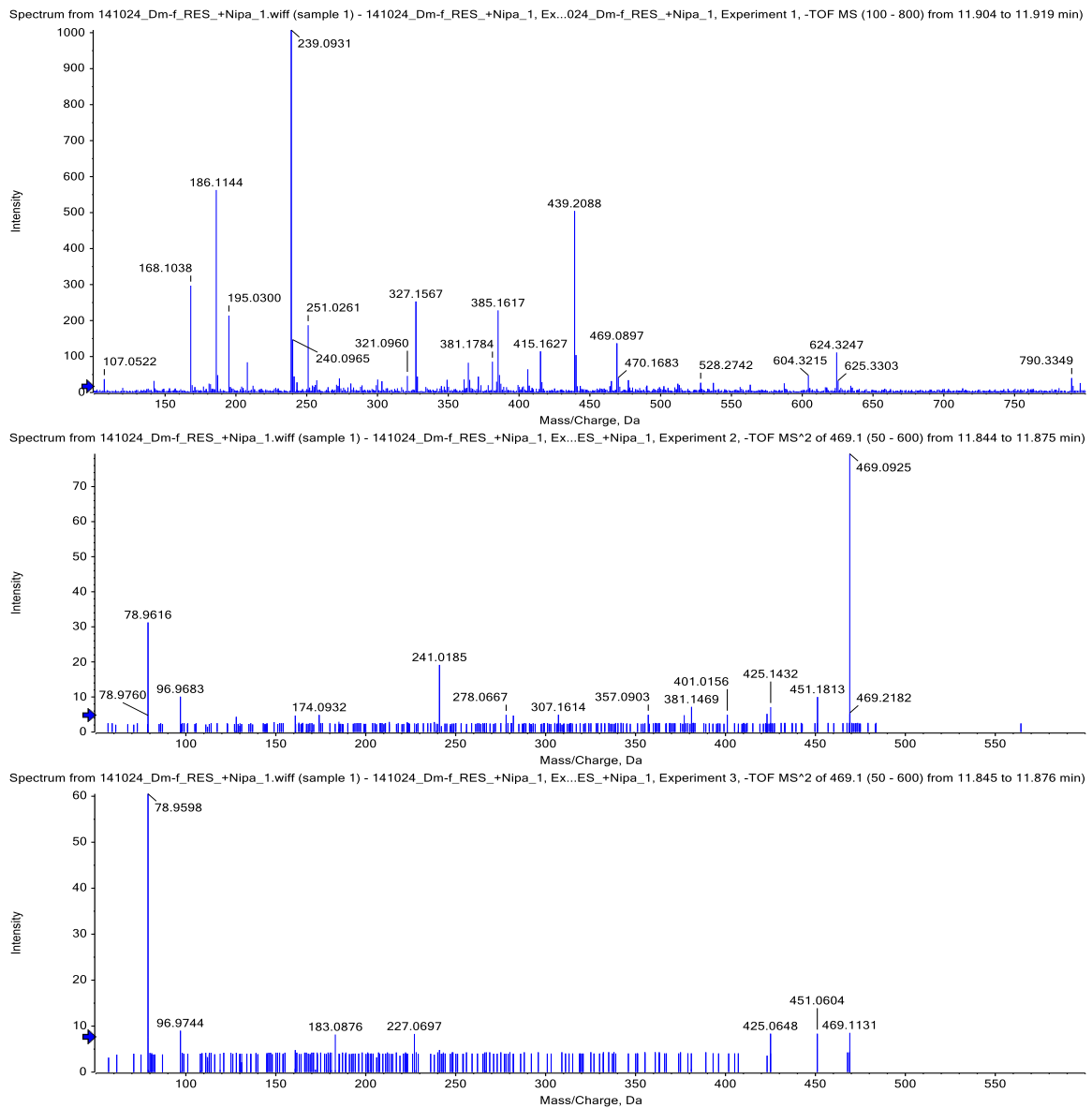
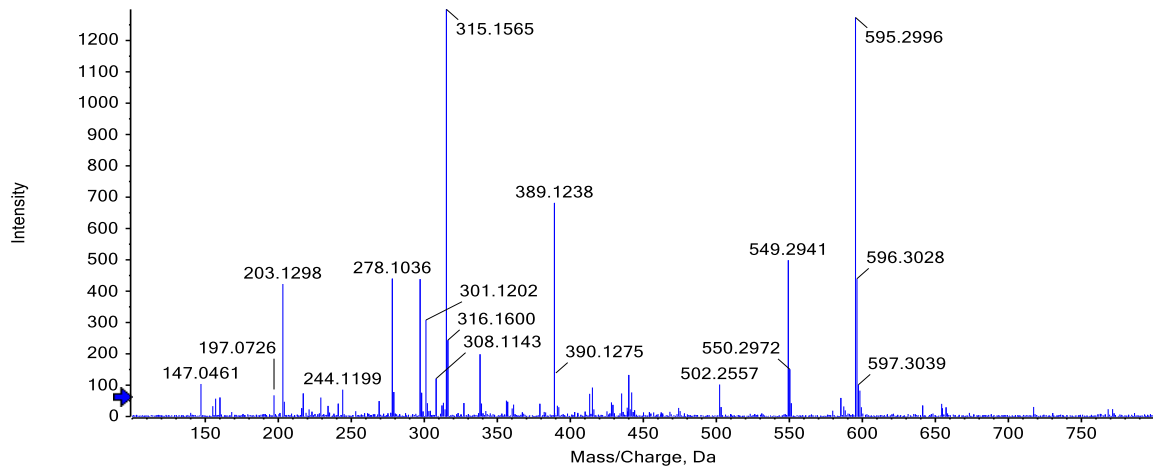


Abbildung C.18: Übersichts- und zwei Fragmentierungsspektren (unterschiedliche Ionisierungsparameter) eines Resveratrol-Phosphoglucosids (m/z 469, 1).

Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_..., Experiment 1, -TOF MS (100 - 800) from 14.112 to 14.174 min)



Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_...ent 6, -TOF MS² of 389.1 (50 - 600) from 13.936 to 13.966 min)

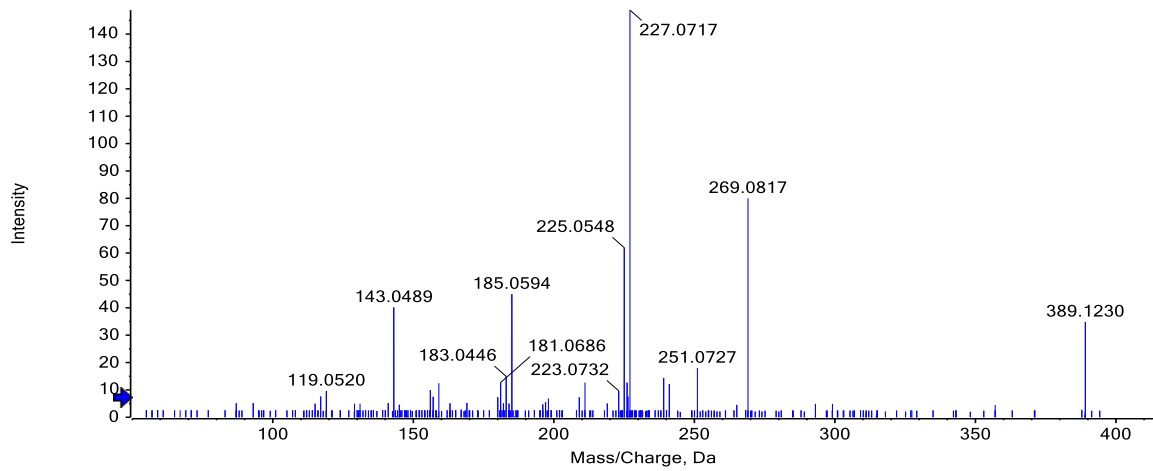
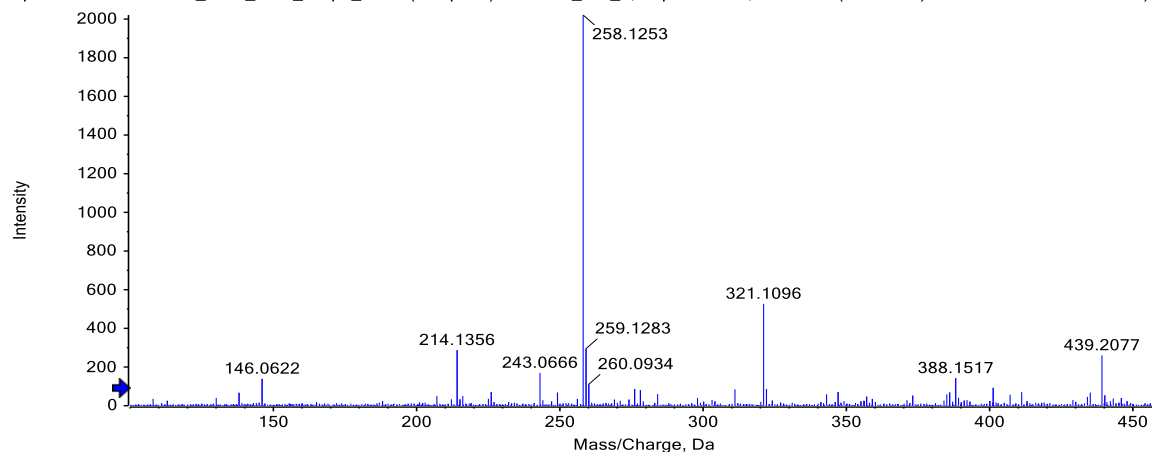


Abbildung C.19: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucosid (m/z 389, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_D..._2, Experiment 1, -TOF MS (100 - 800) from 15.723 to 15.753 min)



Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_Dm...ment 8, -TOF MS² of 243.1 (50 - 600) from 15.503 to 15.518 min)

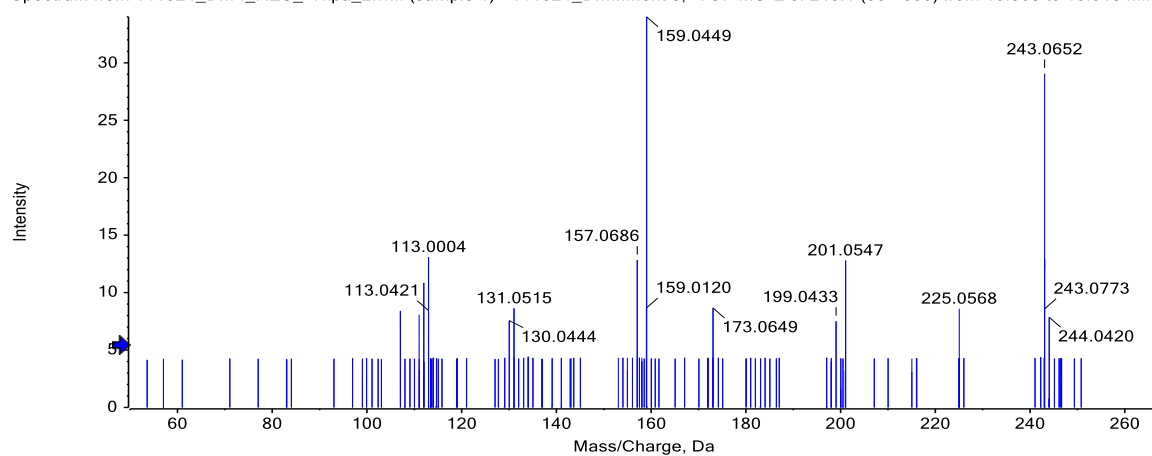
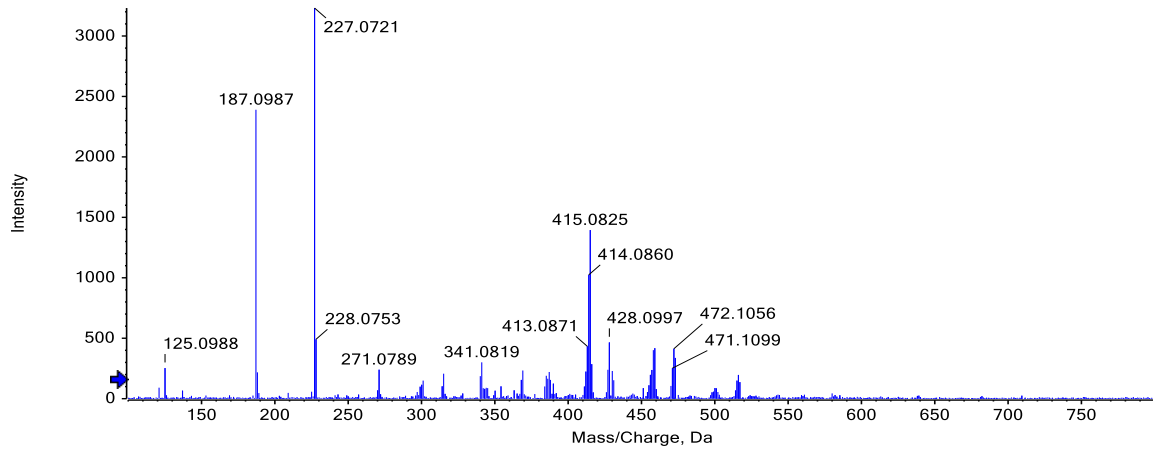


Abbildung C.20: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Piceatannol (m/z 243, 1).

Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_Dm..._2, Experiment 1, -TOF MS (100 - 800) from 20.385 to 20.431 min)



Spectrum from 141024_Dm-f_RES_+Nipa_2.wiff (sample 1) - 141024_Dm...ment 5, -TOF MS² of 227.1 (50 - 600) from 20.421 to 20.498 min)

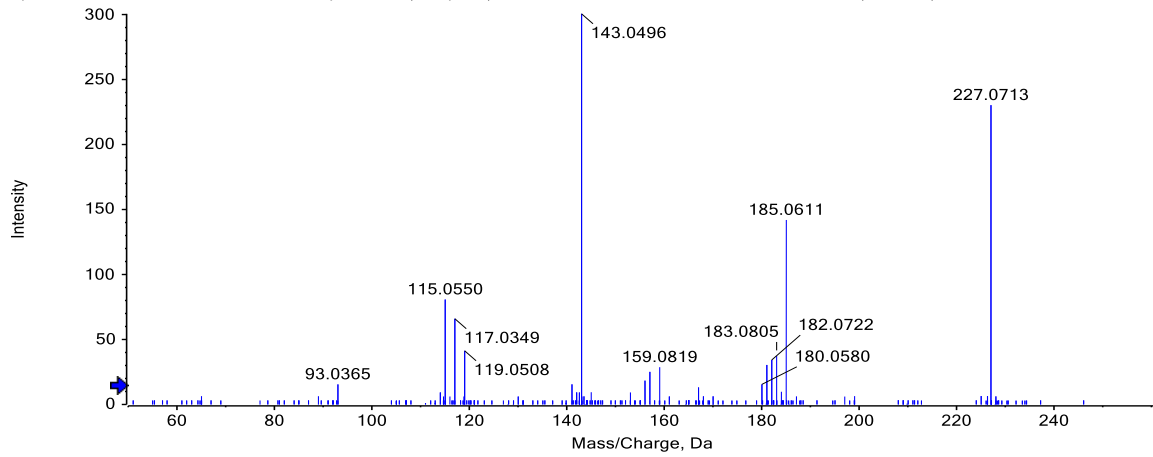
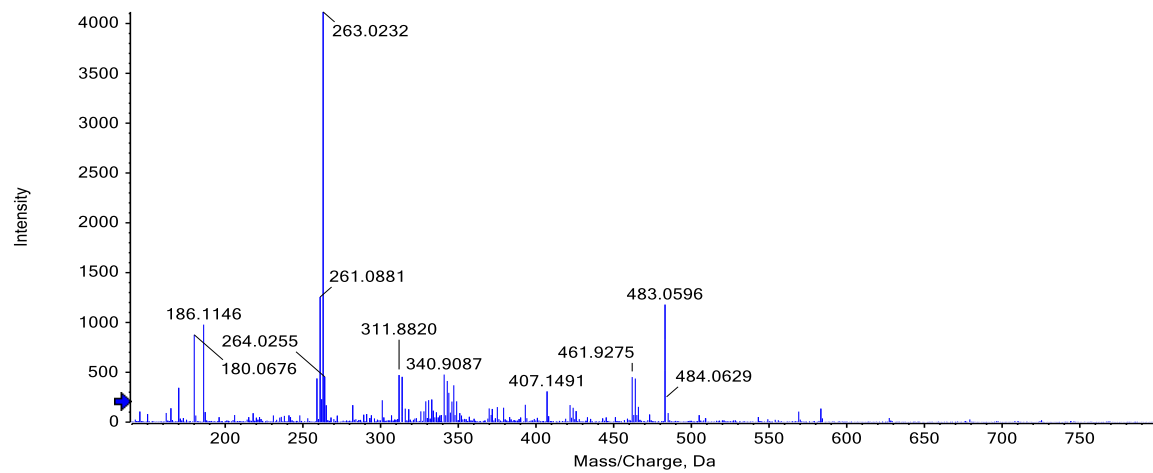


Abbildung C.21: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol (m/z 227, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re..._11, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 8.666 to 8.710 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...riment 7, -TOF MS² of 483.1 (70 - 500) from 7.883 to 7.971 min)

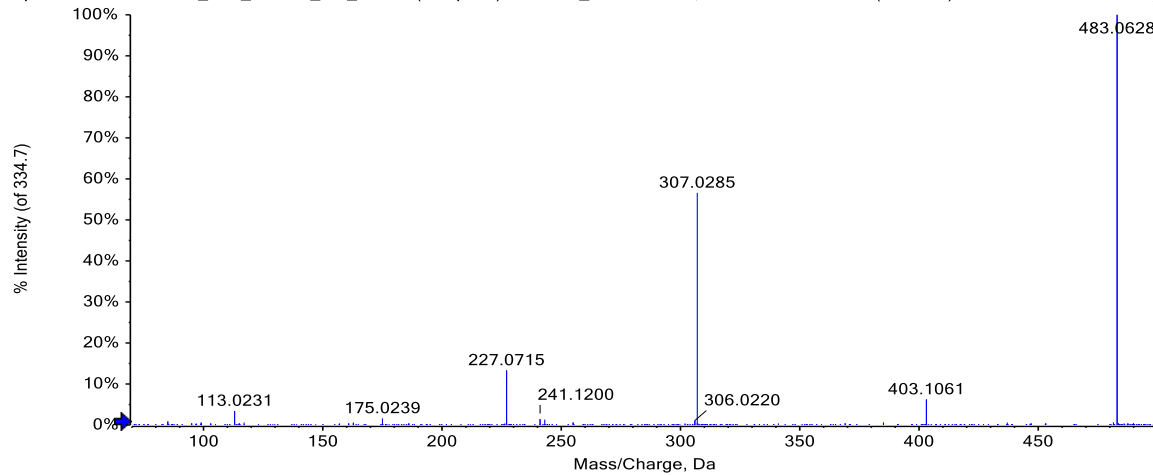


Abbildung C.22: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 483, 1).

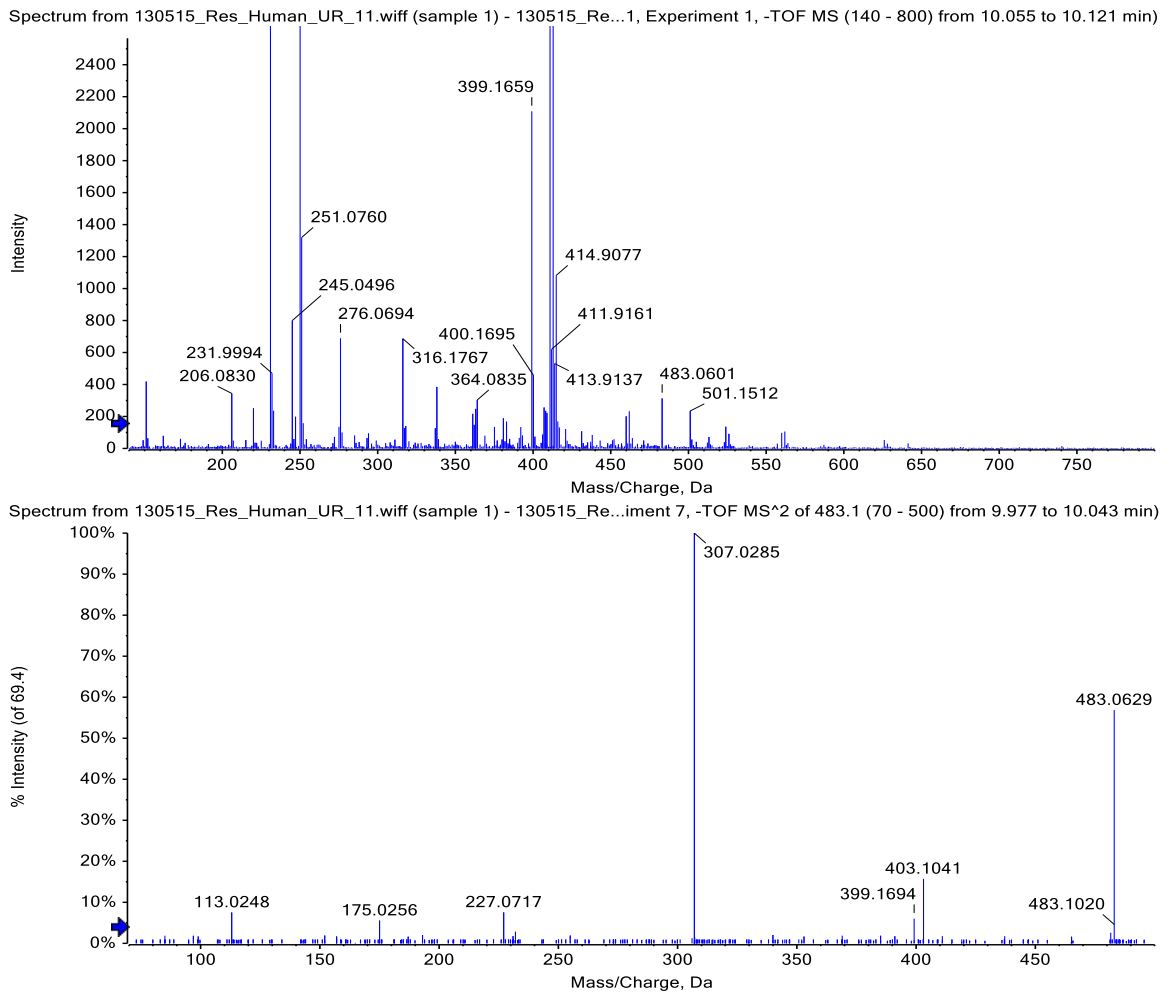
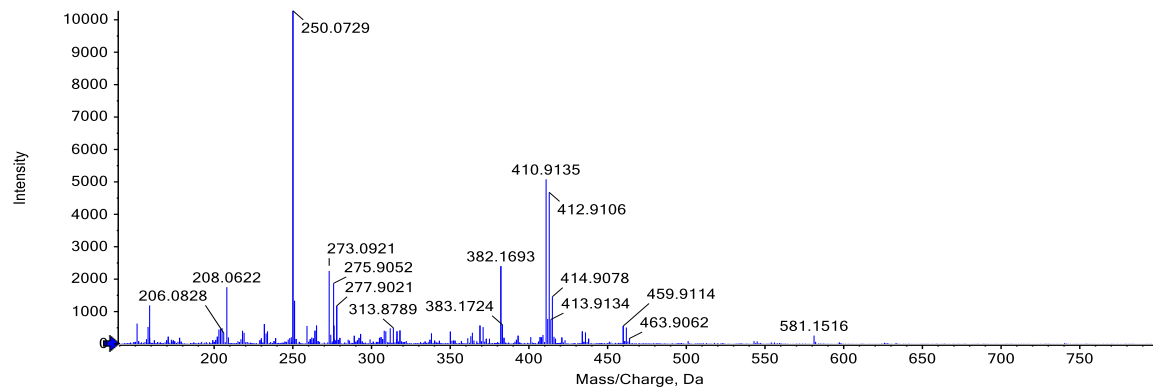


Abbildung C.23: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfolucuronids (m/z 483,1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Hum...man_UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 9.592 to 9.636 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human..., Experiment 9, -TOF MS² of 581.2 (70 - 600) from 9.540 to 9.606 min)

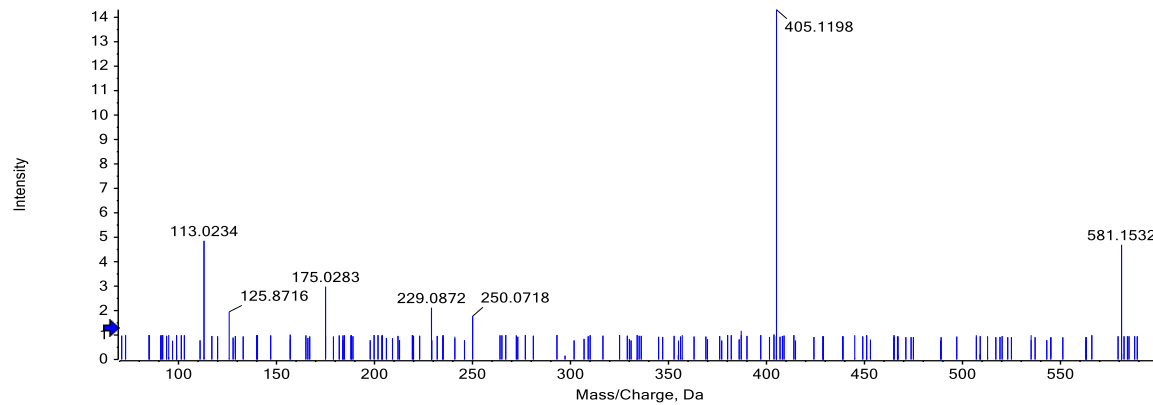
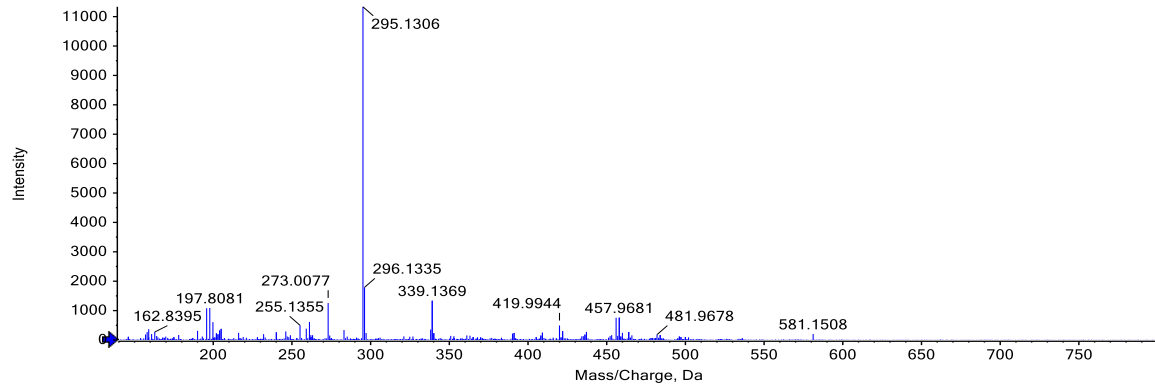


Abbildung C.24: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Diglucuronids (m/z 581,2).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Hum...n_UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 10.429 to 10.473 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human..., Experiment 9, -TOF MS² of 581.2 (70 - 600) from 9.540 to 9.606 min)

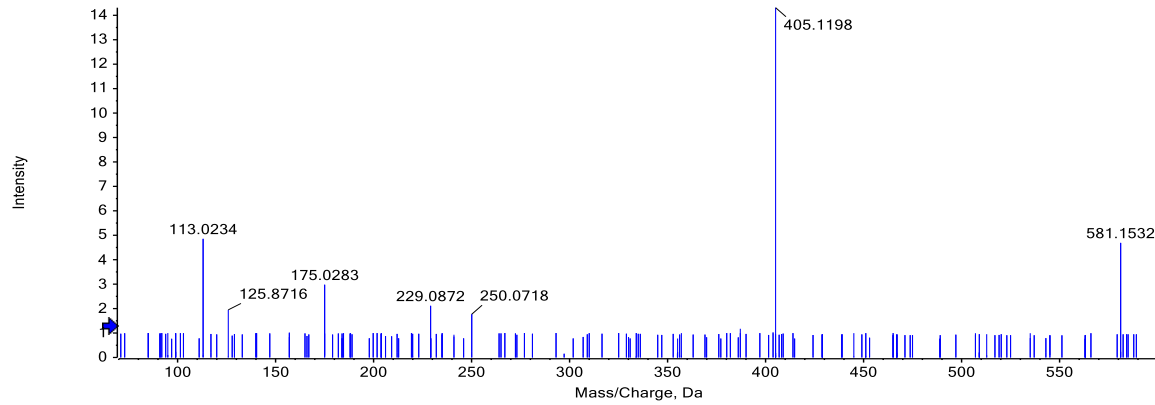
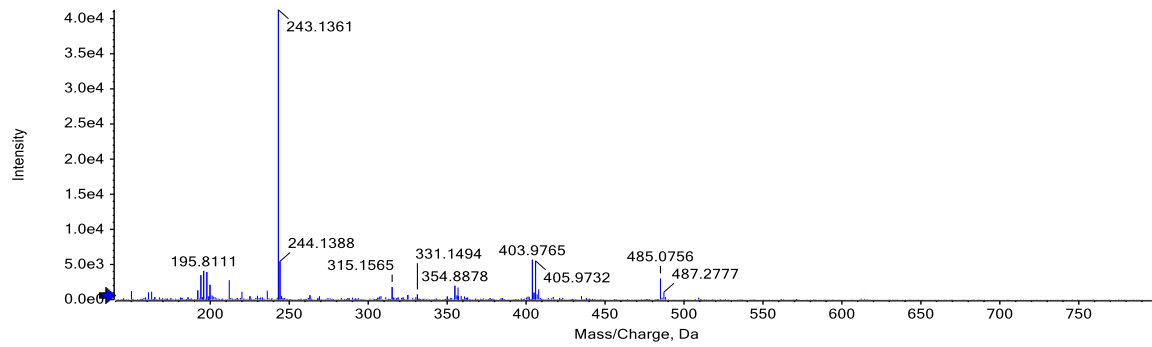


Abbildung C.25: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Diglucuronids (m/z 581, 2).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_13.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human...an_UR_13, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 10.848 to 10.892 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_13.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human... Experiment 10, -TOF MS² of 485.1 (70 - 500) from 10.886 to 10.908 min)

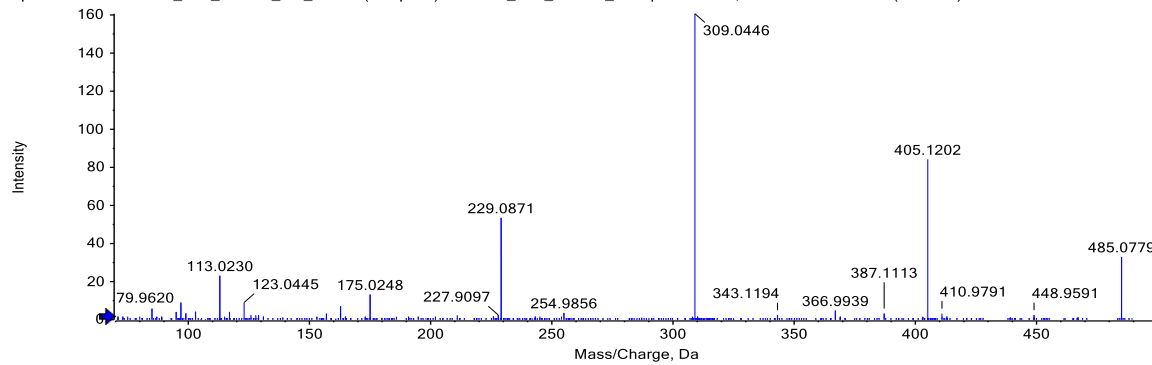
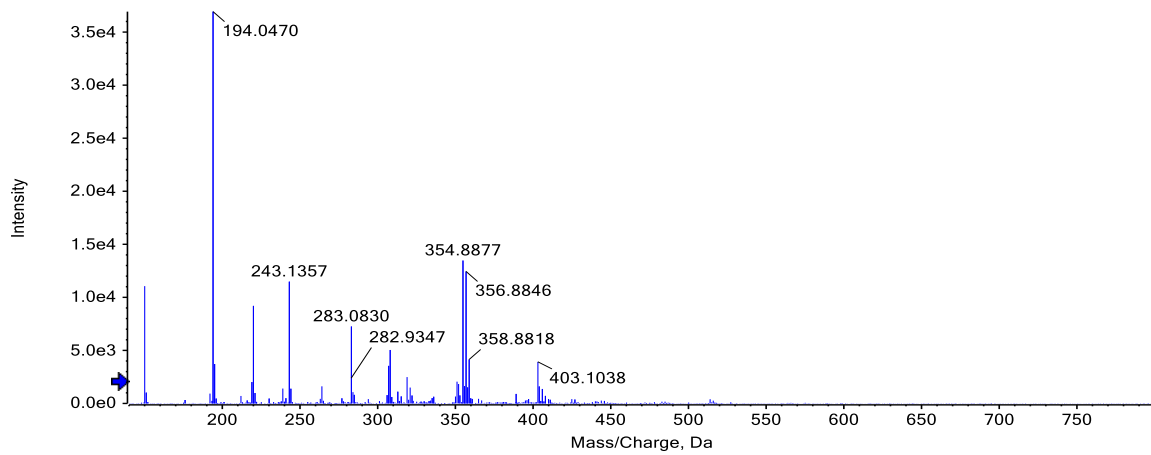


Abbildung C.26: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 485, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 11.355 to 11.487 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 5, -TOF MS² of 403.1 (70 - 500) from 11.208 to 11.274 min)

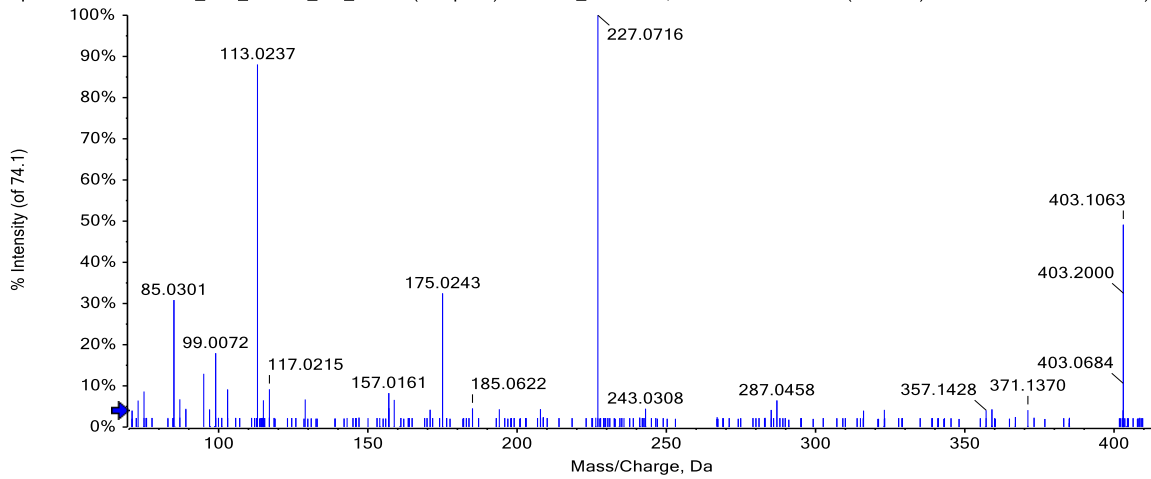
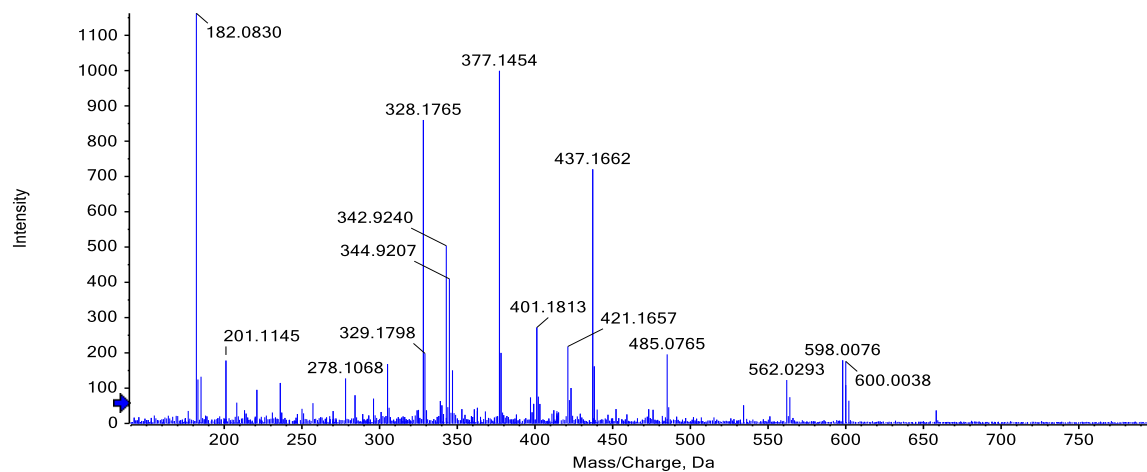


Abbildung C.27: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-4'-O-Glucuronid (m/z 403,1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 11.597 to 11.641 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 10, -TOF MS² of 485.1 (70 - 500) from 10.798 to 11.084 min)

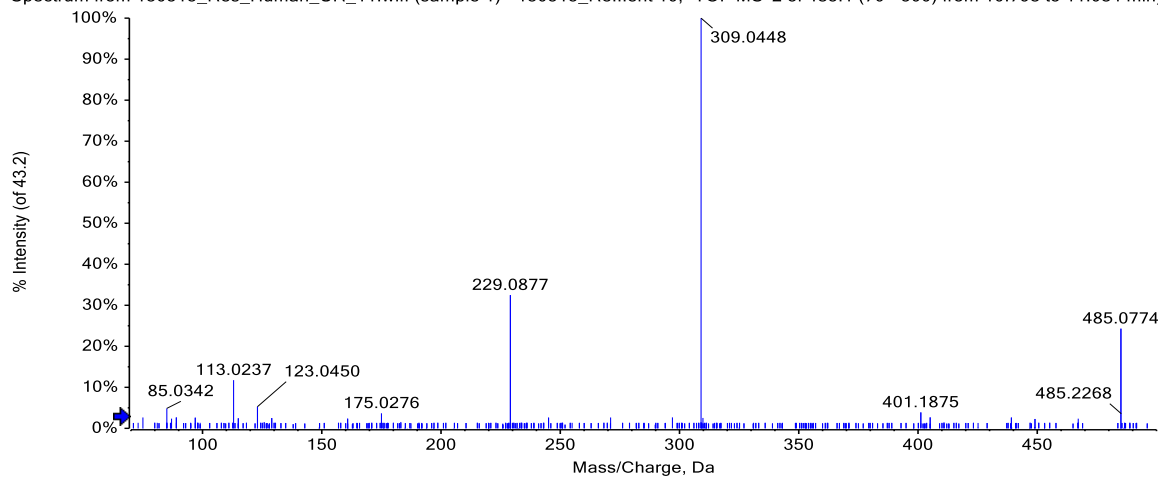


Abbildung C.28: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 485, 1).

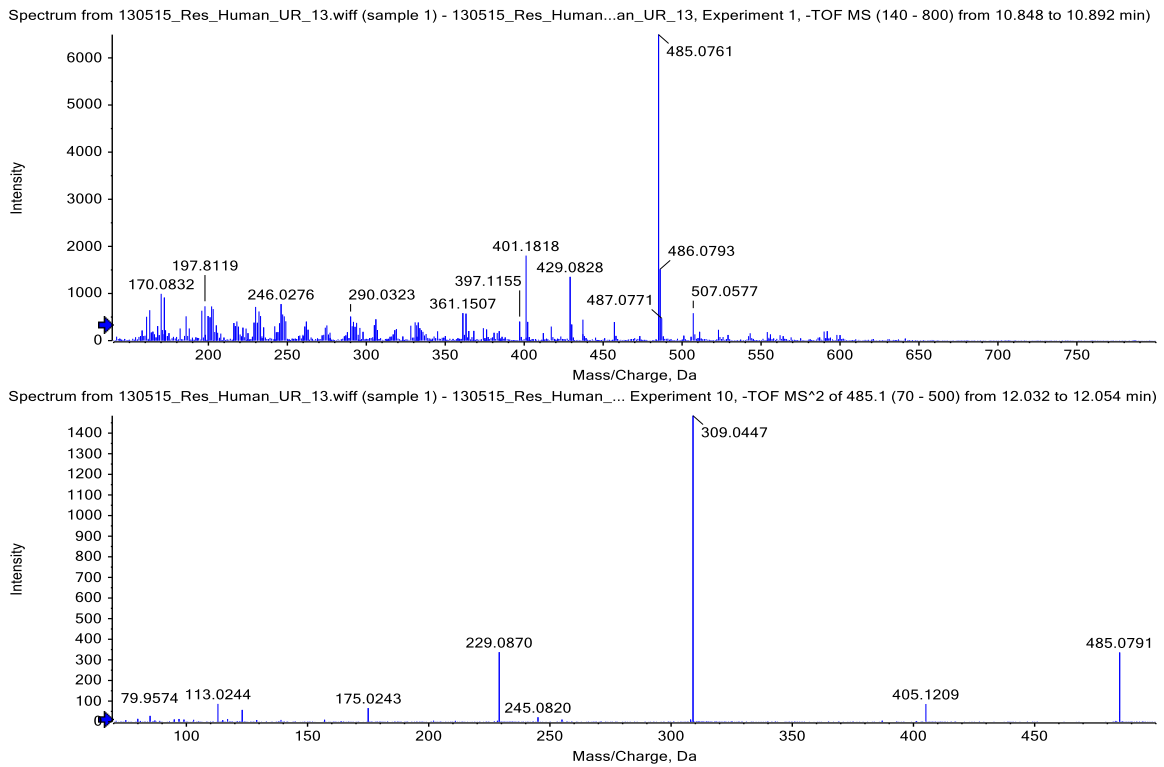
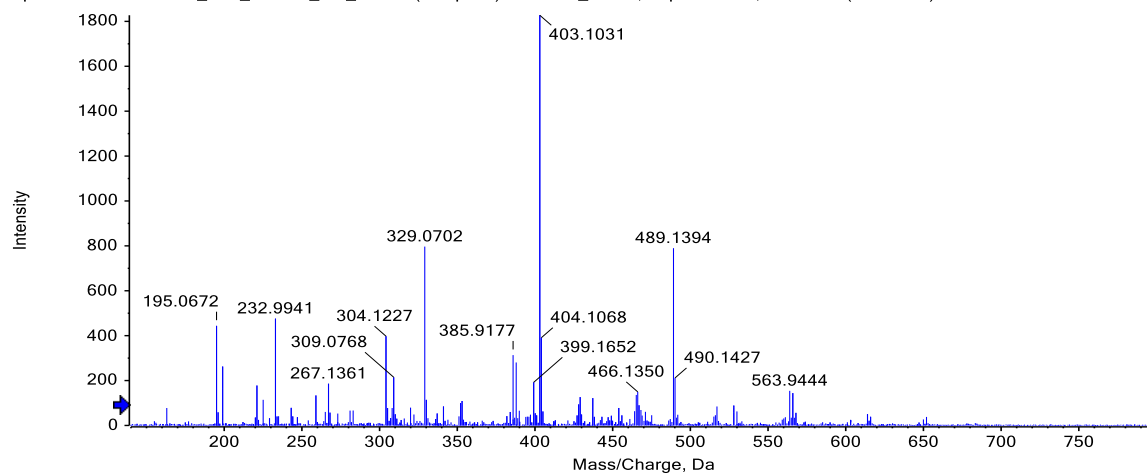


Abbildung C.29: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 15.080 to 15.146 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 6, -TOF MS² of 403.1 (70 - 500) from 15.000 to 15.067 min)

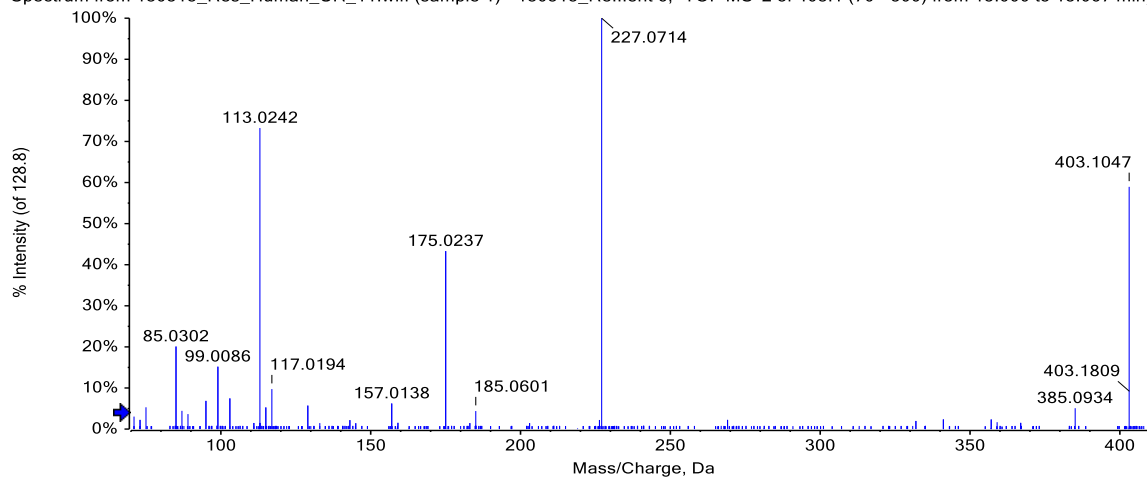


Abbildung C.30: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucuronid (m/z 403,1).

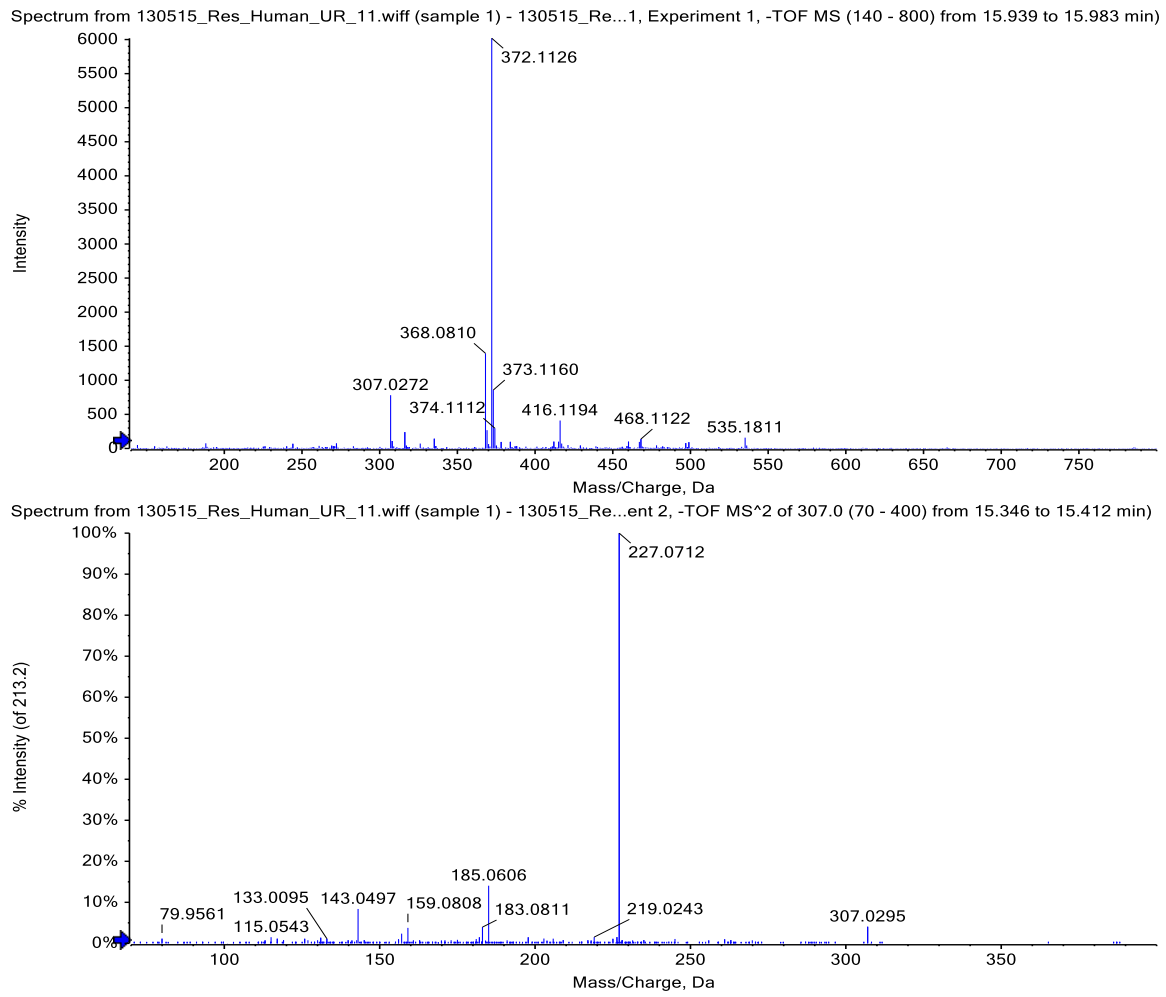
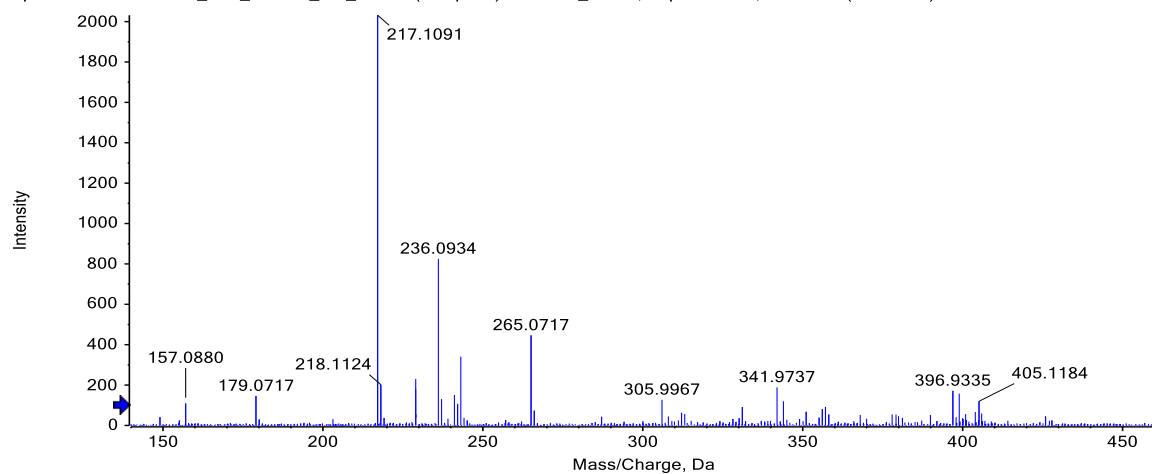


Abbildung C.31: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfats (m/z 307, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 16.116 to 16.138 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 8, -TOF MS² of 405.1 (70 - 500) from 16.150 to 16.238 min)

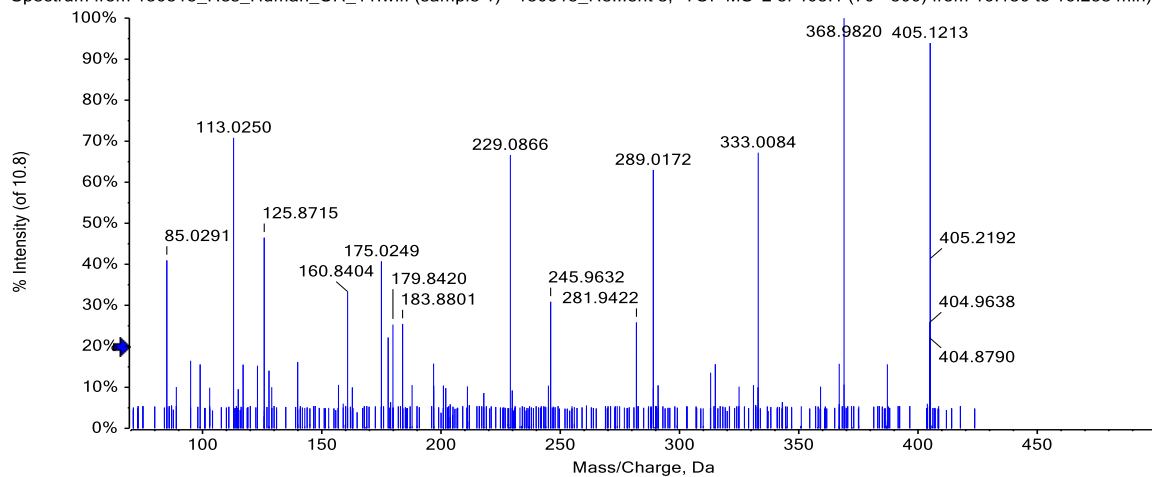
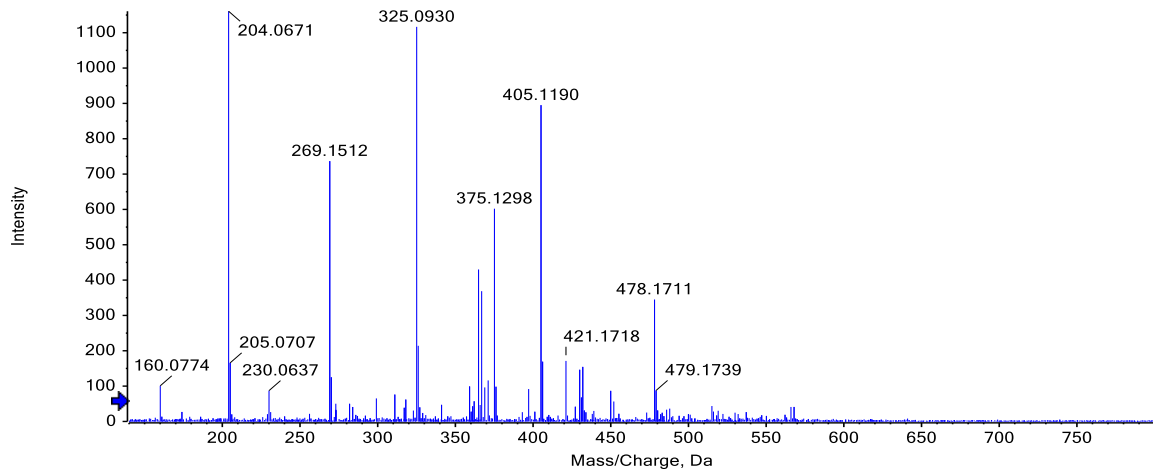


Abbildung C.32: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405, 1).

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 18.386 to 18.452 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 8, -TOF MS² of 405.1 (70 - 500) from 18.288 to 18.332 min)

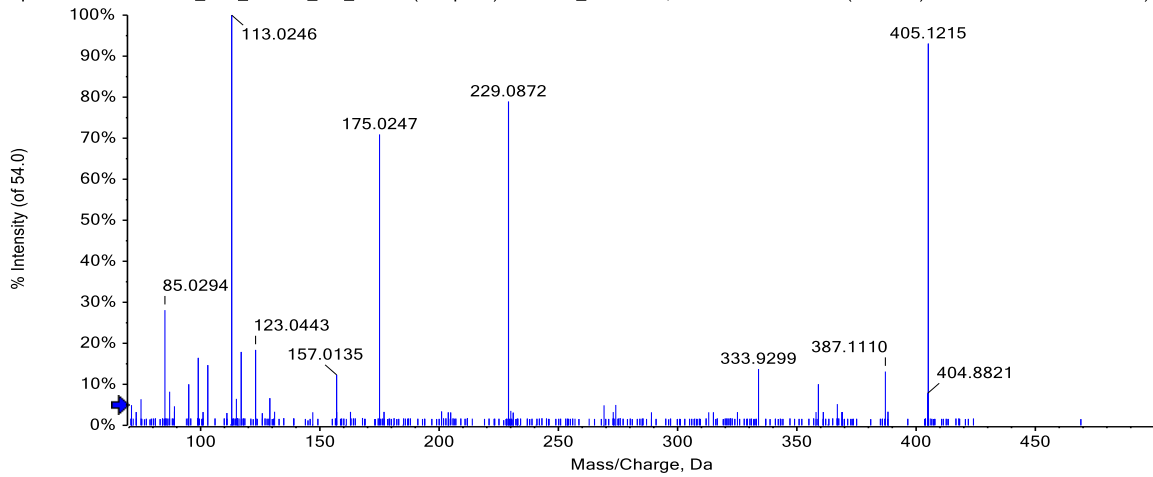
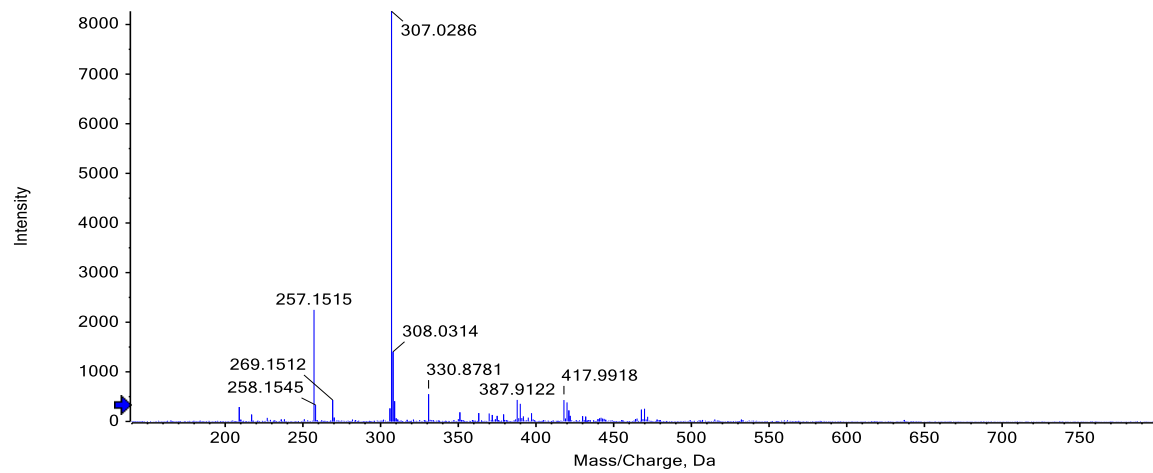


Abbildung C.33: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405,1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 18.805 to 18.893 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 2, -TOF MS² of 307.0 (70 - 400) from 18.741 to 18.807 min)

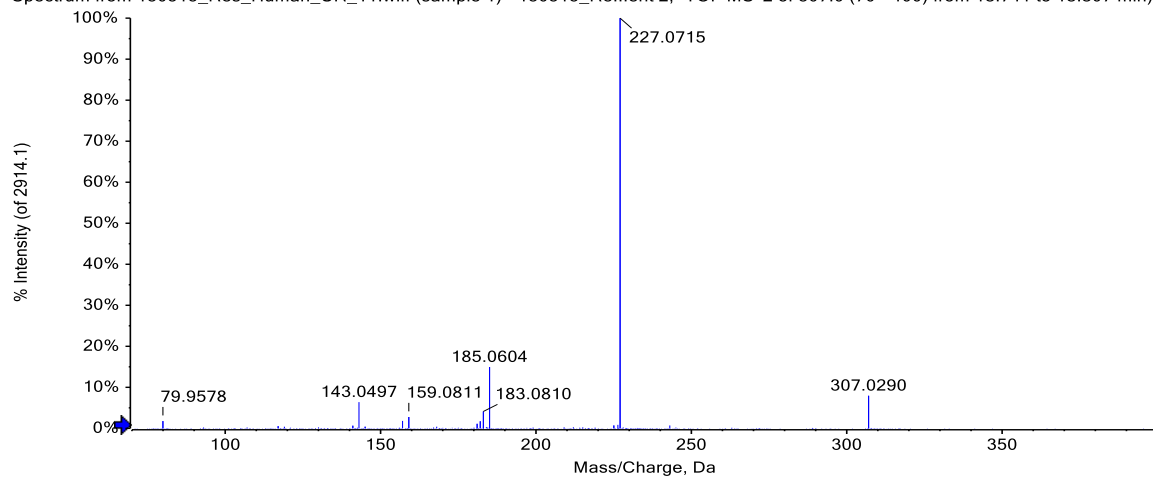


Abbildung C.34: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfats (m/z 307, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

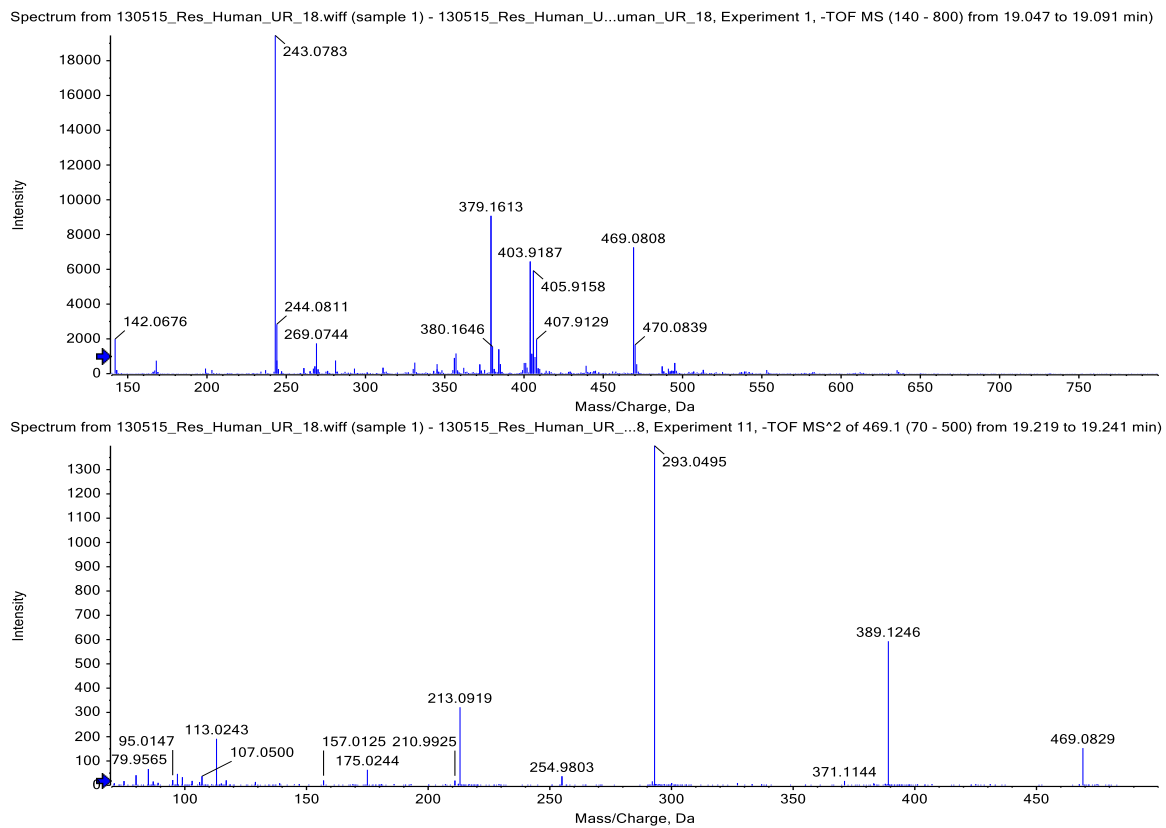
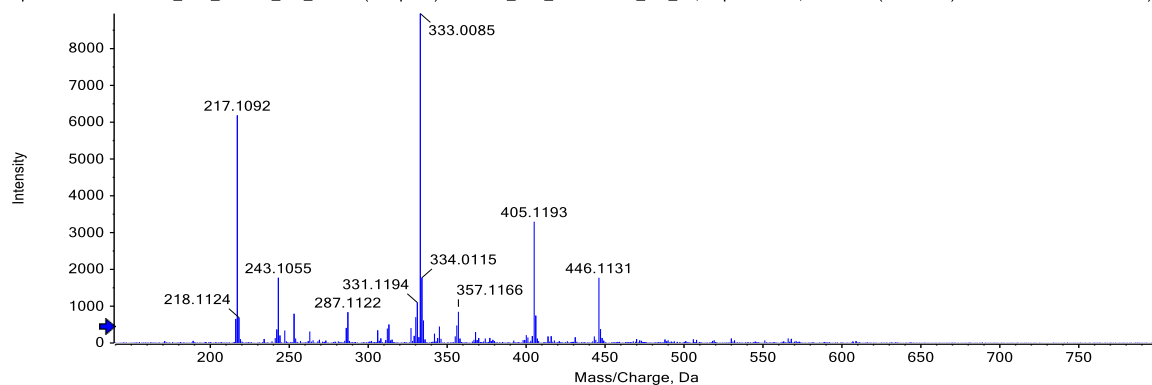


Abbildung C.35: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Lunularin-Sulfolucuronids (m/z 469, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_13.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human...an_UR_13, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 19.421 to 19.444 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_13.wiff (sample 1) - 130515_Res_Human_..., Experiment 8, -TOF MS² of 405.1 (70 - 500) from 18.905 to 18.949 min)

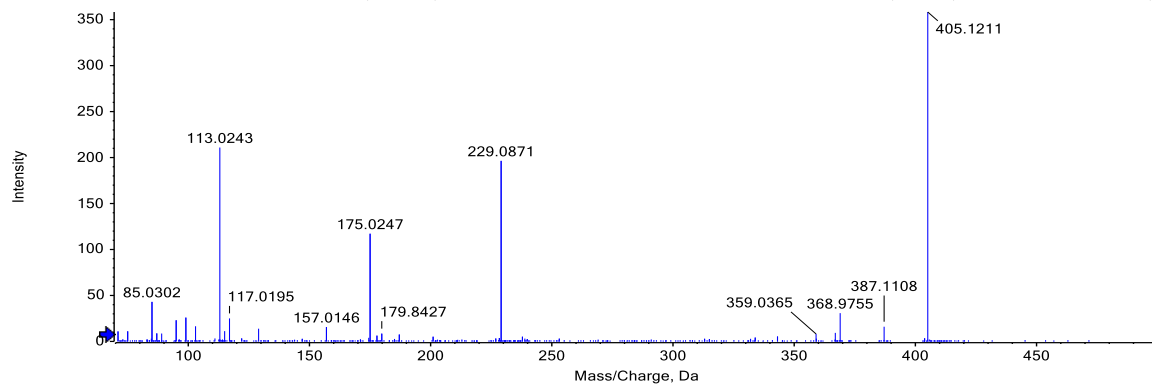
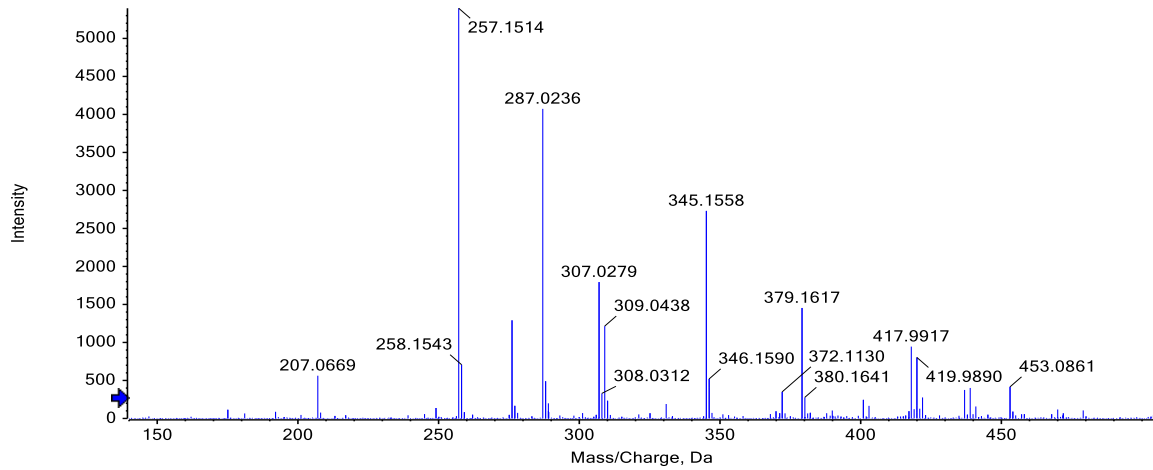


Abbildung C.36: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 18.782 to 18.915 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 4, -TOF MS² of 309.0 (70 - 400) from 18.788 to 18.832 min)

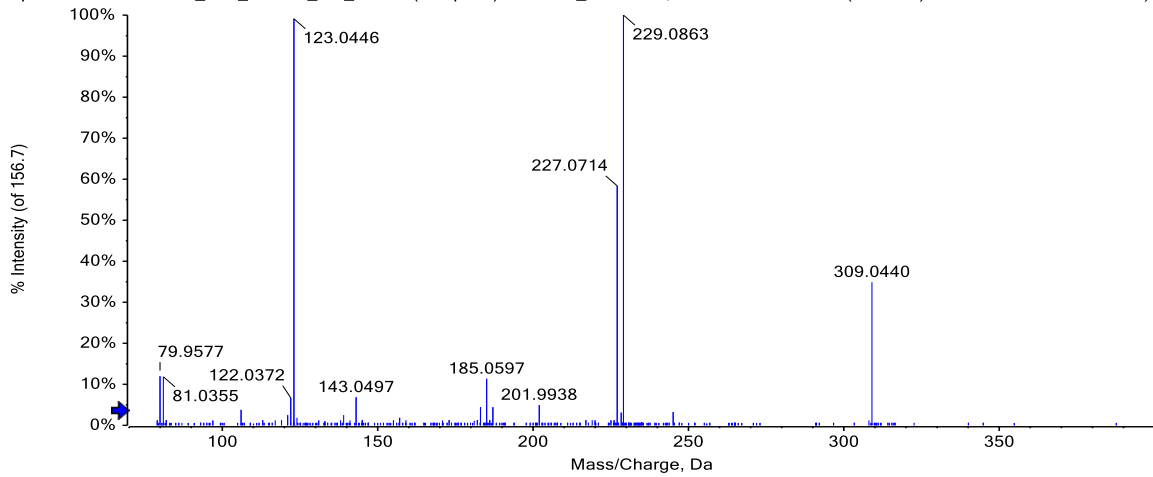
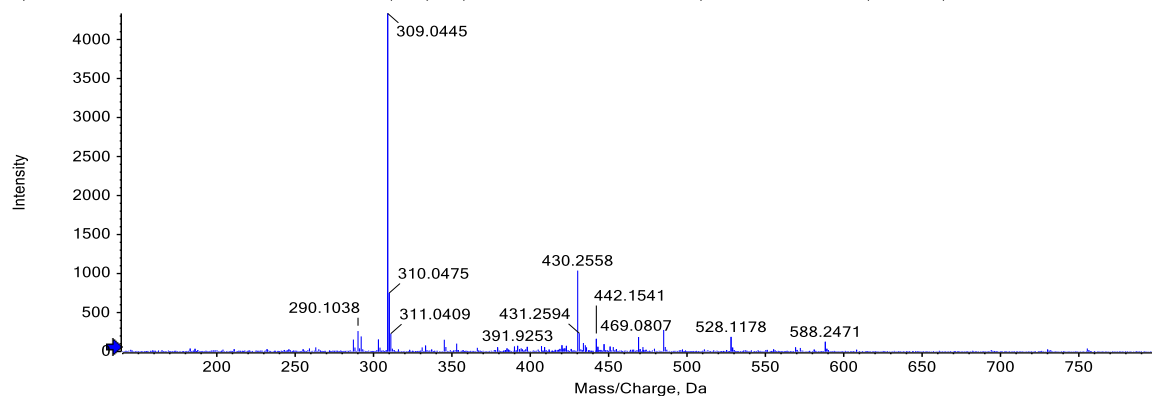


Abbildung C.37: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309,0).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_H...UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 21.802 to 21.846 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Hu...eriment 11, -TOF MS^2 of 469.1 (70 - 500) from 21.621 to 21.643 min)

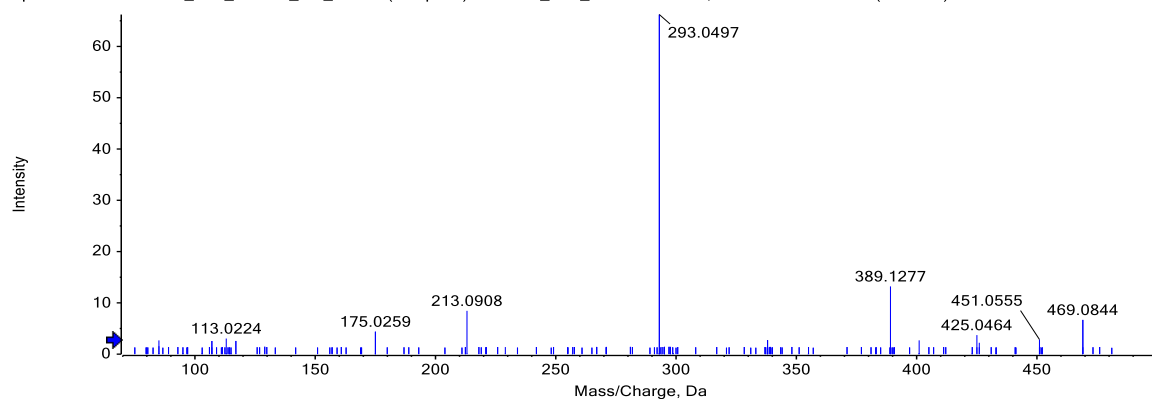
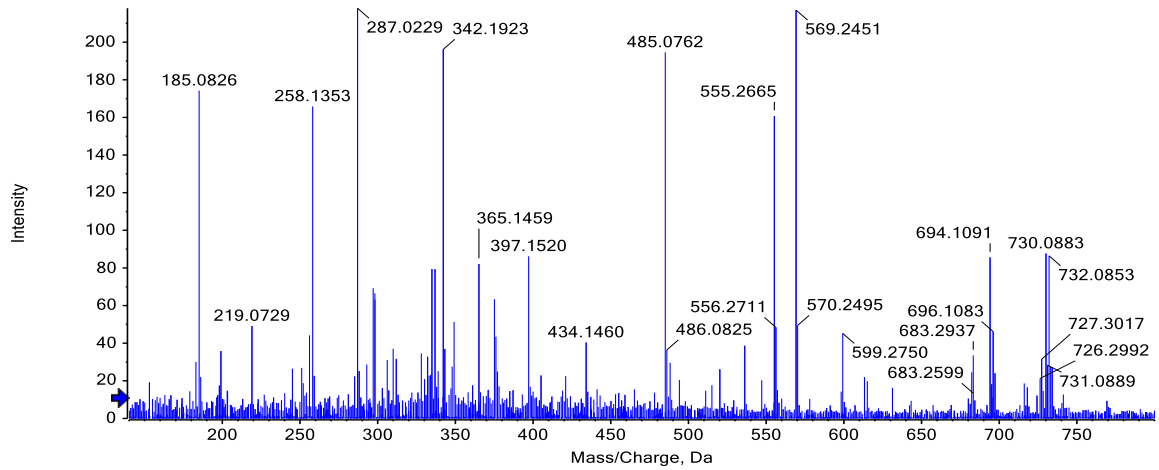


Abbildung C.38: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Lunularin-Sulfolglucuronids (m/z 469, 1).

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 19.951 to 19.995 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 10, -TOF MS² of 485.1 (70 - 500) from 19.966 to 20.010 min)

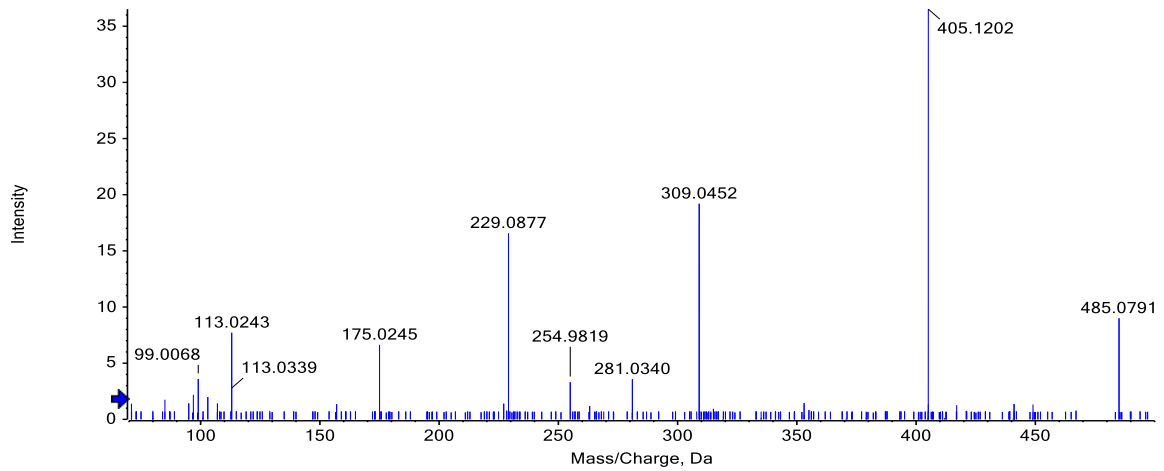
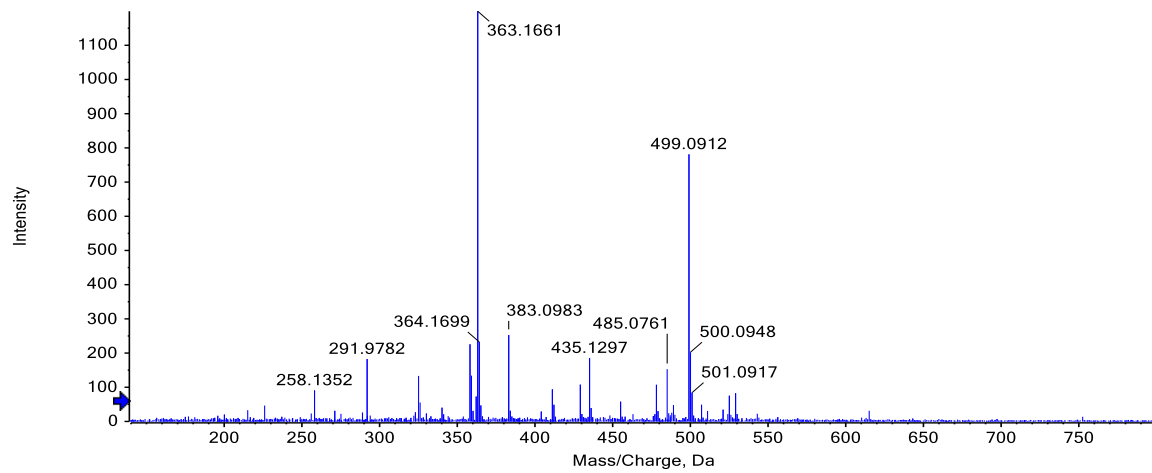


Abbildung C.39: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485,1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...1, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 20.435 to 20.480 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 10, -TOF MS² of 485.1 (70 - 500) from 20.517 to 20.561 min)

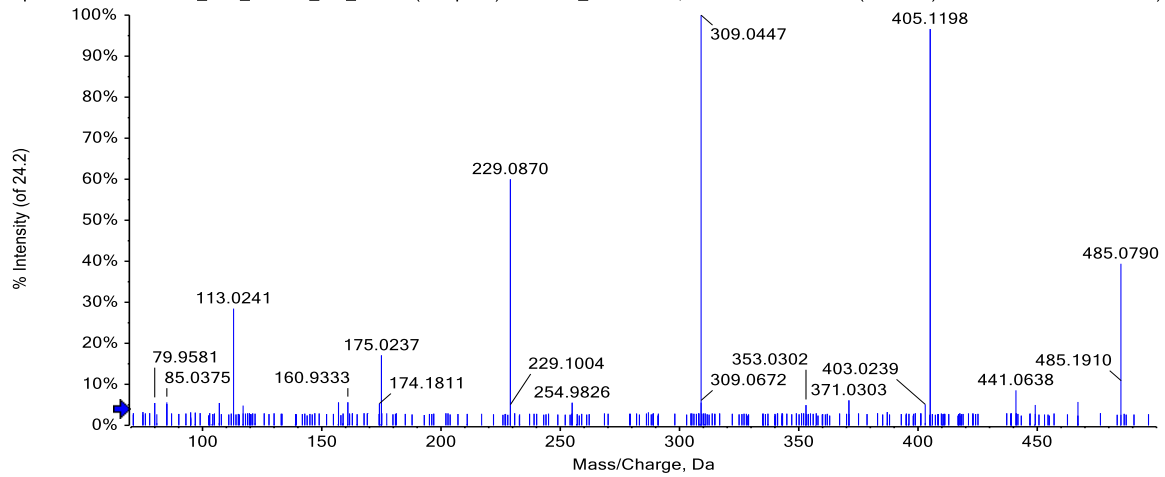
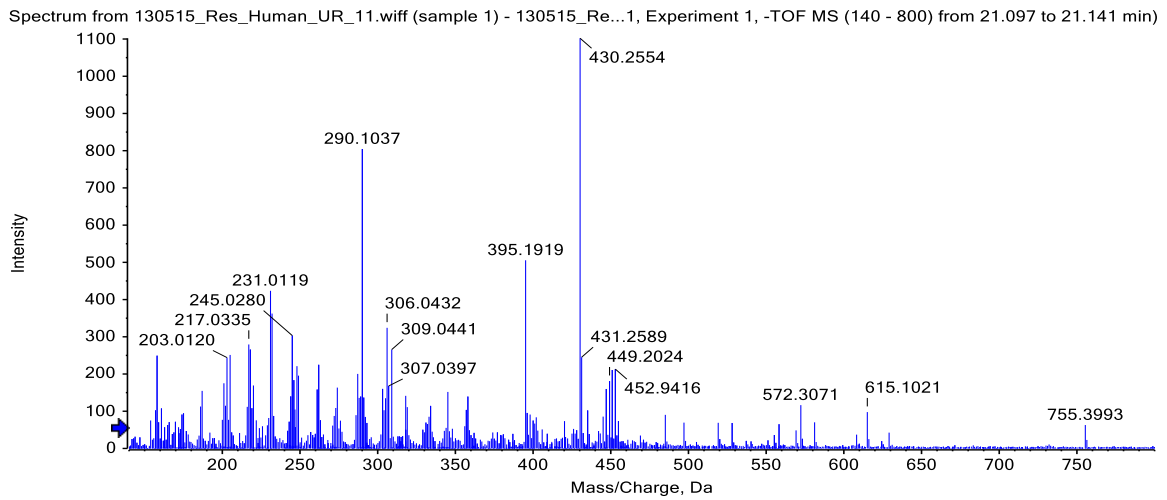


Abbildung C.40: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 485, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_11.wiff (sample 1) - 130515_Re...ent 4, -TOF MS² of 309.0 (70 - 400) from 21.146 to 21.212 min)

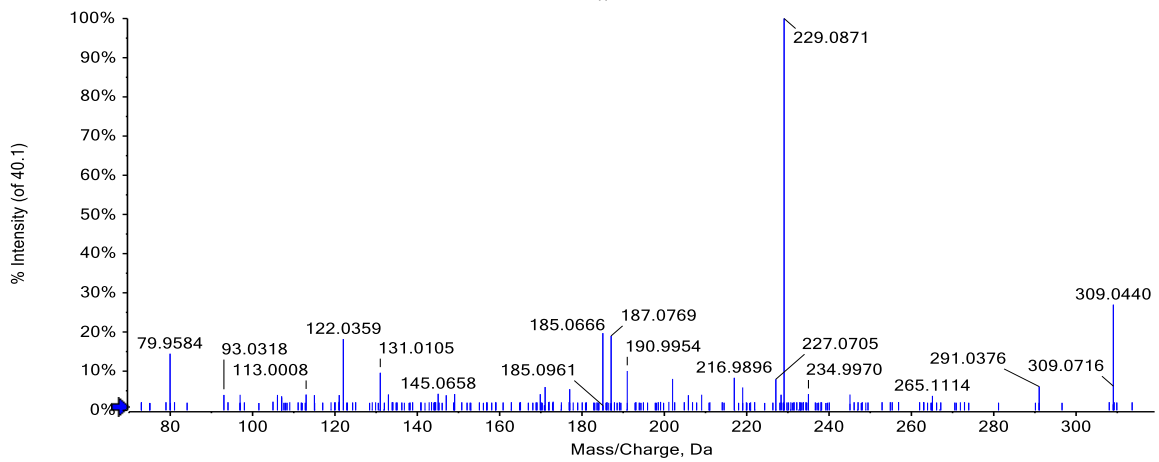
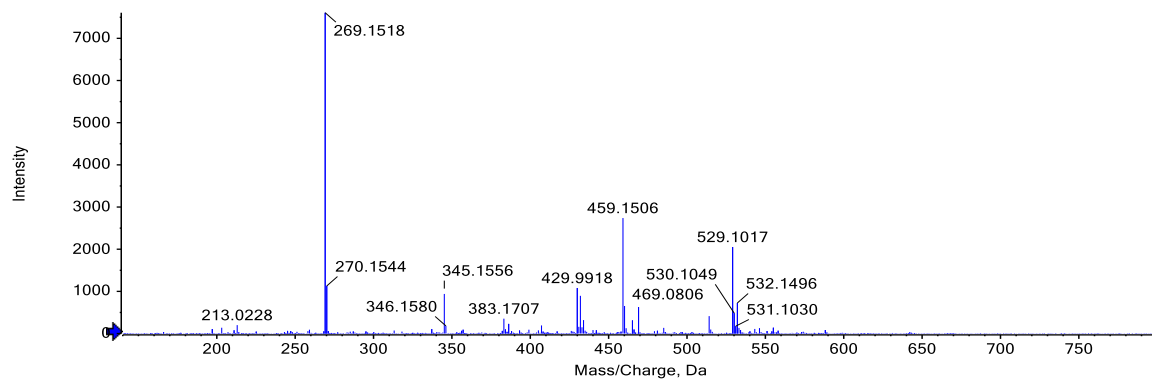


Abbildung C.41: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309,0).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Hu...UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 22.816 to 22.882 min)



Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_Hu...eriment 11, -TOF MS² of 469.1 (70 - 500) from 22.789 to 22.811 min)

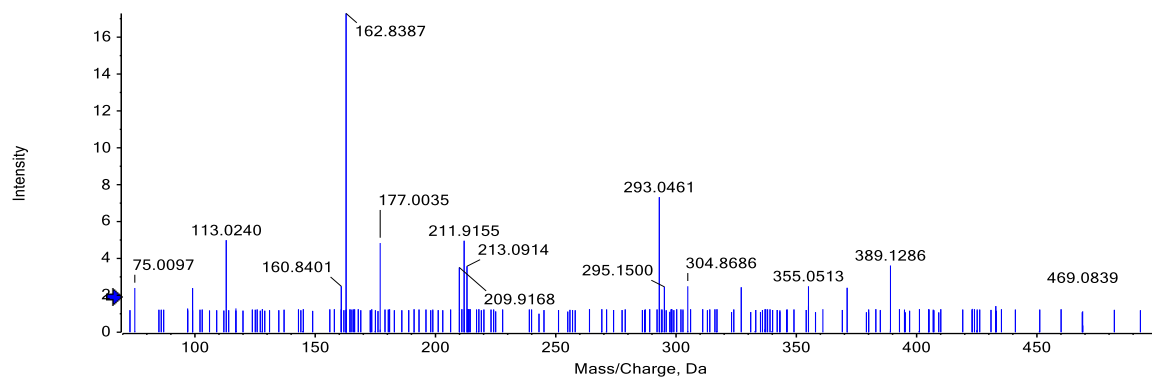


Abbildung C.42: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Lunularin-Sulfoglucuronids (m/z 469, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

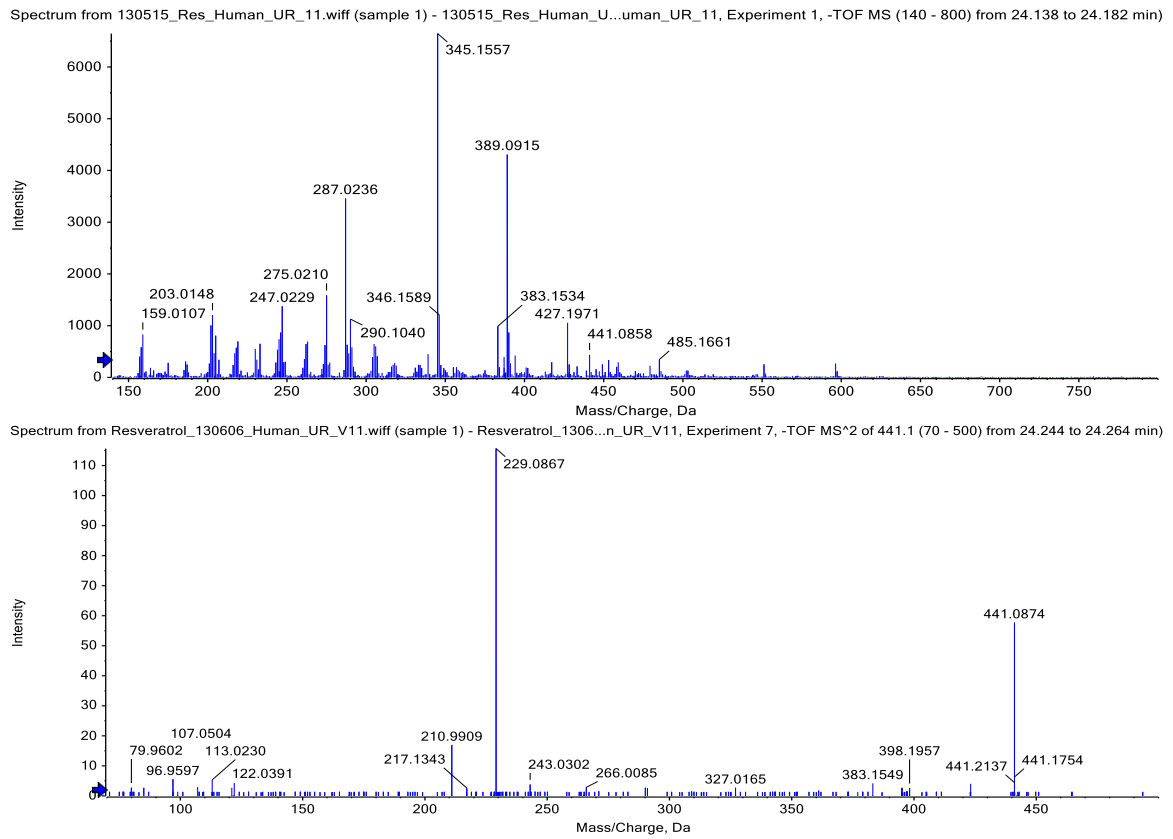
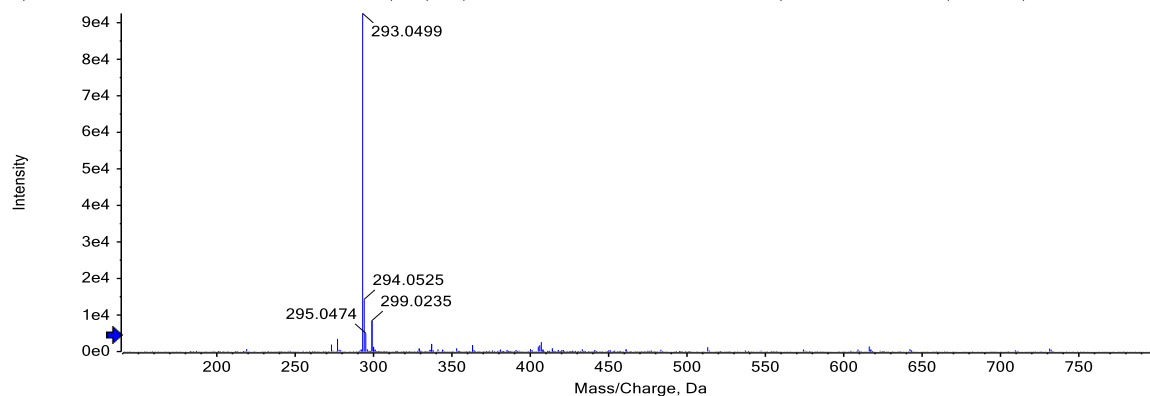


Abbildung C.43: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Ribosylsulfats (m/z 441, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res...es_Human_UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 25.593 min)



Spectrum from Resveratrol_130606_Human_UR_V18.wiff (sample 1) - Resveratro...8, Experiment 8, -TOF MS² of 293.1 (70 - 350) from 25.669 to 25.690 min)

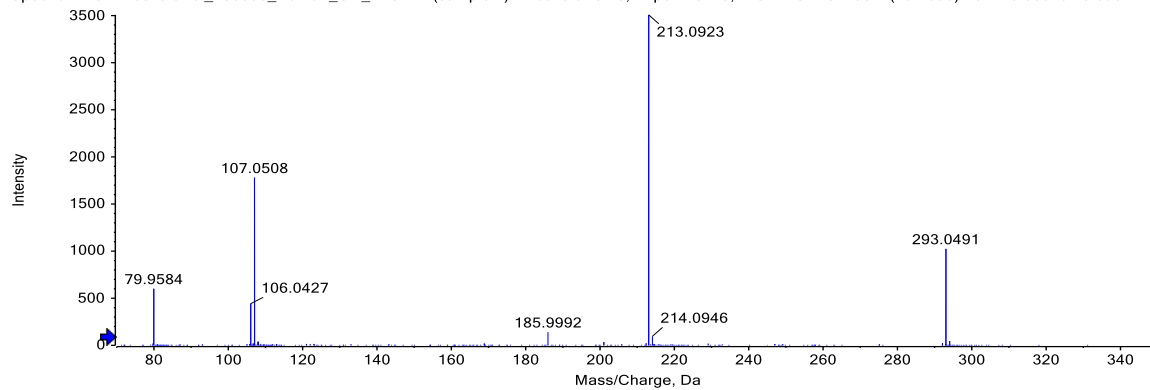
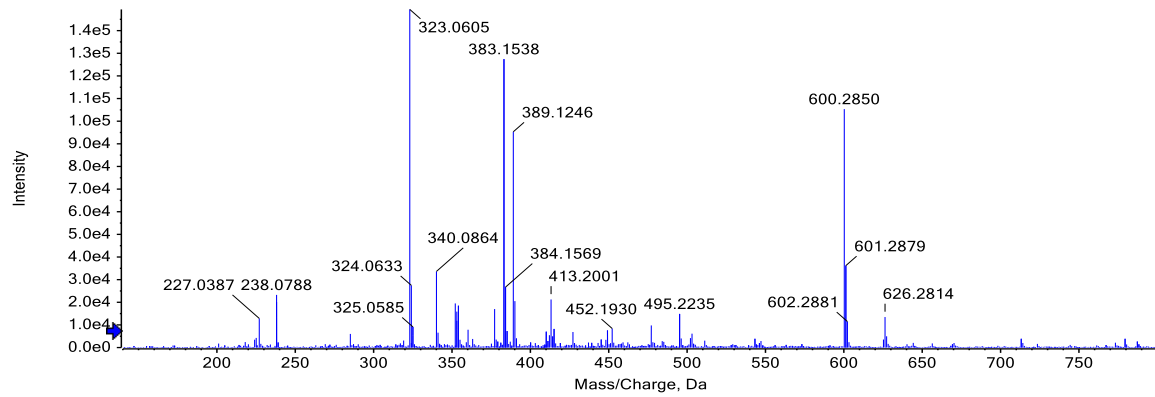


Abbildung C.44: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Lunularin-Sulfats (m/z 293, 1).

C.5 Metaboliten in humanen Urinproben

Spectrum from 130515_Res_Human_UR_18.wiff (sample 1) - 130515_Res_H...UR_18, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 25.417 to 25.439 min)



Spectrum from Resveratrol_130606_Human_UR_V18.wiff (sample 1) - Resveratro..., Experiment 10, -TOF MS² of 389.1 (70 - 400) from 25.693 to 25.714 min)

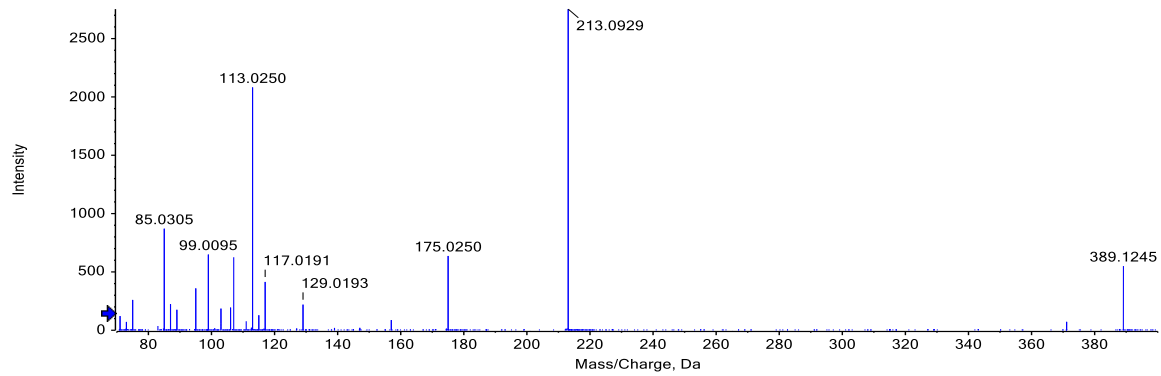


Abbildung C.45: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Lunularin-Glucuronids (m/z 389, 1).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

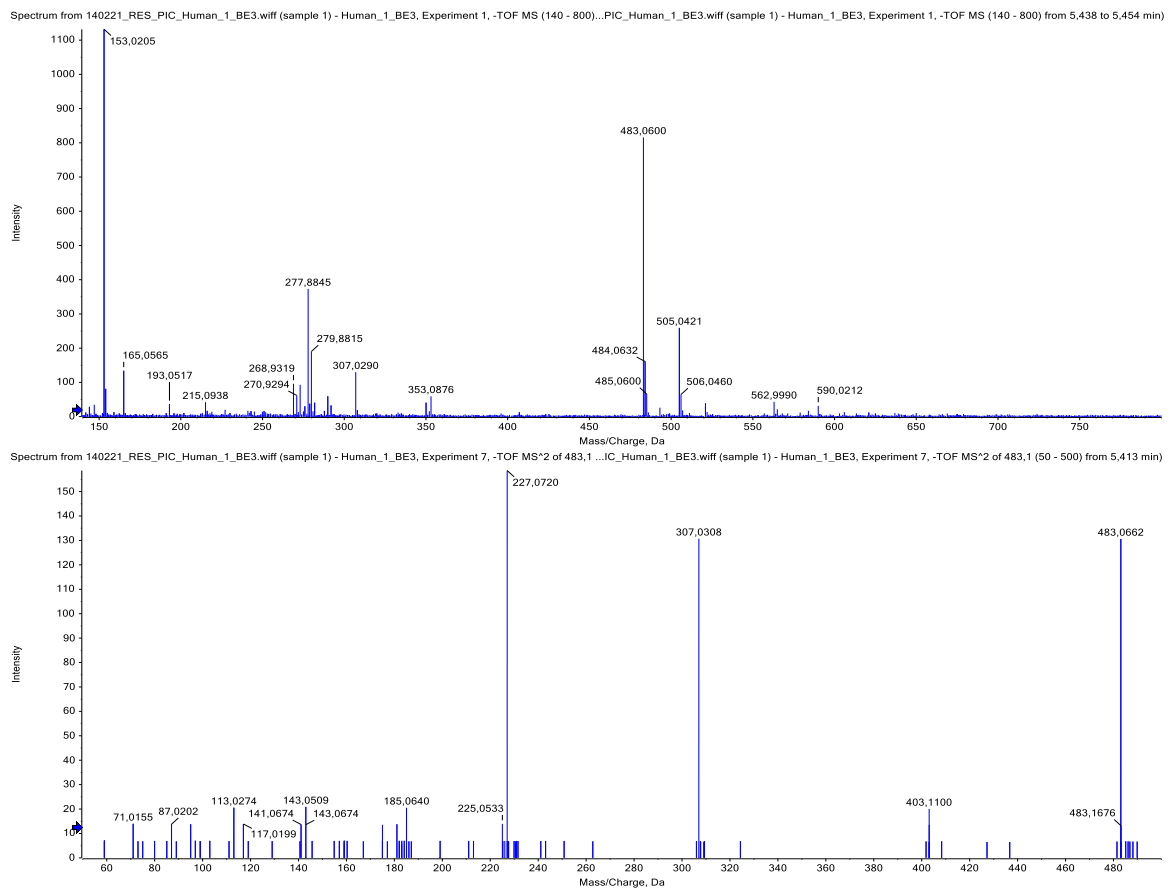


Abbildung C.46: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 483, 1).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

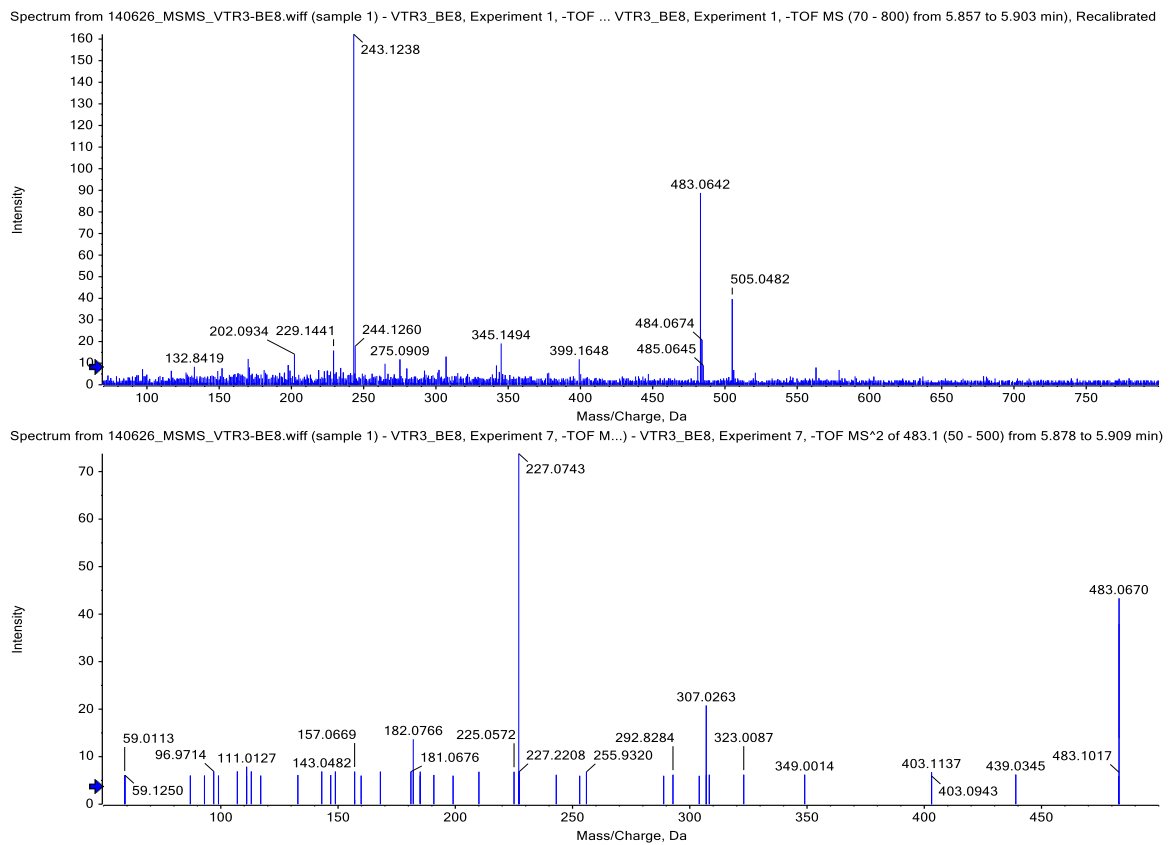
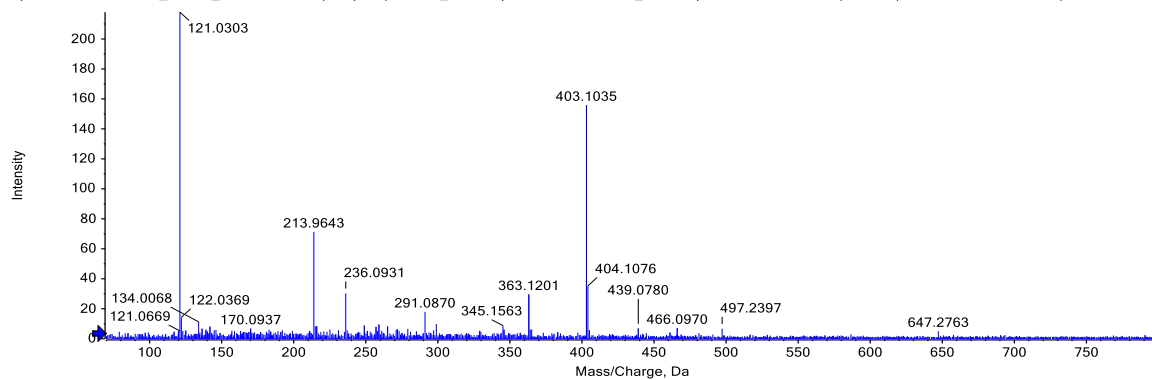


Abbildung C.47: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 483,1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 1, -TO...R3_BE8, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 5.857 to 5.903 min, Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 4, -TO... VTR3_BE8, Experiment 4, -TOF MS*2 of 403.1 (50 - 420) from 6.156 to 6.172 min)

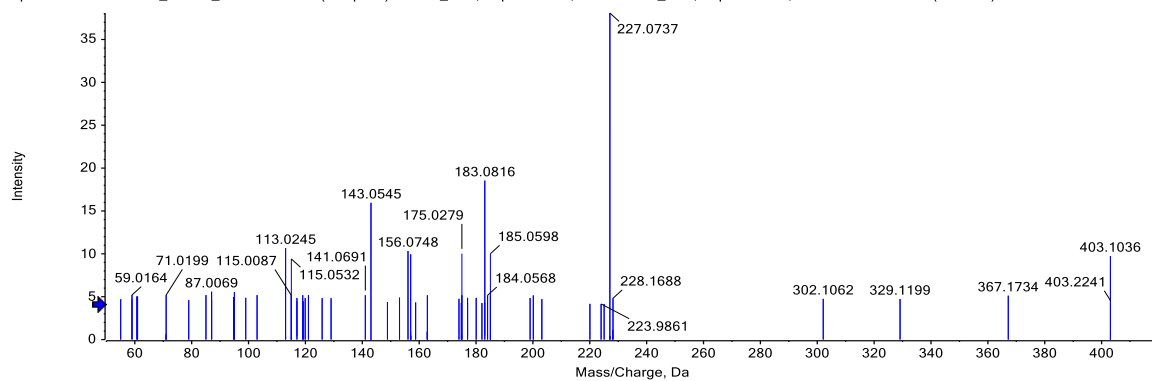


Abbildung C.48: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-4'-O-Glucuronid (m/z 403,1).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

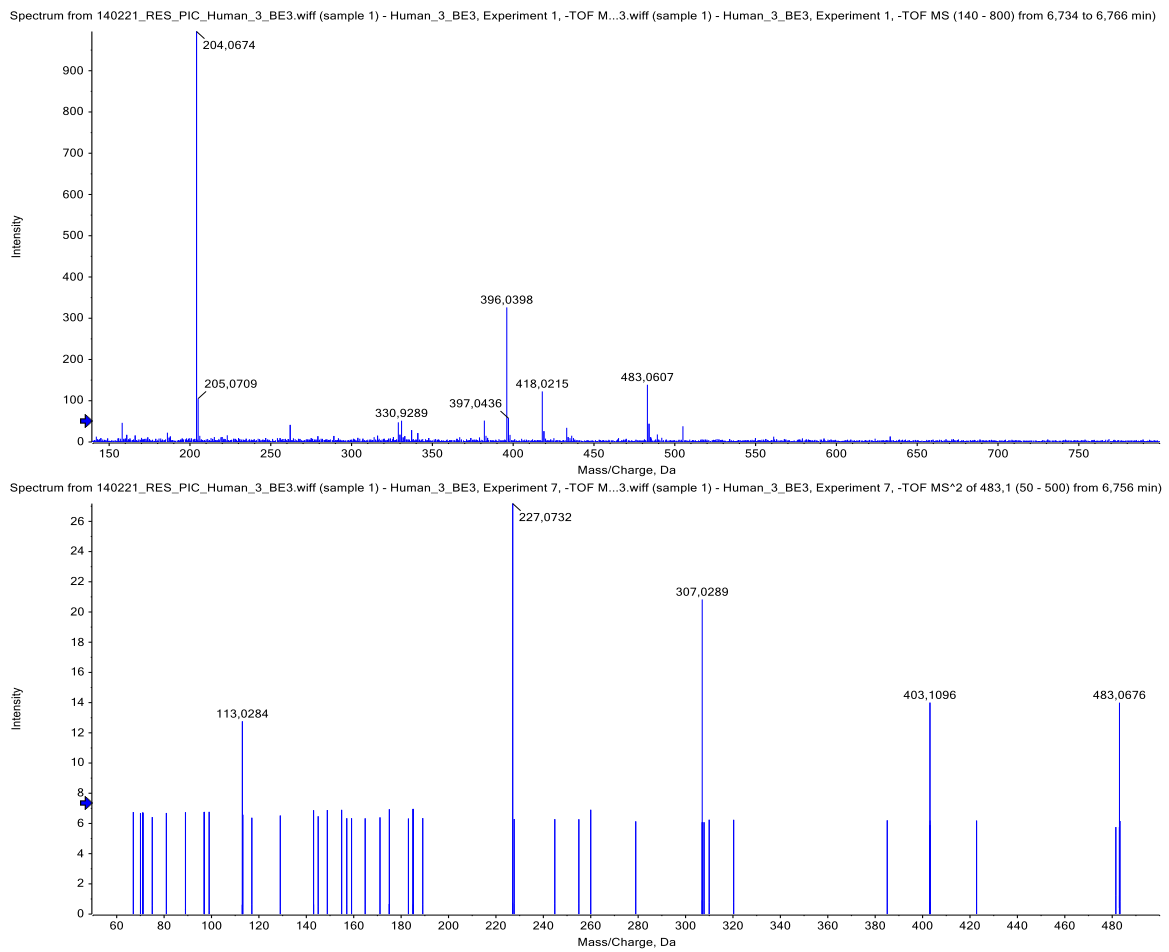
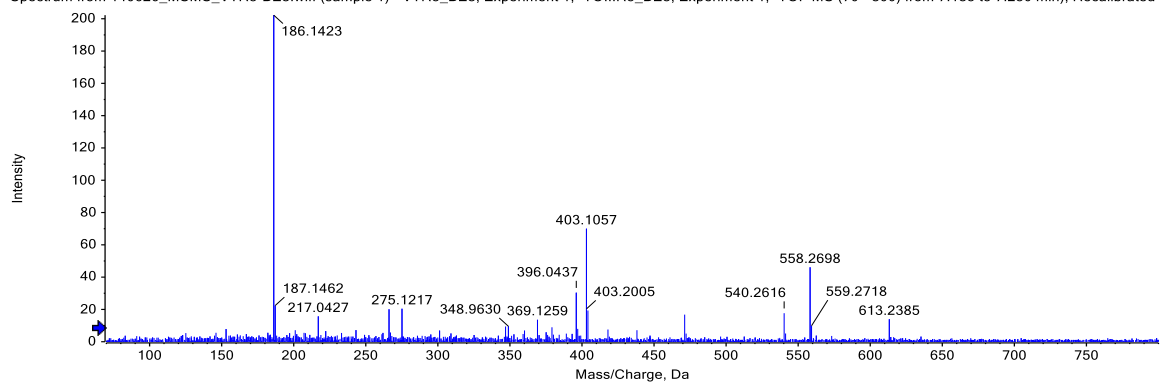


Abbildung C.49: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 483,1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 1, -TO...R3_BE8, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 7.183 to 7.230 min, Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 4, -TO... VTR3_BE8, Experiment 4, -TOF MS*2 of 403.1 (50 - 420) from 7.108 to 7.139 min)

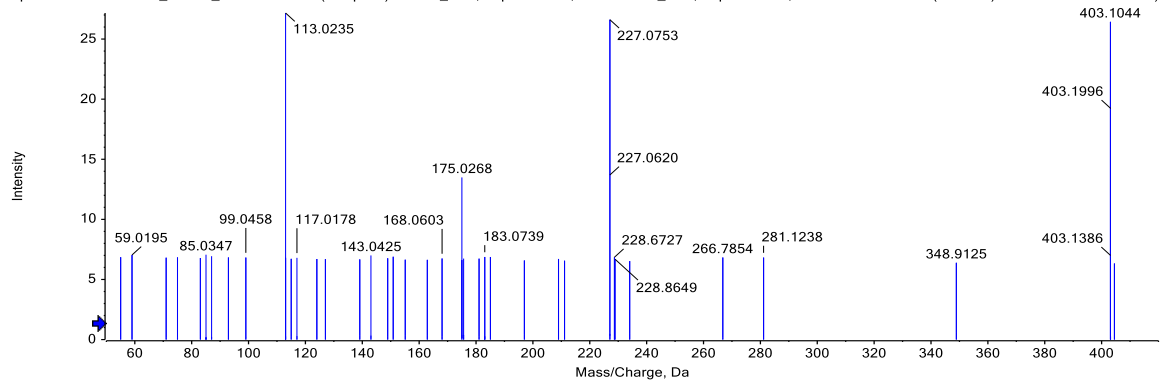


Abbildung C.50: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucuronid (m/z 403, 1).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

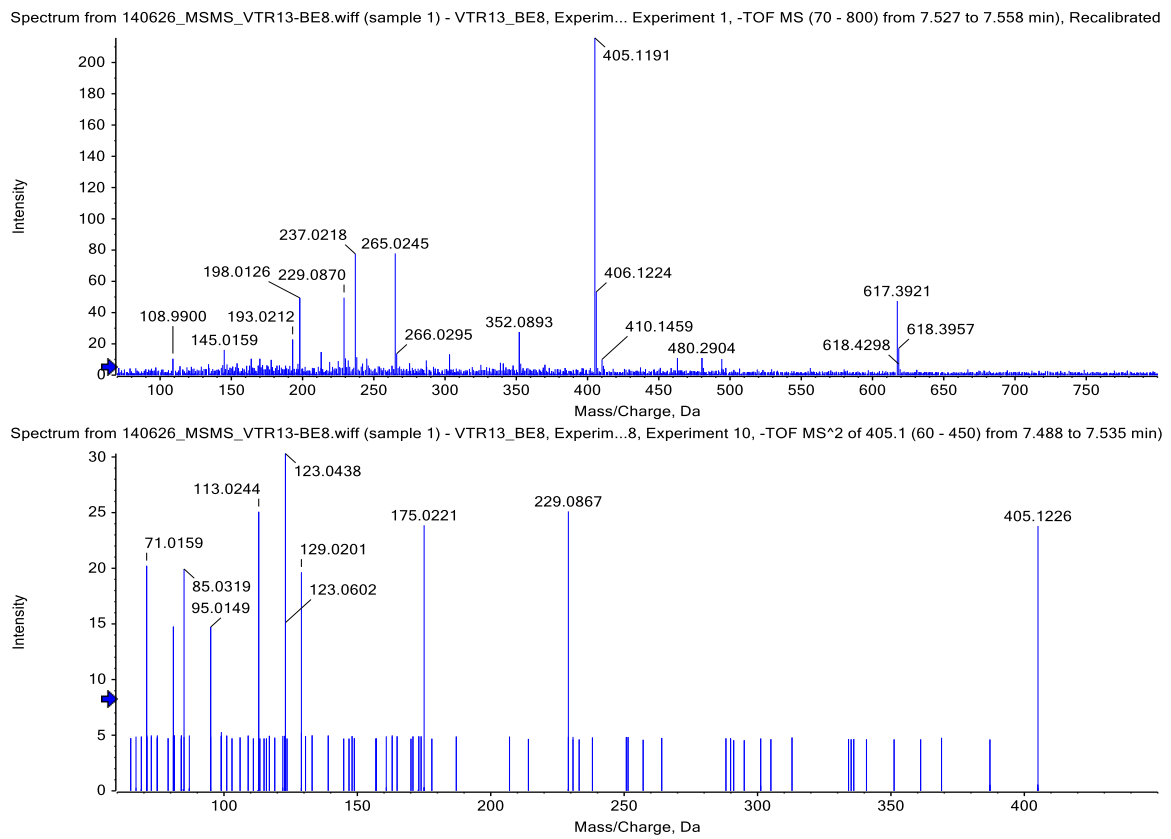
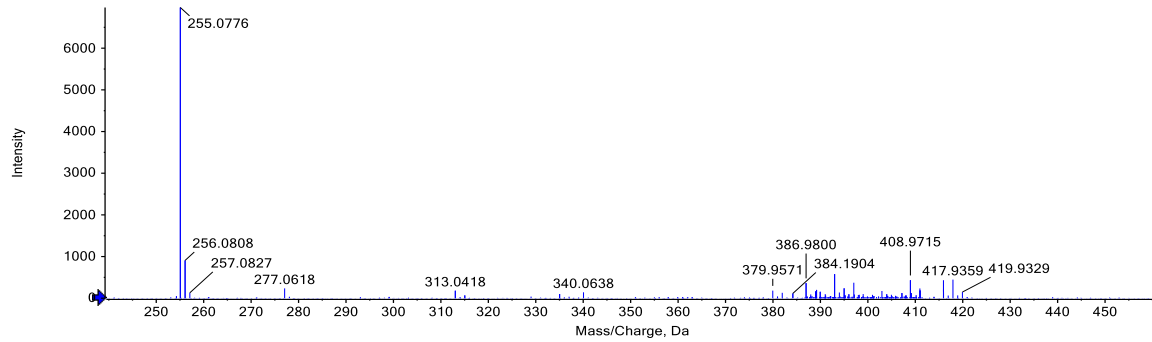


Abbildung C.51: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485,1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 1, -TO...R3_BE8, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 8.073 to 8.104 min, Recalibrated
←x20.0→



Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 5, -TO... VTR3_BE8, Experiment 5, -TOF MS*2 of 387.0 (50 - 400) from 8.108 to 8.123 min)

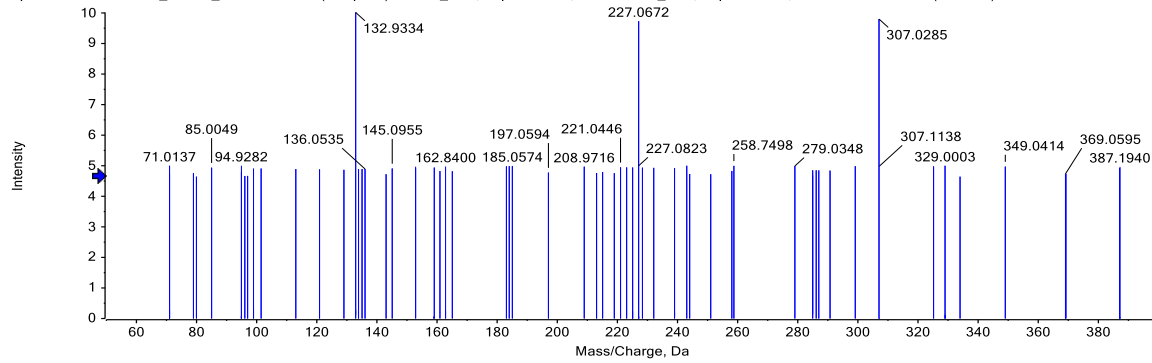


Abbildung C.52: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Disulfats (m/z 387, 0).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

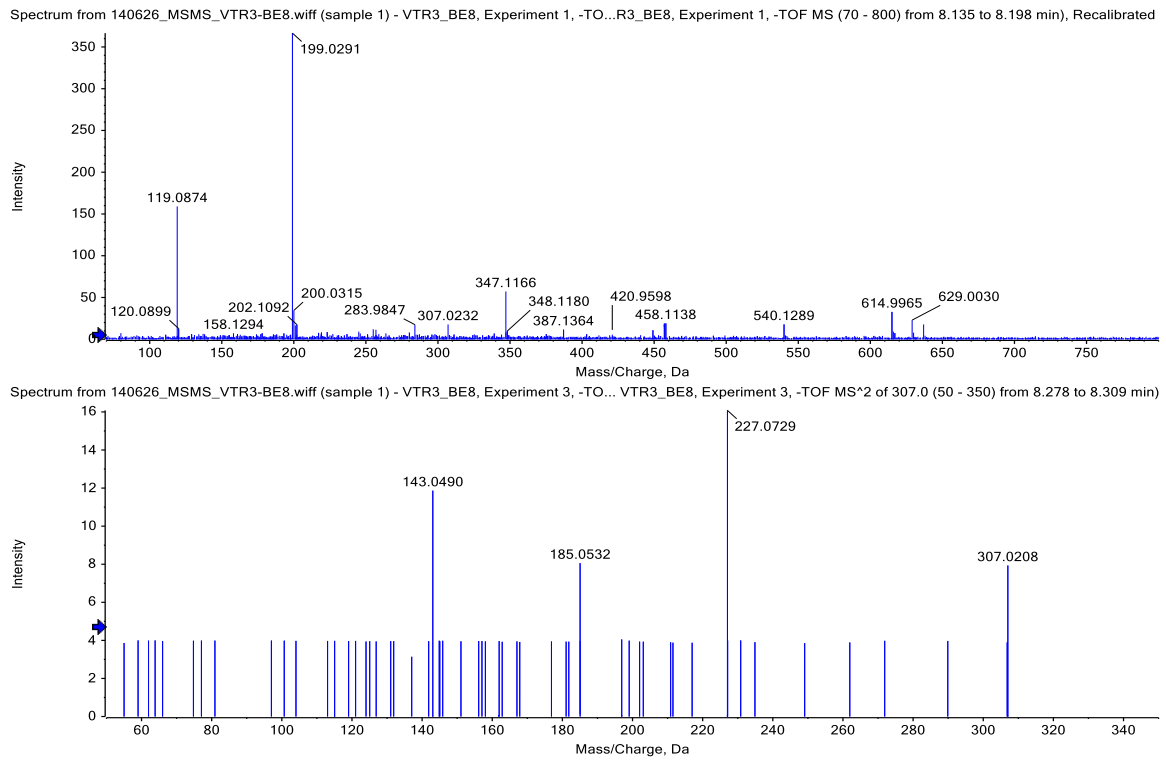
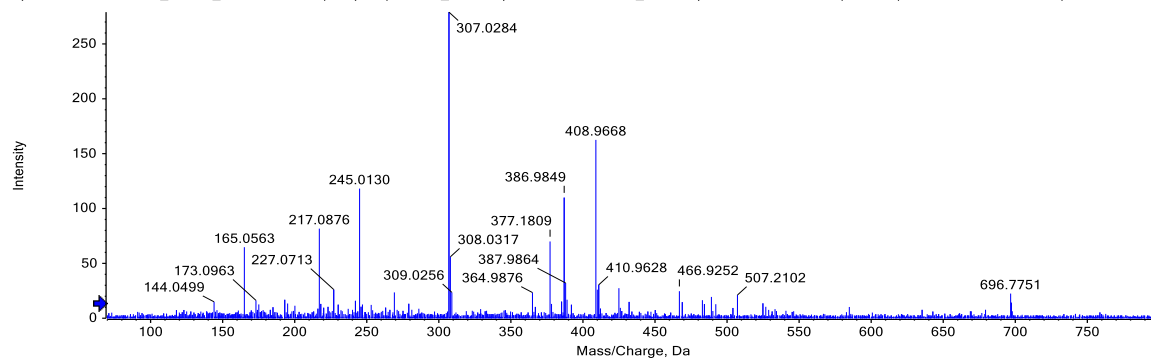


Abbildung C.53: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfats (m/z 307, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 1, -TO...R3_BE8, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 8.900 to 8.931 min, Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 5, -TO... VTR3_BE8, Experiment 5, -TOF MS*2 of 387.0 (50 - 400) from 8.966 to 8.997 min)

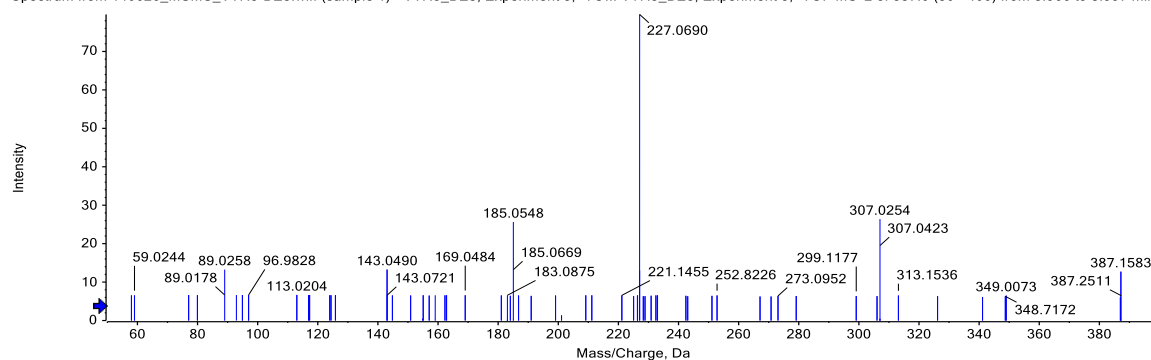


Abbildung C.54: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Disulfats (m/z 387, 0).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

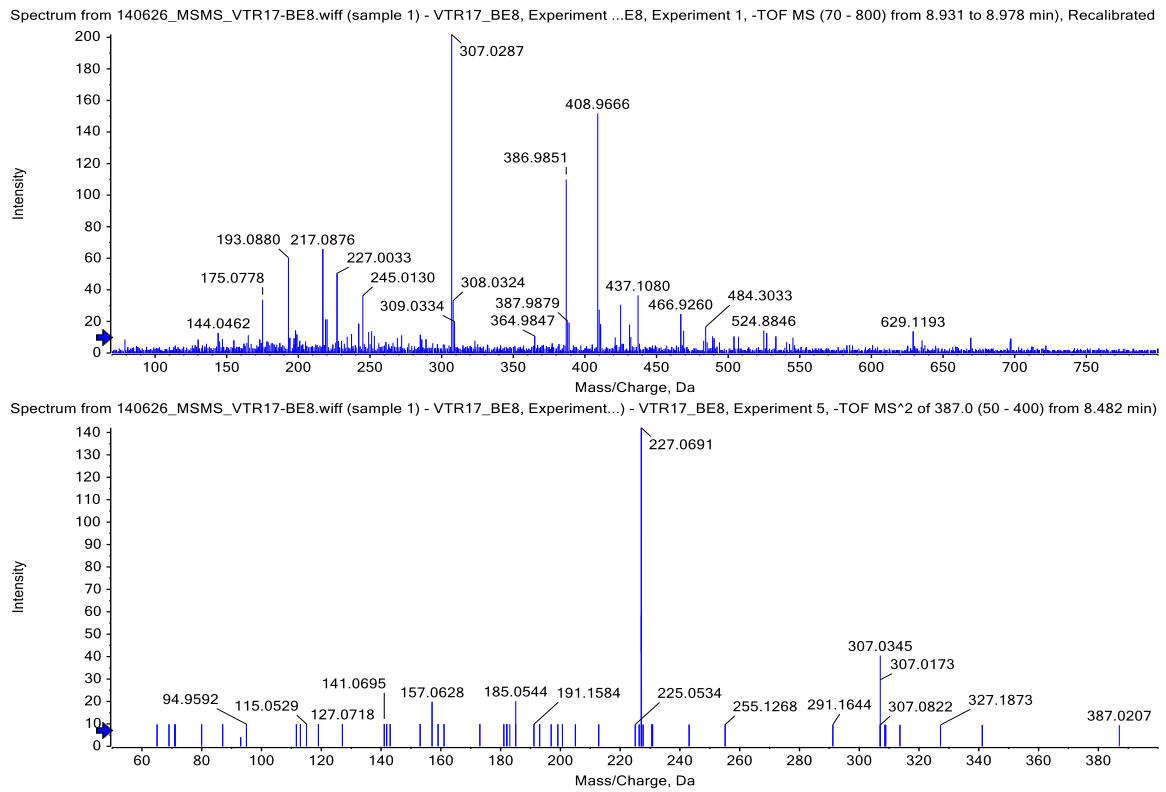
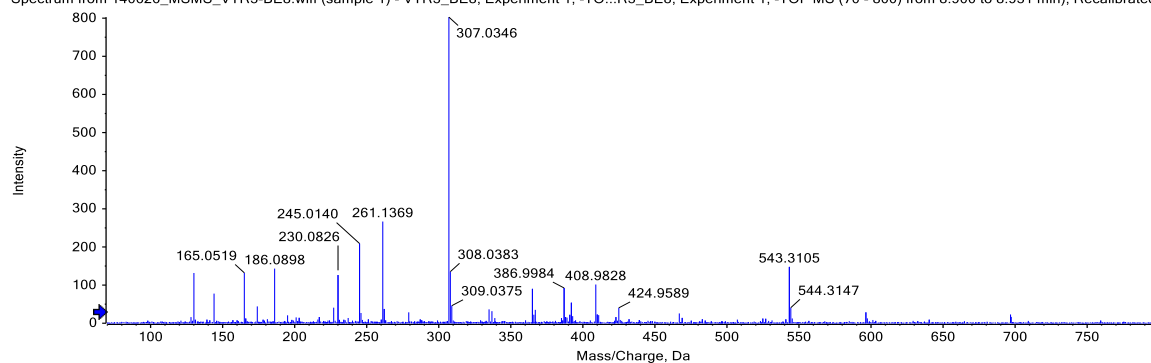


Abbildung C.55: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Disulfats (m/z 387,0).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 1, -TO...R3_BE8, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 8.900 to 8.931 min, Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_VTR3-BE8.wiff (sample 1) - VTR3_BE8, Experiment 3, -TO... VTR3_BE8, Experiment 3, -TOF MS*2 of 307.0 (50 - 350) from 8.965 to 8.996 min)

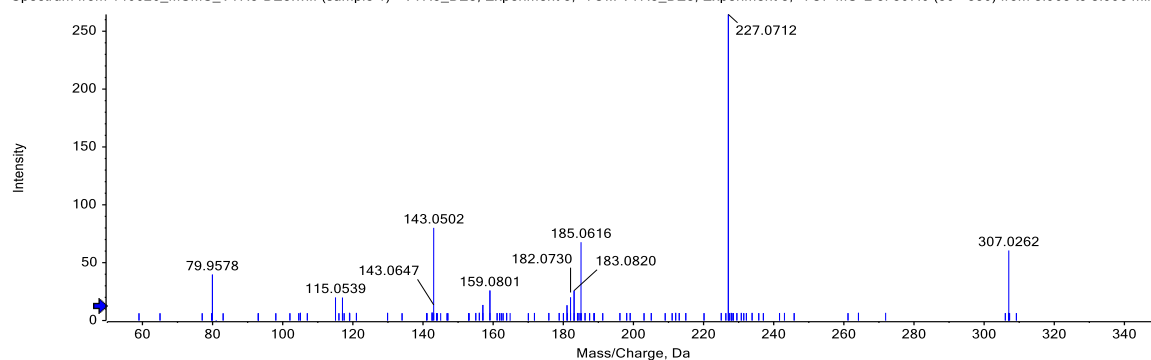


Abbildung C.56: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-Sulfat (m/z 307,1).

C.6 Metaboliten in humanen Plasmaproben

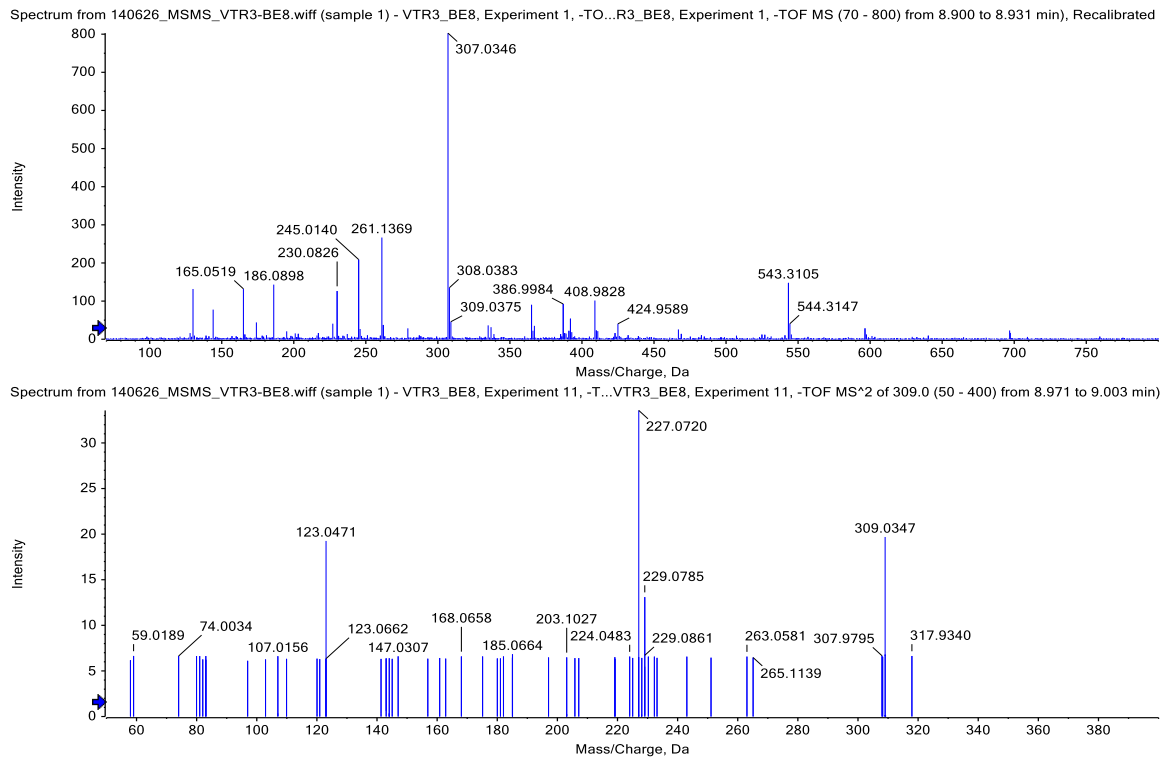
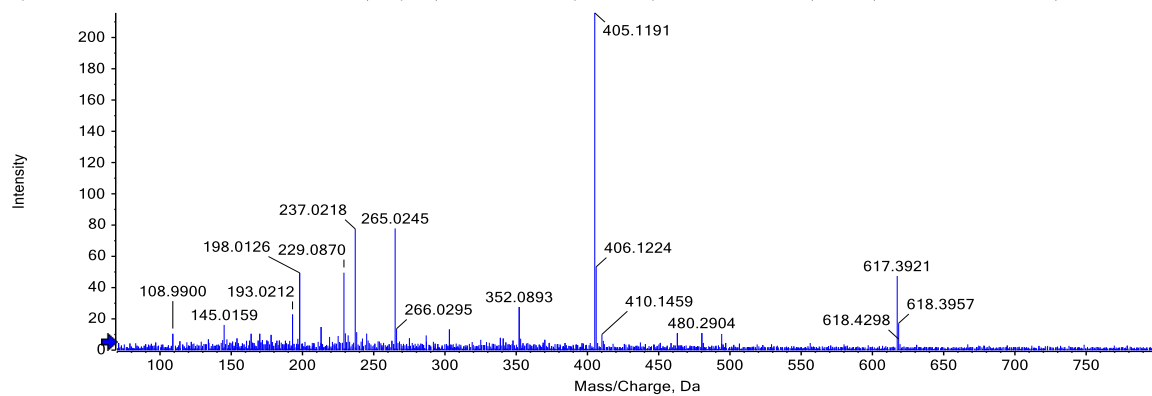


Abbildung C.57: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_VTR13-BE8.wiff (sample 1) - VTR13_BE8, Experim... Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 7.527 to 7.558 min), Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_VTR13-BE8.wiff (sample 1) - VTR13_BE8, Experim...8, Experiment 10, -TOF MS² of 405.1 (60 - 450) from 7.488 to 7.535 min)

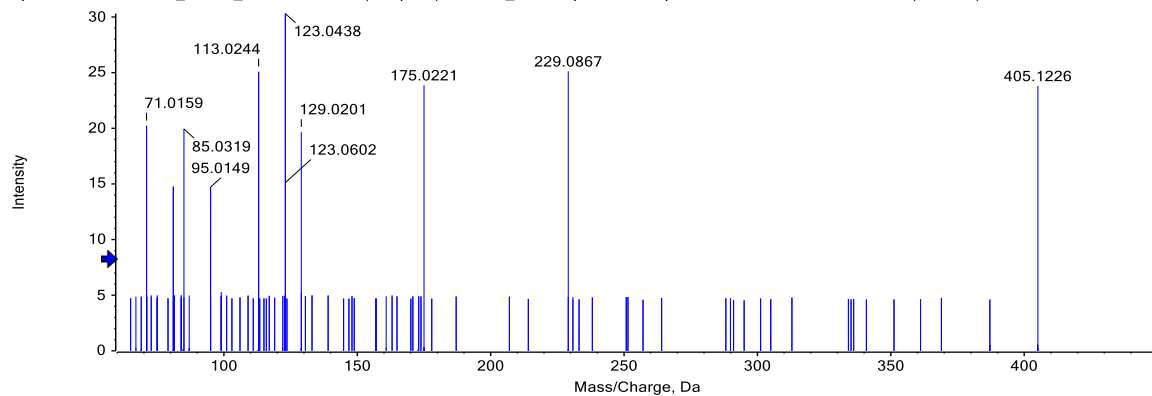
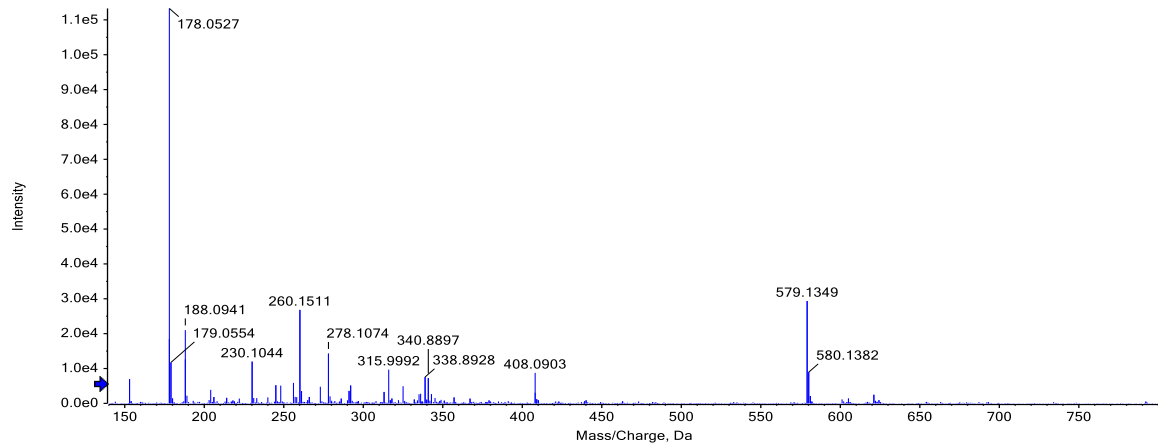


Abbildung C.58: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...Maus_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 6.174 to 6.193 min)



Spectrum from Resveratrol_130513_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - Resveratrol_...Res_M7, Experiment 3, -TOF MS² of 579.1 (70 - 600) from 6.598 to 6.620 min)

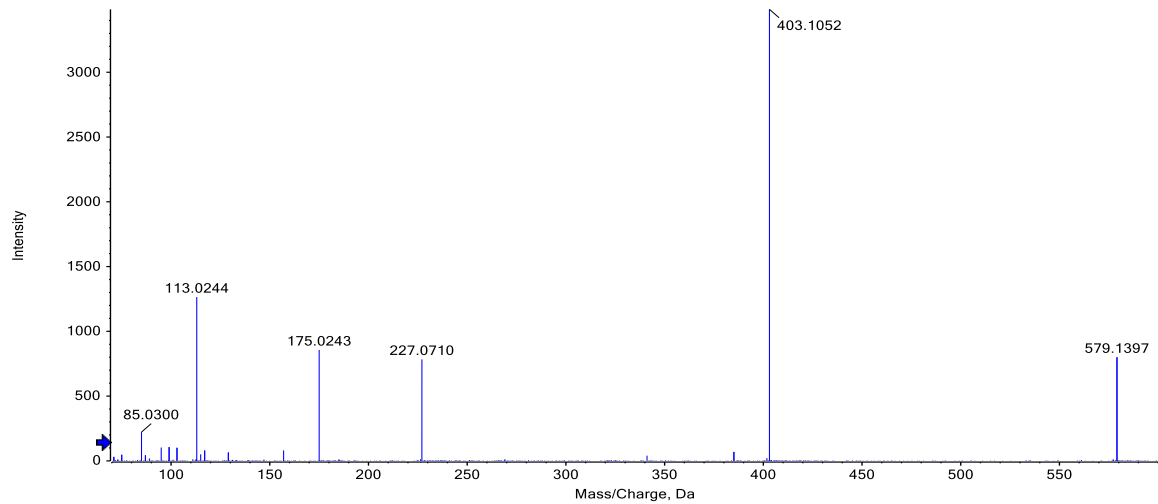
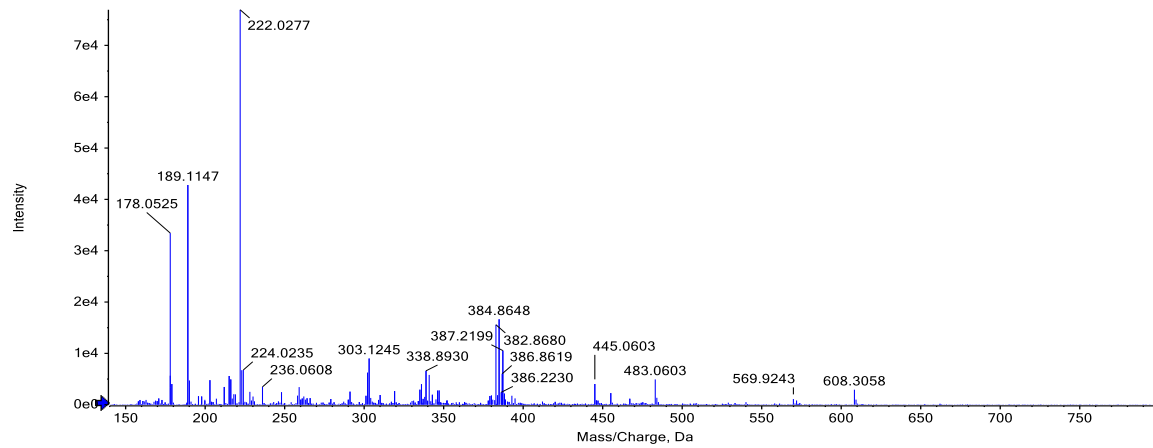


Abbildung C.59: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Digluconids (m/z 579, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...Maus_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 7.516 to 7.553 min)



Spectrum from Resveratrol_130513_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - Resveratrol_..._Res_M7, Experiment 7, -TOF MS² of 483.1 (70 - 500) from 7.640 to 7.662 min)

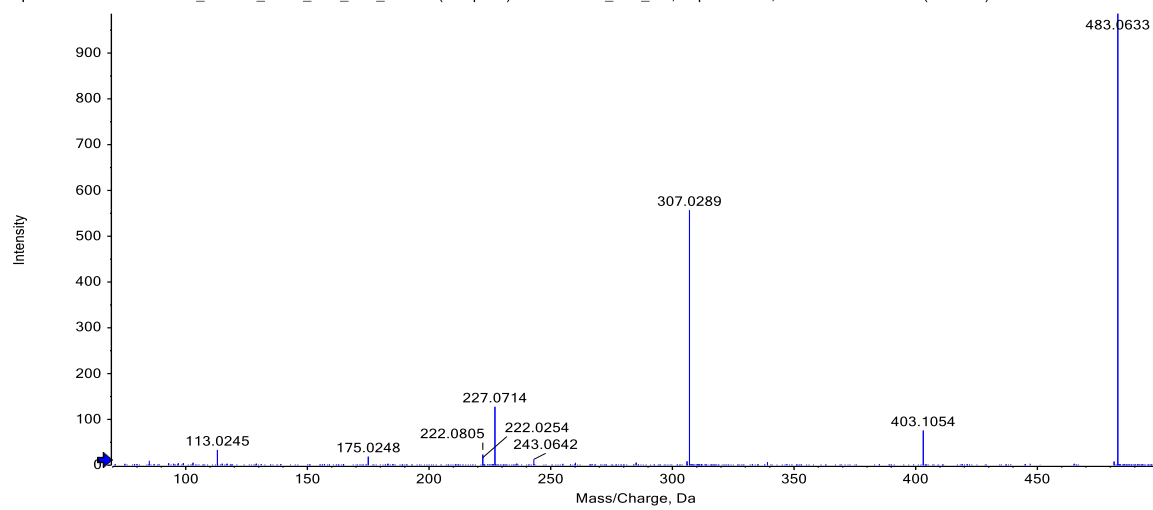
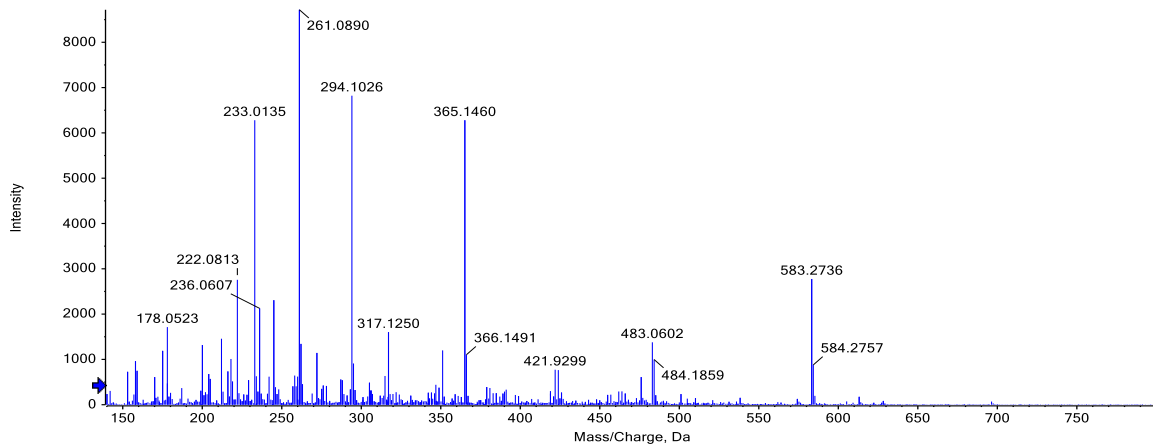


Abbildung C.60: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 483, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...Maus_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 7.442 to 7.479 min)



Spectrum from Resveratrol_130513_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - Resveratr..._Res_M7, Experiment 7, -TOF MS² of 483.1 (70 - 500) from 7.640 to 7.662 min)

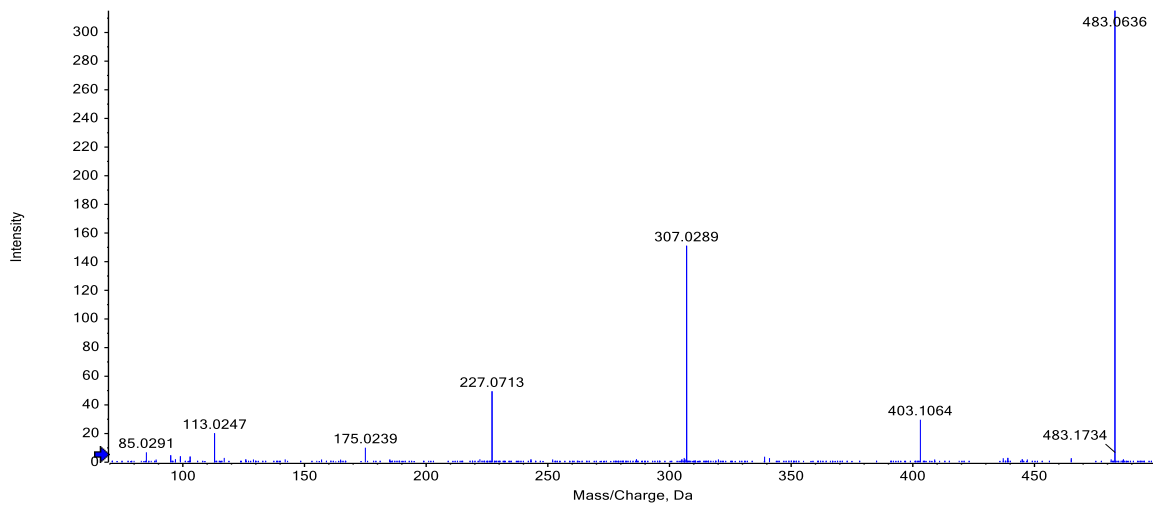
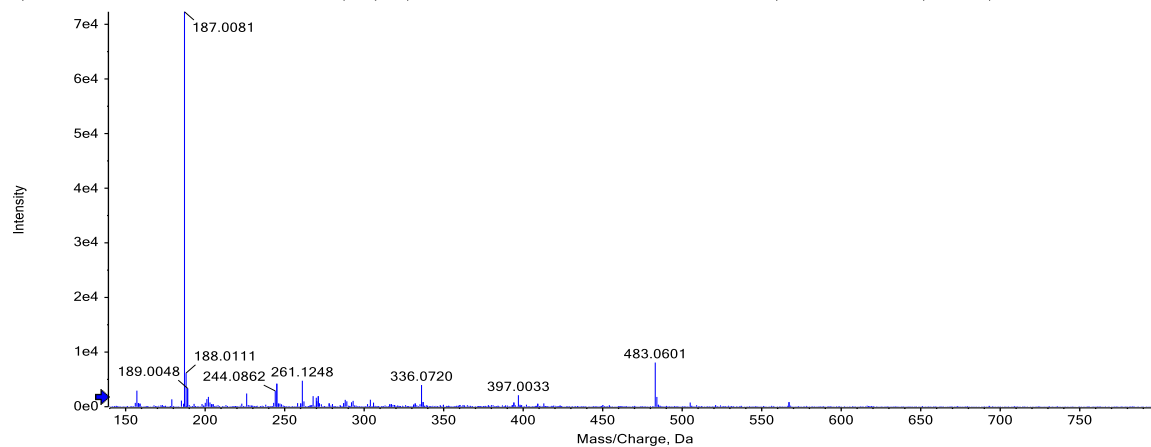


Abbildung C.61: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 483,1).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...Maus_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 8.709 to 8.746 min)



Spectrum from Resveratrol_130513_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - Resveratrol_...Res_M7, Experiment 7, -TOF MS² of 483.1 (70 - 500) from 8.985 to 9.007 min)

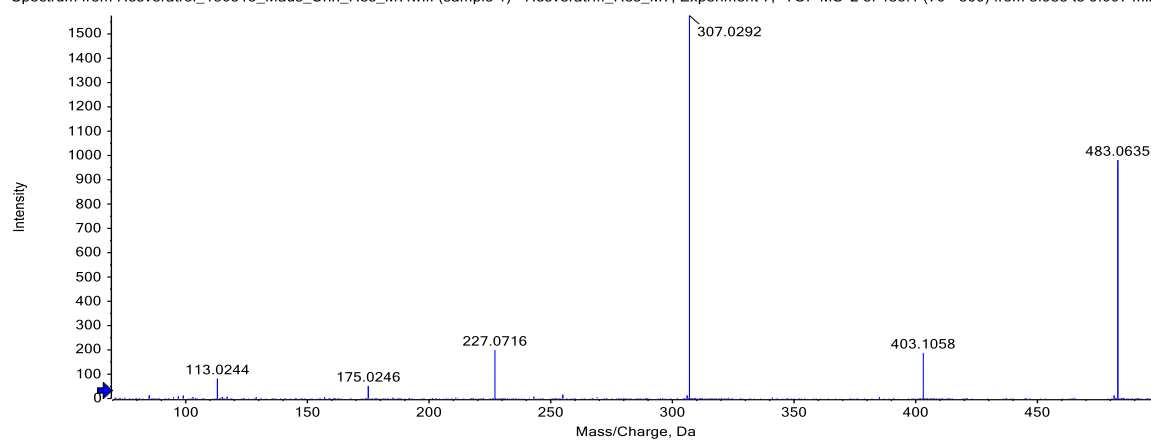


Abbildung C.62: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfolglucuronids (m/z 483, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

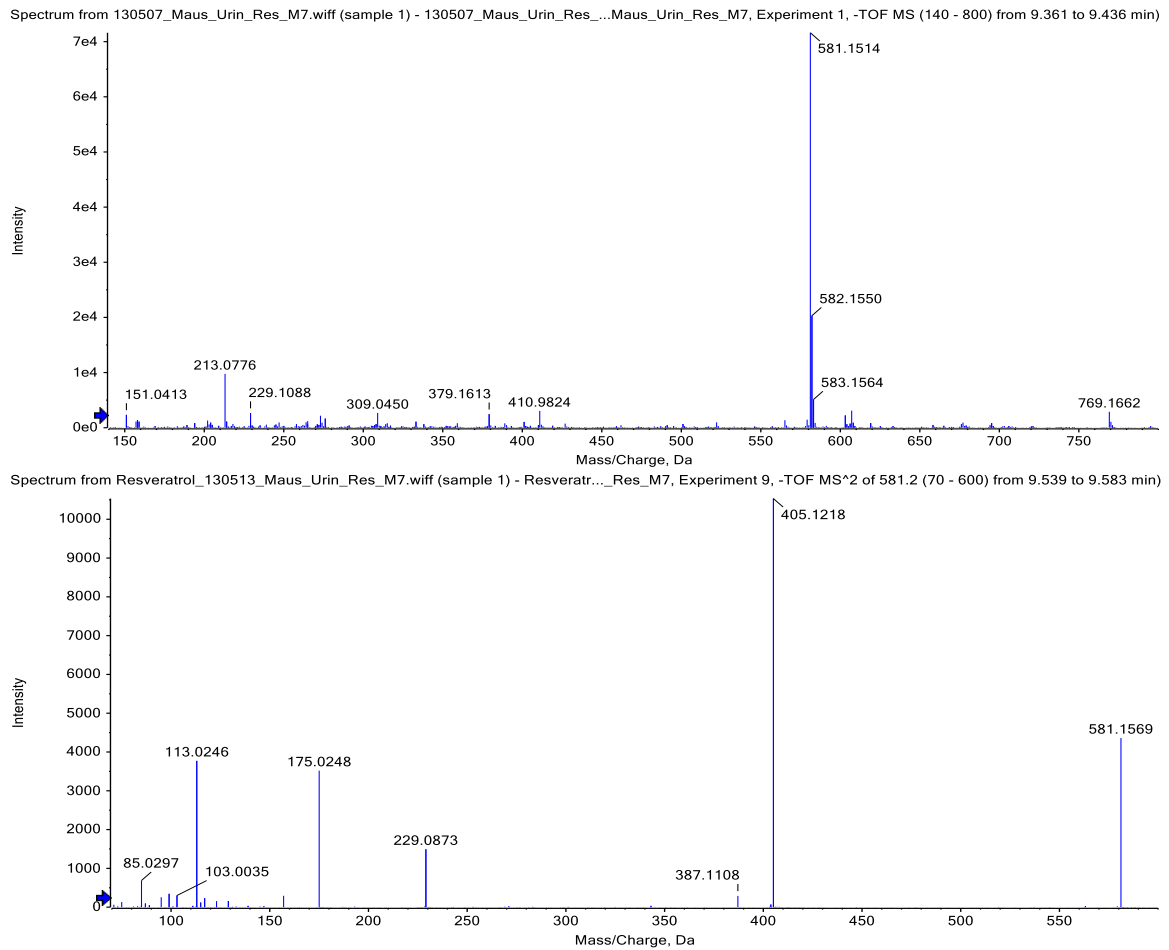
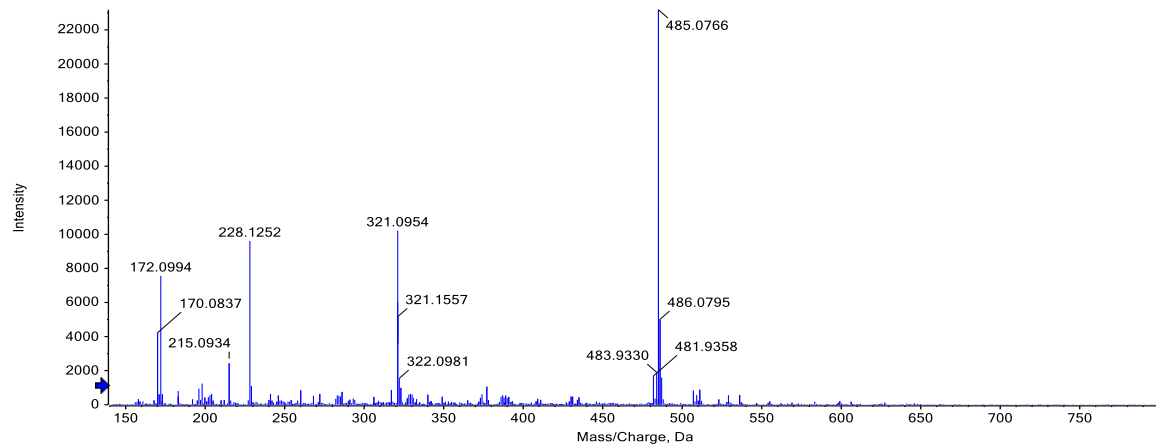


Abbildung C.63: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Diglucuronids (m/z 581,2).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...us_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 10.070 to 10.107 min)



Spectrum from Resveratrol_130513_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - Resveratr...s_M7, Experiment 10, -TOF MS² of 485.1 (70 - 500) from 10.092 to 10.158 min)

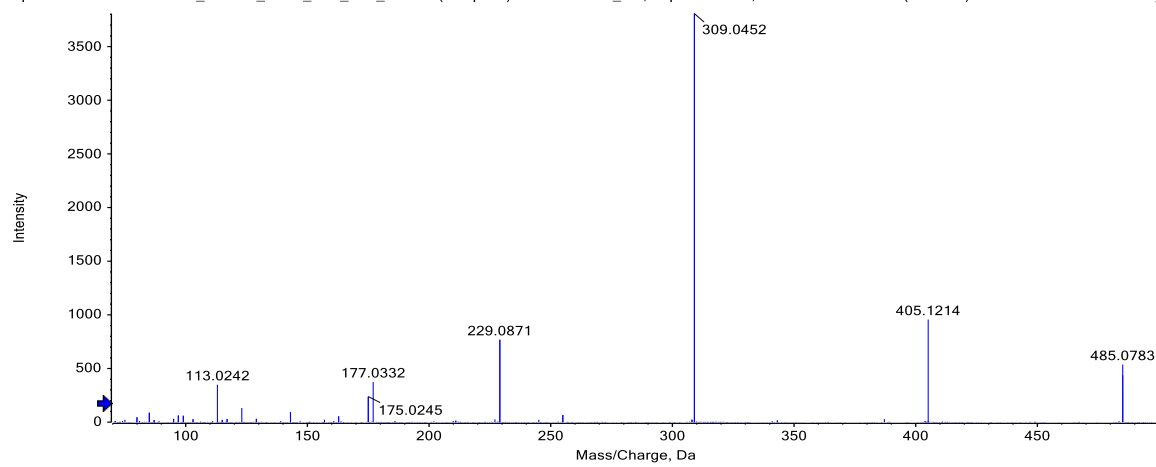


Abbildung C.64: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

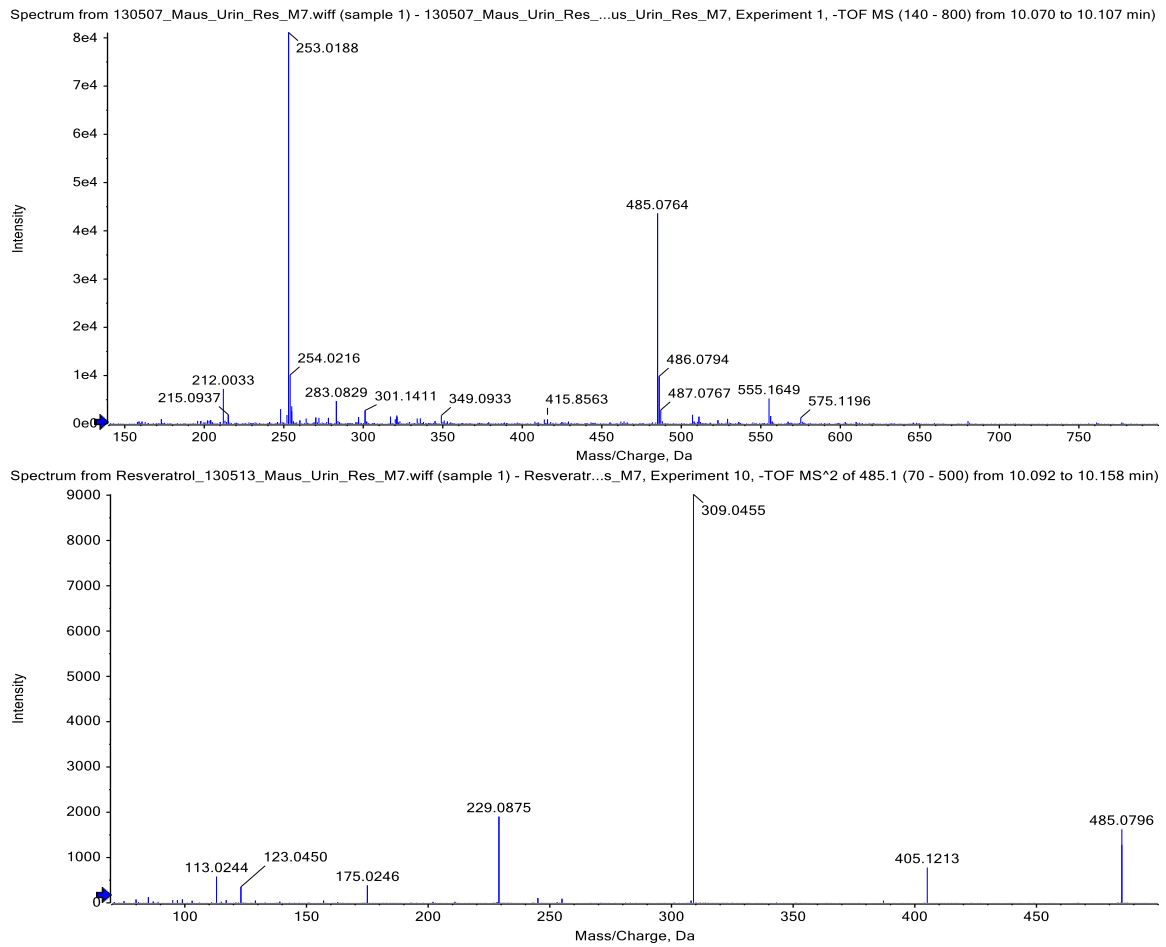
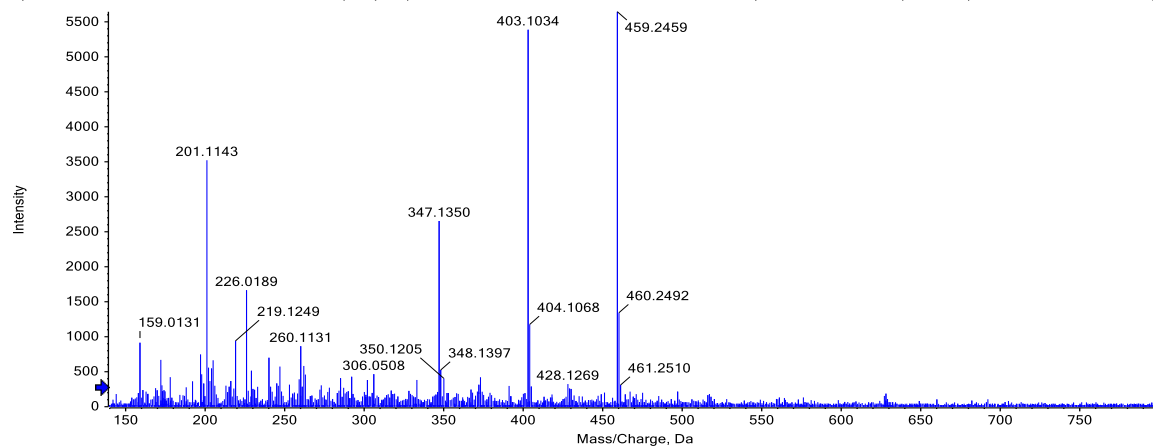


Abbildung C.65: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 485, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...us_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 13.294 to 13.332 min)



Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_M...es_M7, Experiment 5, -TOF MS² of 403.1 (70 - 500) from 13.208 to 13.283 min)

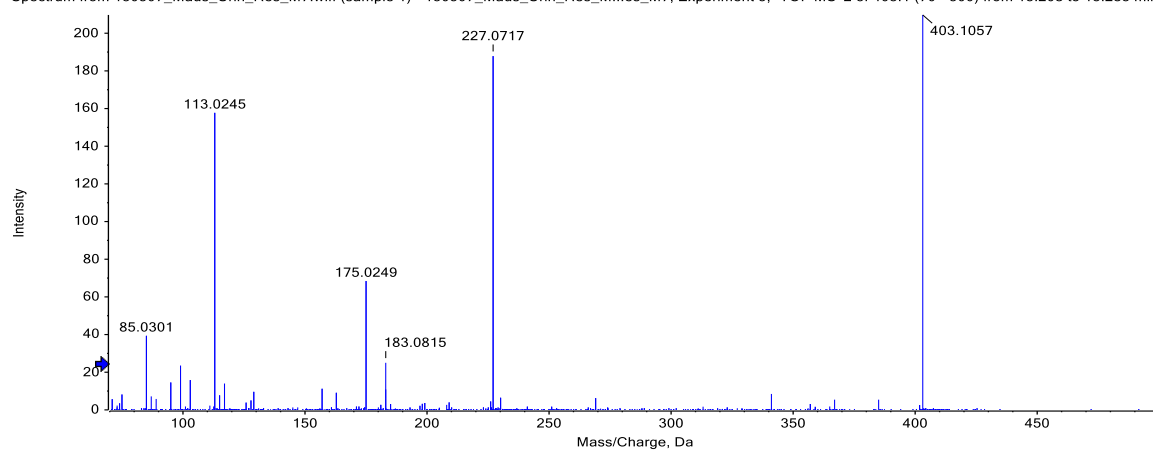


Abbildung C.66: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-4'-O-Glucuronid (m/z 403,1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

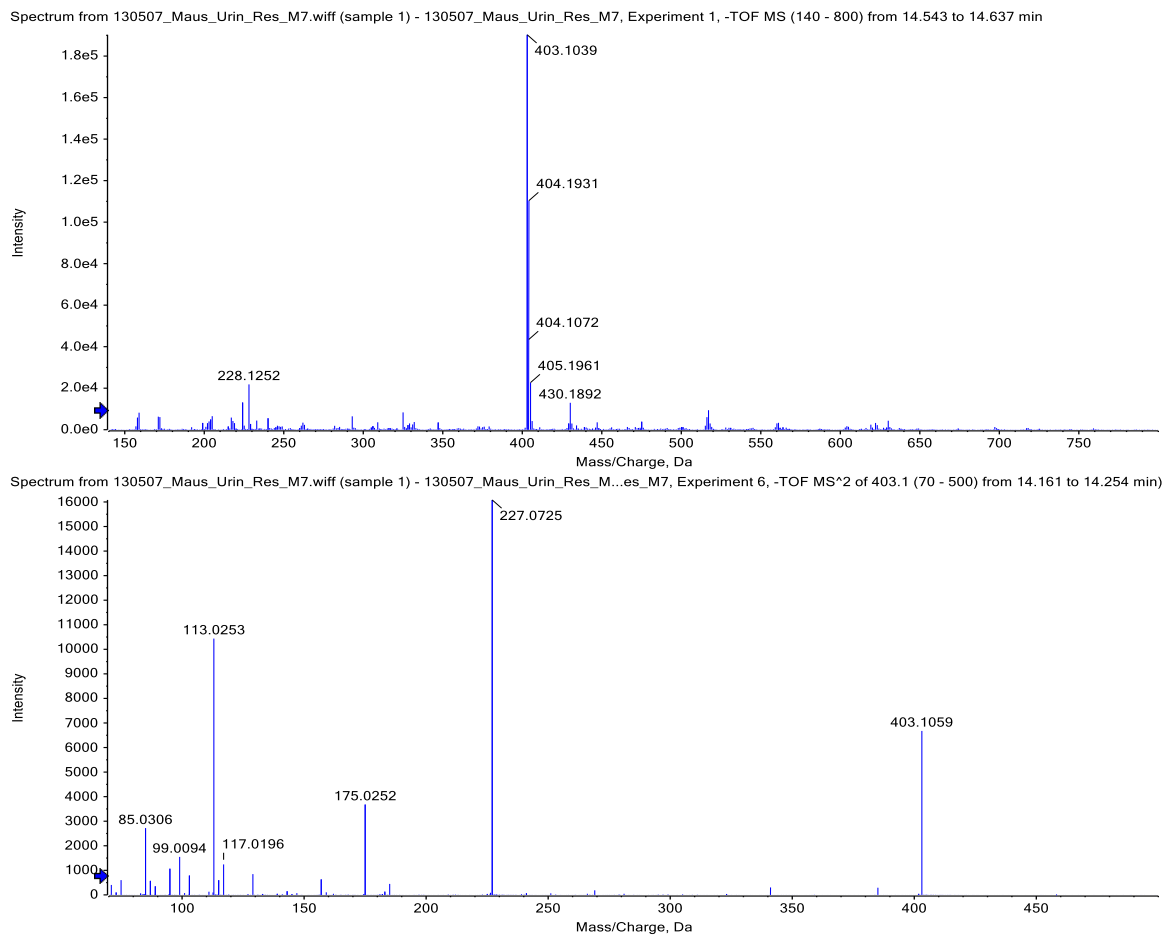
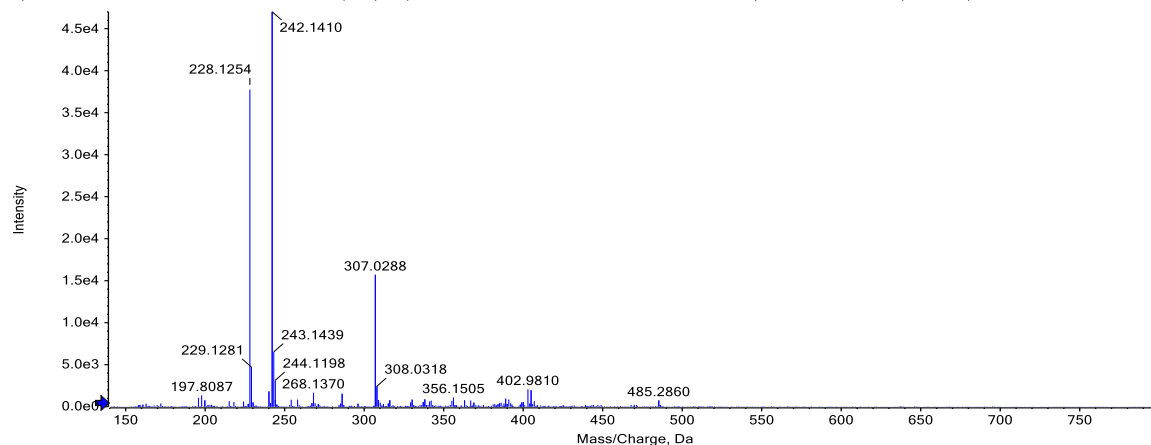


Abbildung C.67: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucuronid (m/z 403, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...us_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 15.158 to 15.252 min)



Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_M...es_M7, Experiment 2, -TOF MS² of 307.0 (70 - 400) from 15.272 to 15.328 min)

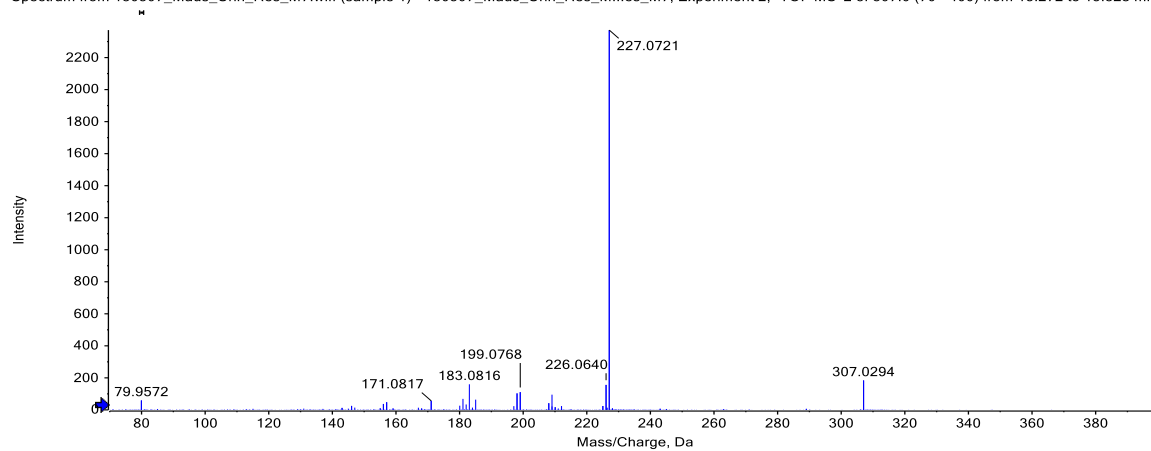
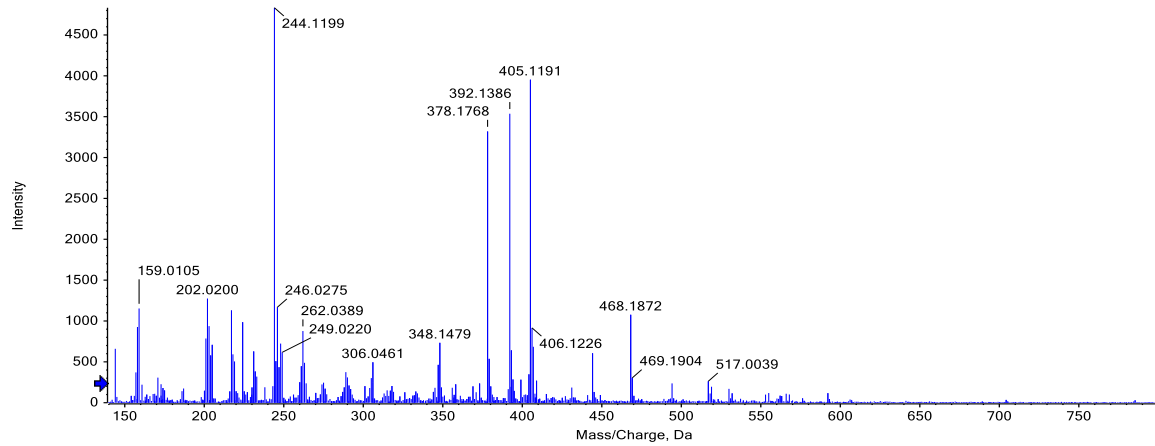


Abbildung C.68: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-Sulfat (m/z 307, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...us_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 15.438 to 15.531 min)



Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_M...es_M7, Experiment 8, -TOF MS² of 405.1 (70 - 500) from 15.376 to 15.562 min)

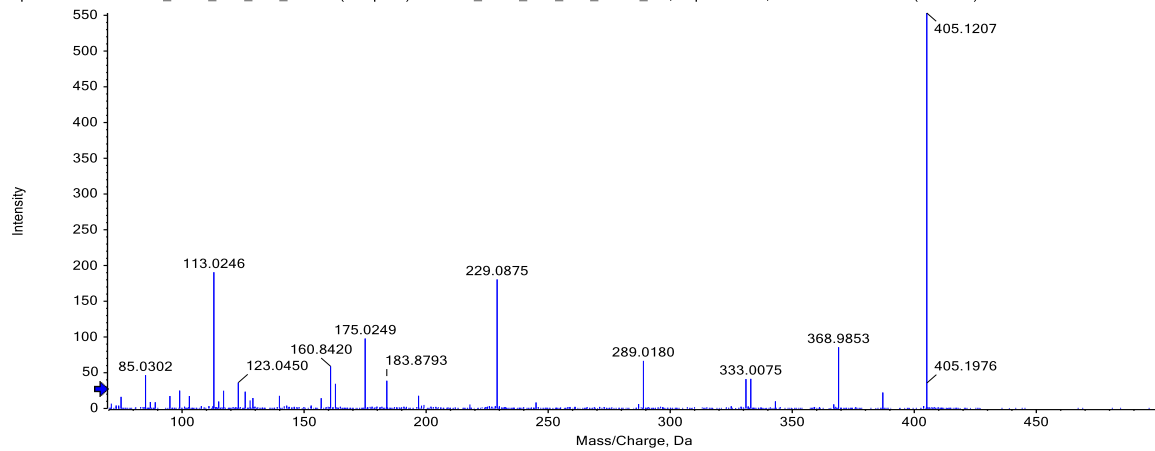
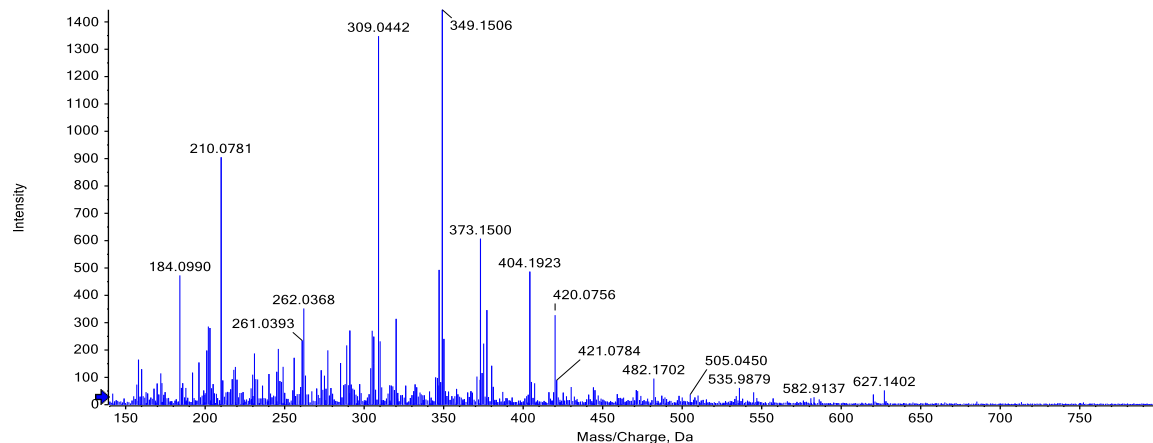


Abbildung C.69: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_...us_Urin_Res_M7, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 16.128 to 16.202 min)



Spectrum from 130507_Maus_Urin_Res_M7.wiff (sample 1) - 130507_Maus_Urin_Res_M...es_M7, Experiment 4, -TOF MS² of 309.0 (70 - 400) from 16.115 to 16.171 min)

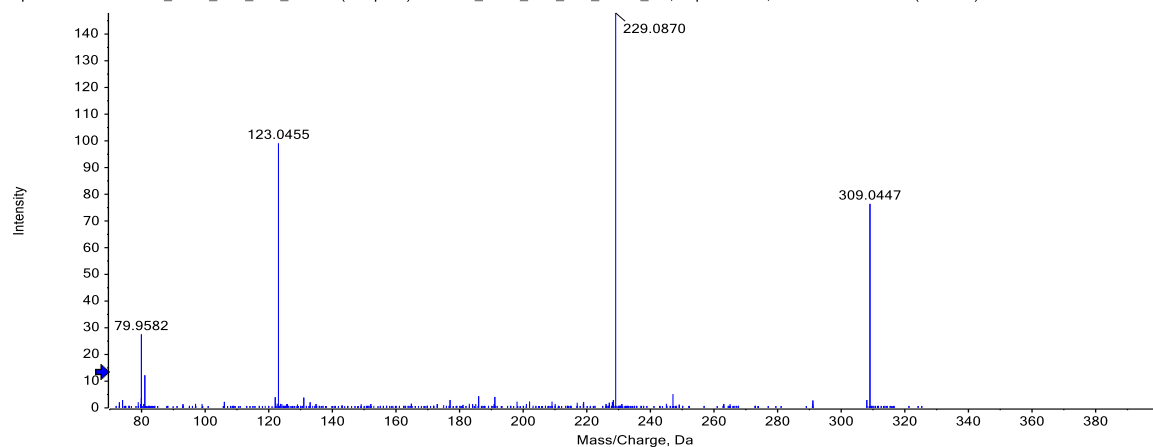


Abbildung C.70: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309, 1).

C.7 Metaboliten in Urinproben aus Mäusen

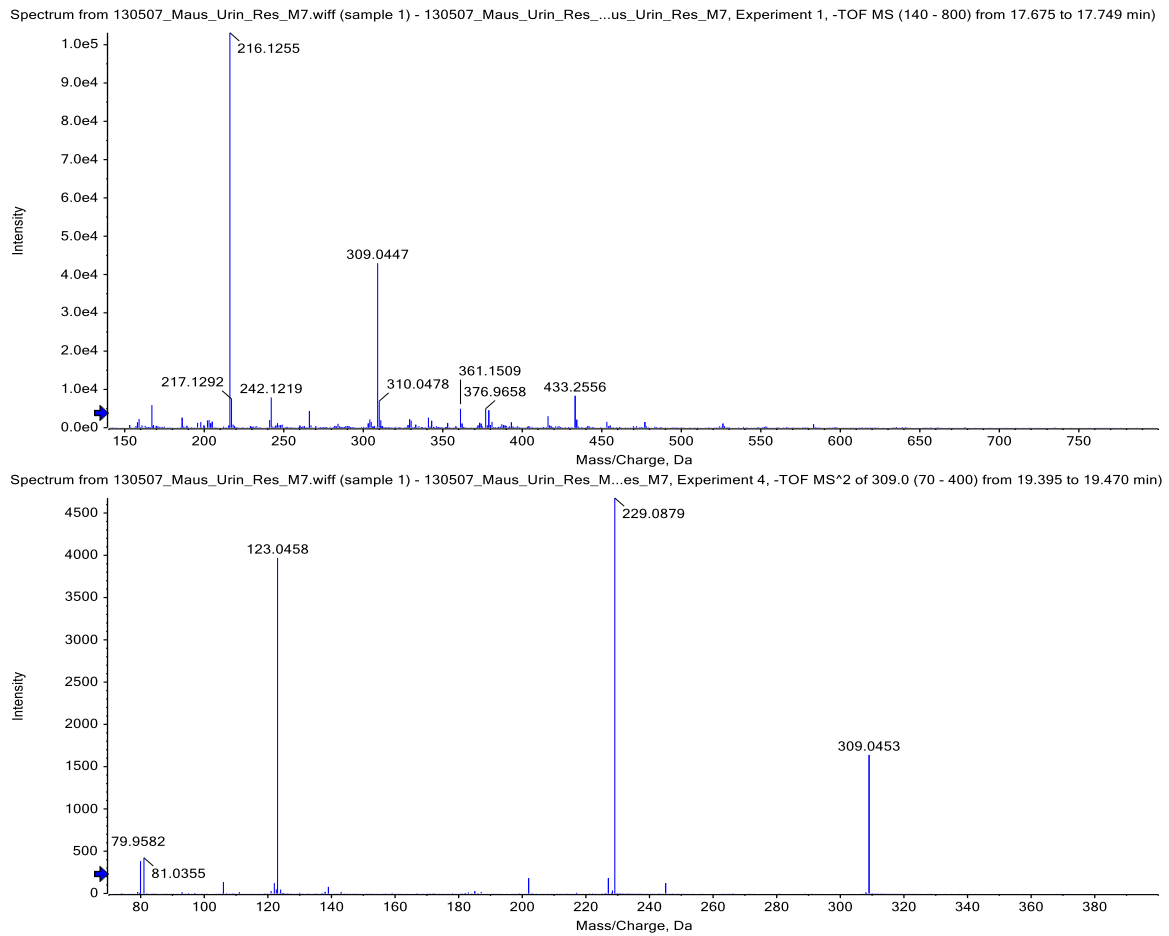
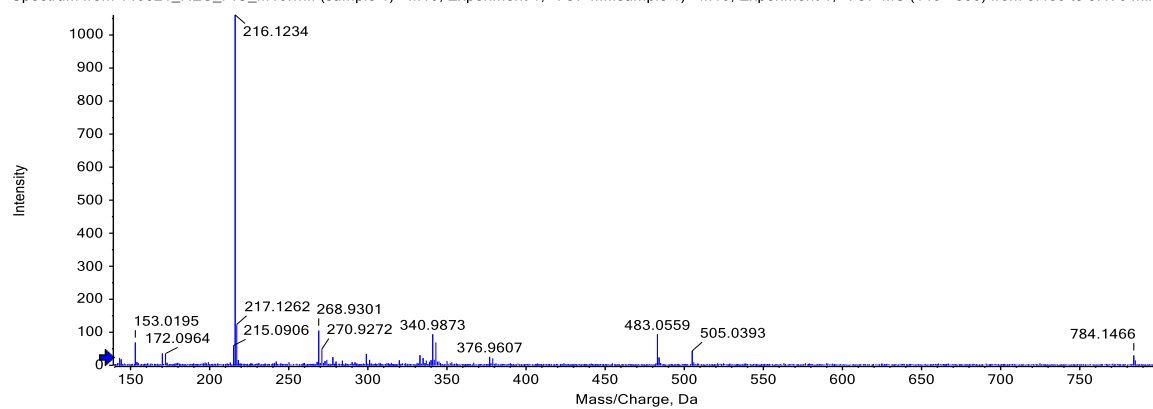


Abbildung C.71: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309, 1).

C.8 Metaboliten in Plasmaproben aus Mäusen

Spectrum from 140321_RES_PIC_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF M...sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 5.439 to 5.470 min)



Spectrum from 140321_RES_PIC_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 7, -TOF M... - M10, Experiment 7, -TOF MS² of 483.1 (50 - 500) from 5.475 to 5.491 min)

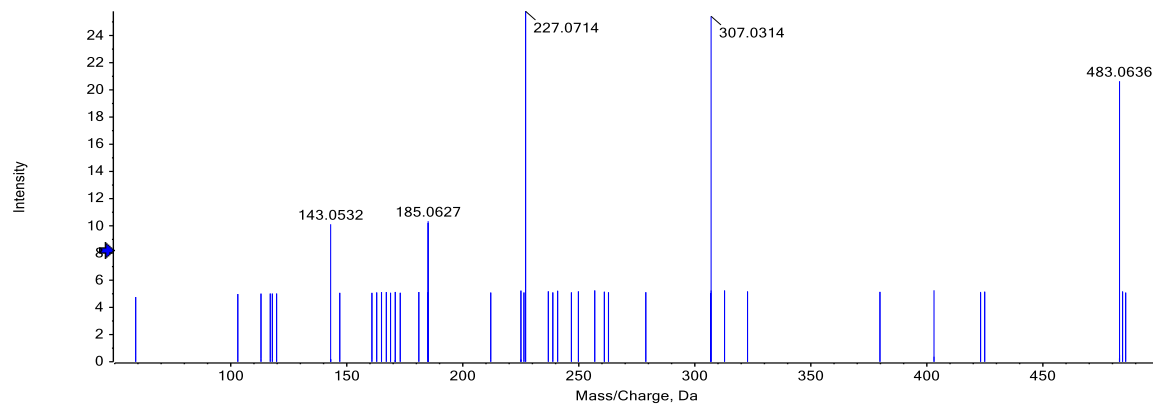


Abbildung C.72: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Sulfoglucuronids (m/z 483, 1).

C.8 Metaboliten in Plasmaproben aus Mäusen

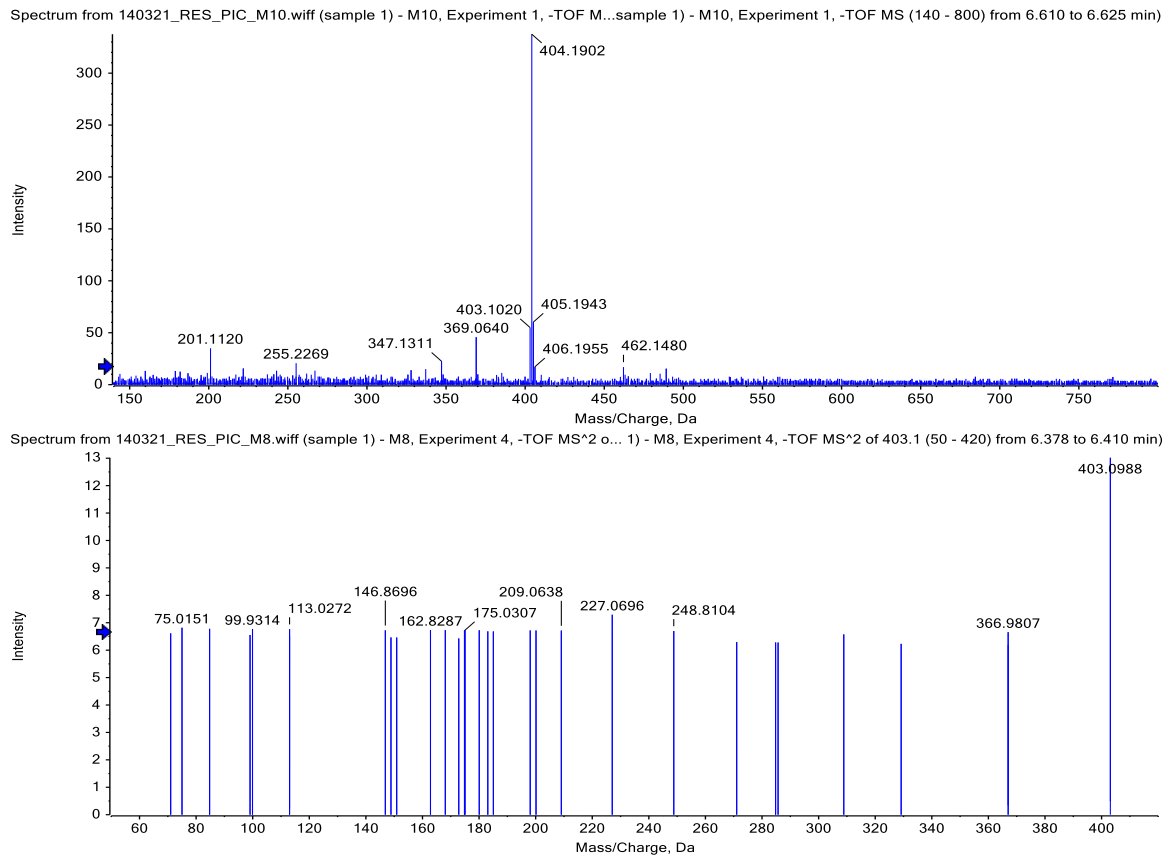
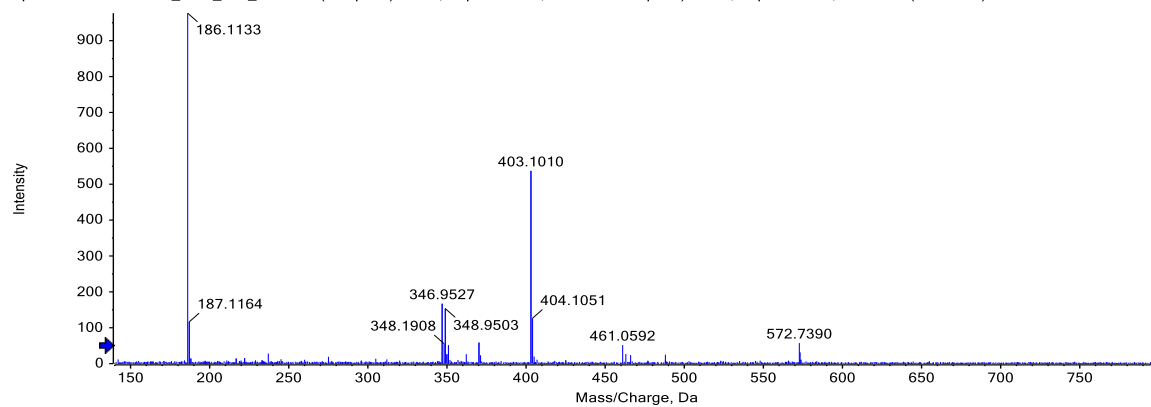


Abbildung C.73: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-4'-O-Glucuronid (m/z 403,1).

C Massenspektren

Spectrum from 140321_RES_PIC_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF M...sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 7.094 to 7.110 min)



Spectrum from 140321_RES_PIC_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 4, -TOF M...ample 1) - M10, Experiment 4, -TOF MS² of 403.1 (50 - 420) from 7.050 min)

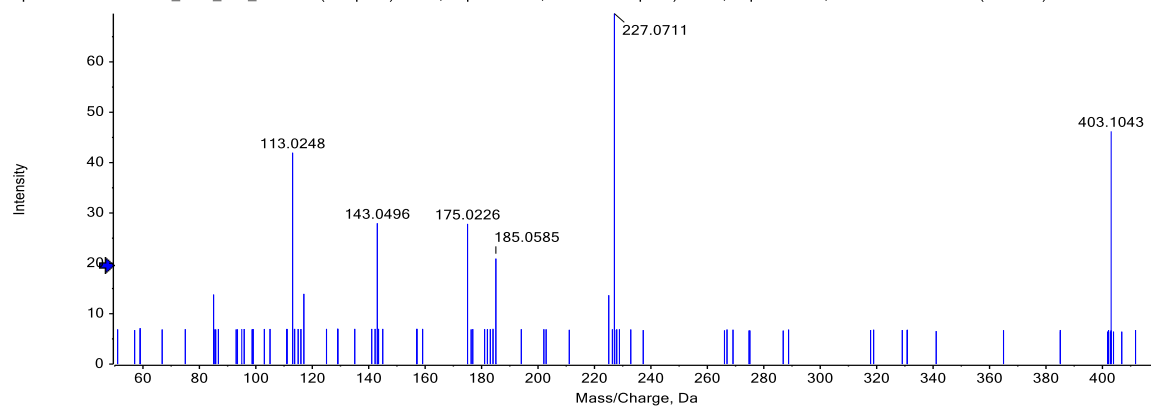


Abbildung C.74: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucuronid (m/z 403,1).

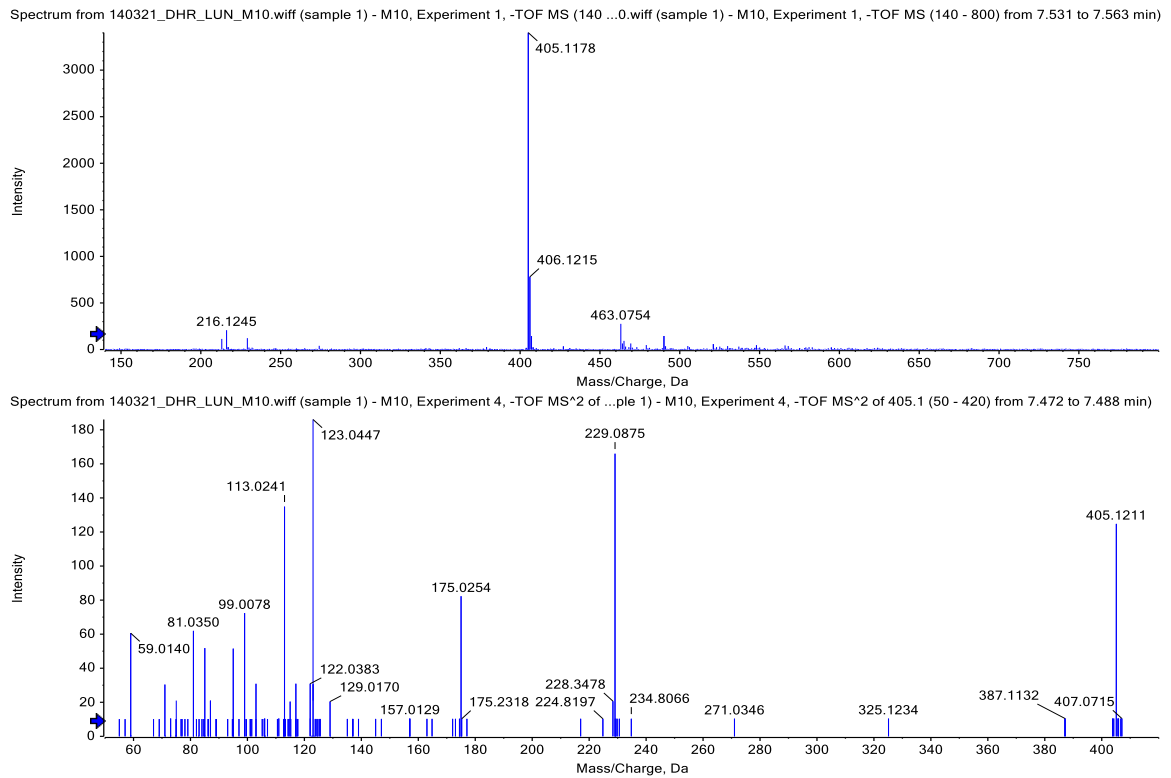
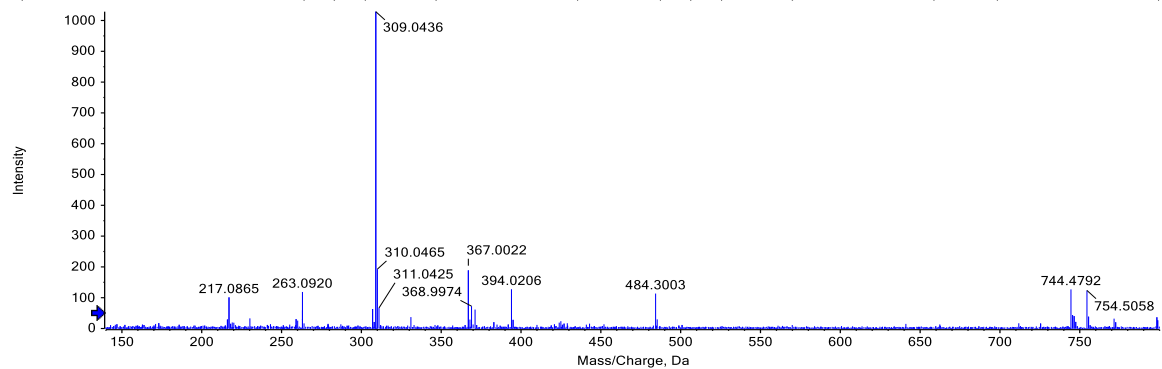


Abbildung C.75: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 140321_DHR_LUN_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF MS (140 ...0.wiff (sample 1) - M10, Experiment 1, -TOF MS (140 - 800) from 8.734 to 8.750 min)



Spectrum from 140321_DHR_LUN_M10.wiff (sample 1) - M10, Experiment 3, -TOF MS*2 of ...ple 1) - M10, Experiment 3, -TOF MS*2 of 309.0 (50 - 350) from 8.783 to 8.799 min)

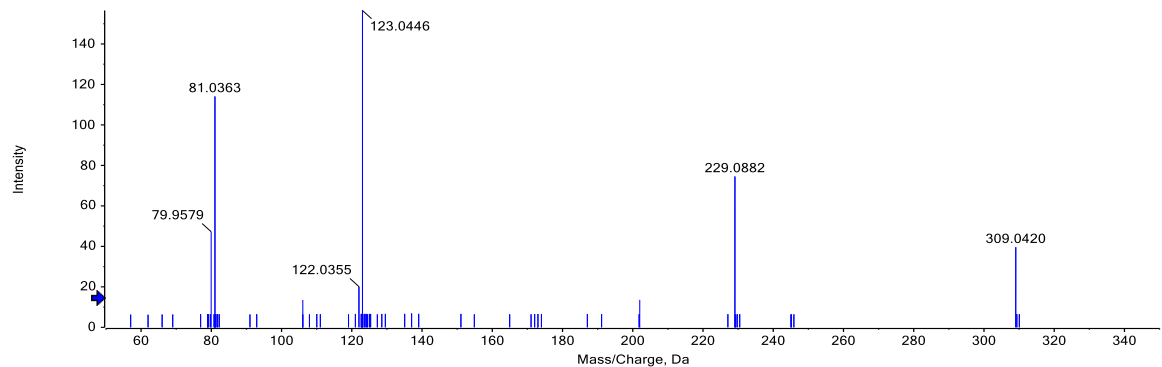


Abbildung C.76: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Sulfats (m/z 309,0).

C.8 Metaboliten in Plasmaproben aus Mäusen

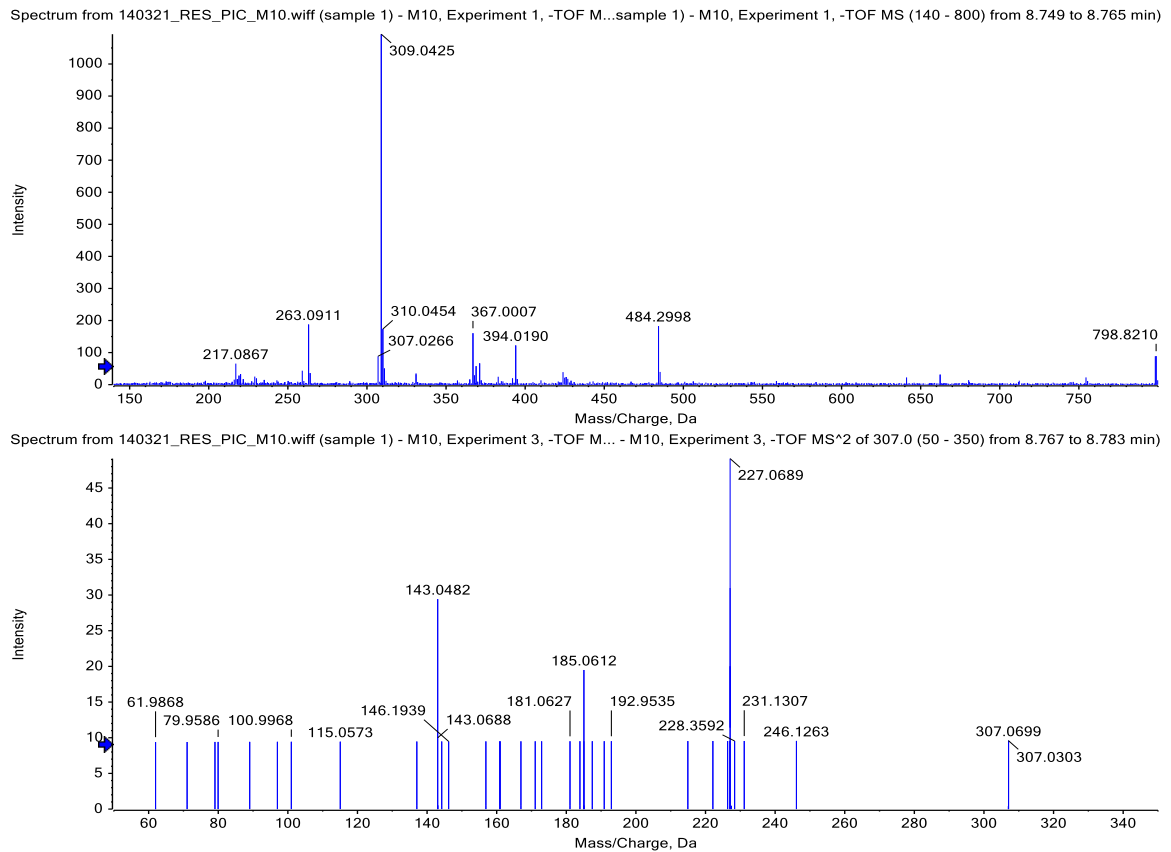
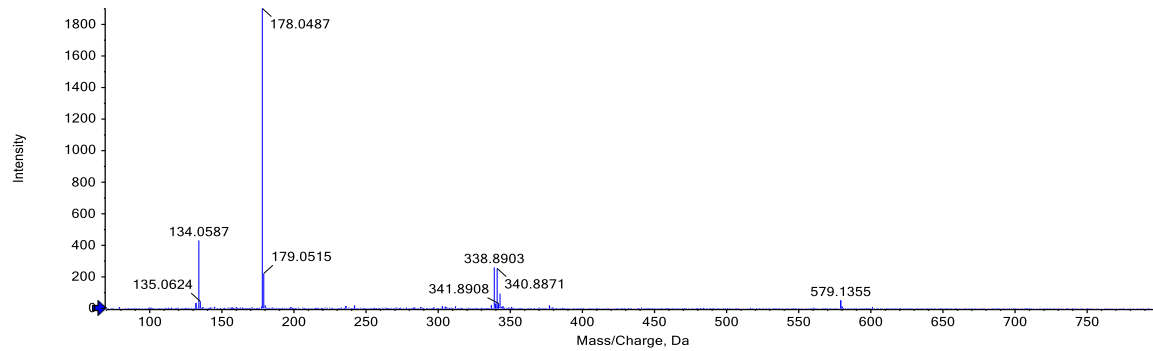


Abbildung C.77: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-Sulfat (m/z 307, 1).

C.9 Metaboliten in Plasmaproben aus Schweinen

Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 4.249 to 4.265 min), Recalibrated, Recalibrated, Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 6, -TOF MS² of 579.1 (50 - 600) from 4.301 to 4.348 min)

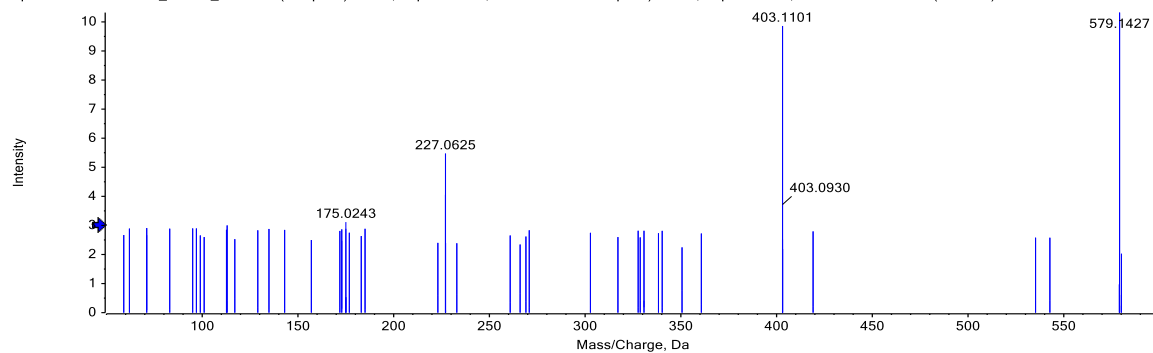


Abbildung C.78: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Resveratrol-Diglucuronids (m/z 579, 1).

C.9 Metaboliten in Plasmaproben aus Schweinen

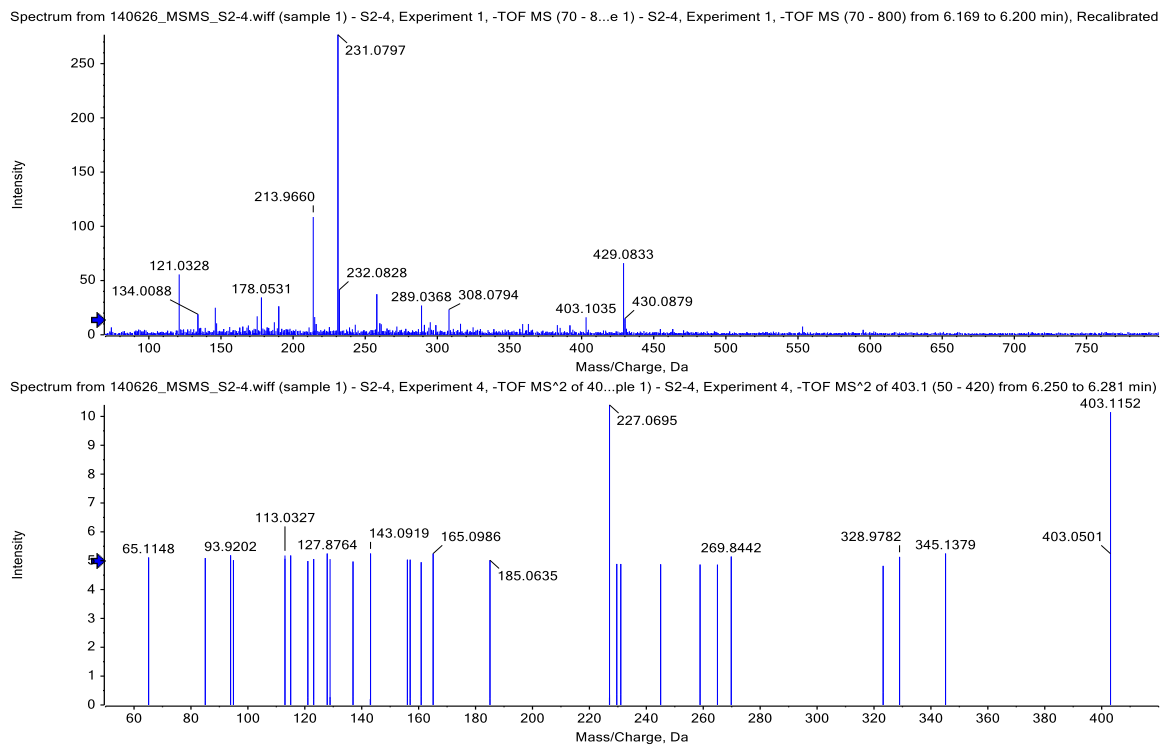
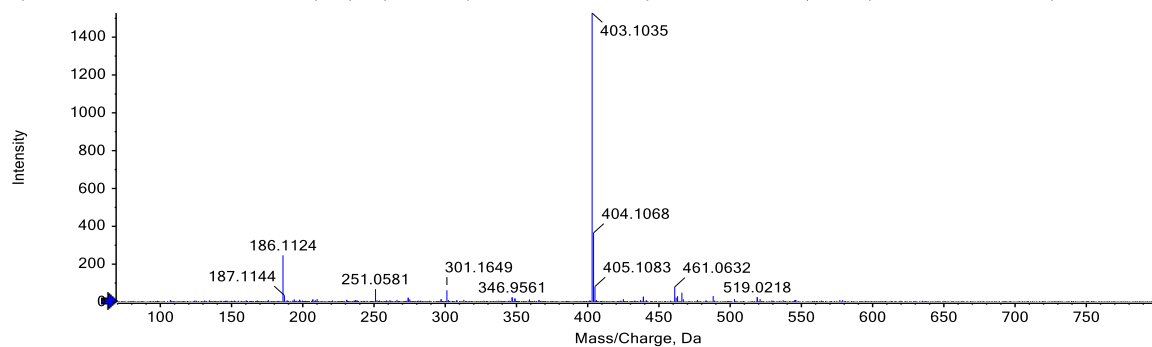


Abbildung C.79: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-4'-O-Glucuronid (m/z 403, 1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 1, -TOF ...4, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 7.090 to 7.121 min), Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 4, -TOF ...S2-4, Experiment 4, -TOF MS² of 403.1 (50 - 420) from 7.108 to 7.139 min)

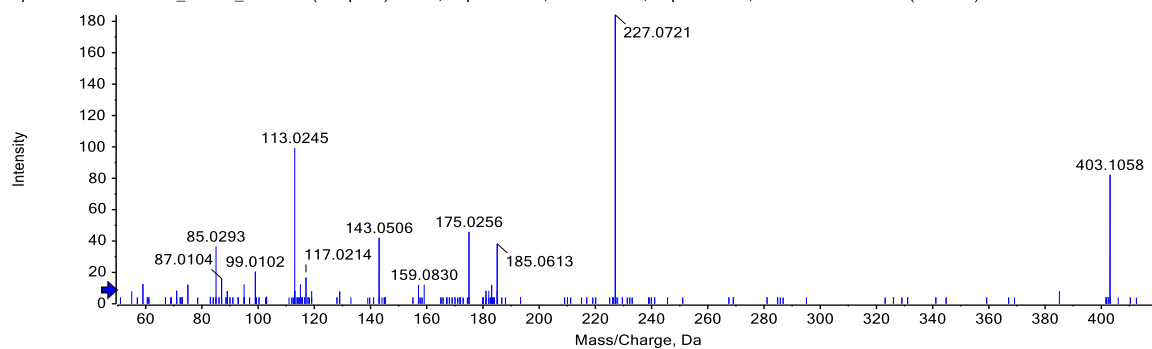


Abbildung C.80: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-O-Glucuronid (m/z 403,1).

C.9 Metaboliten in Plasmaproben aus Schweinen

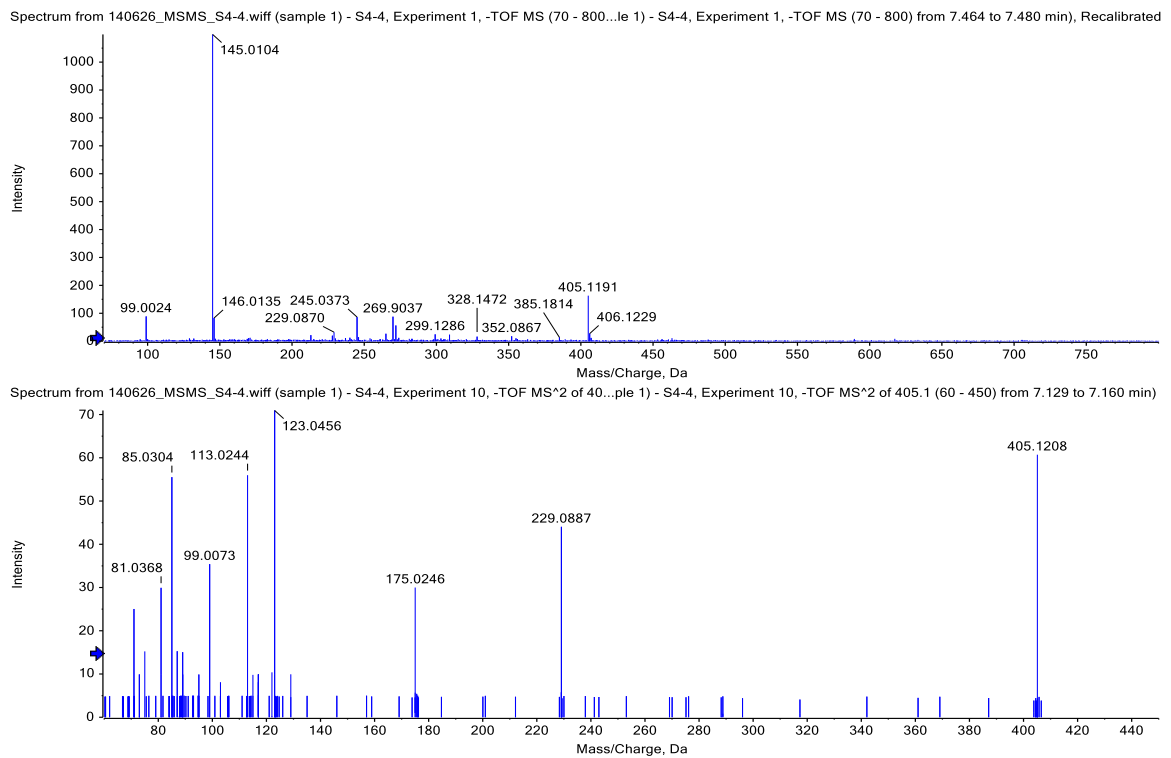
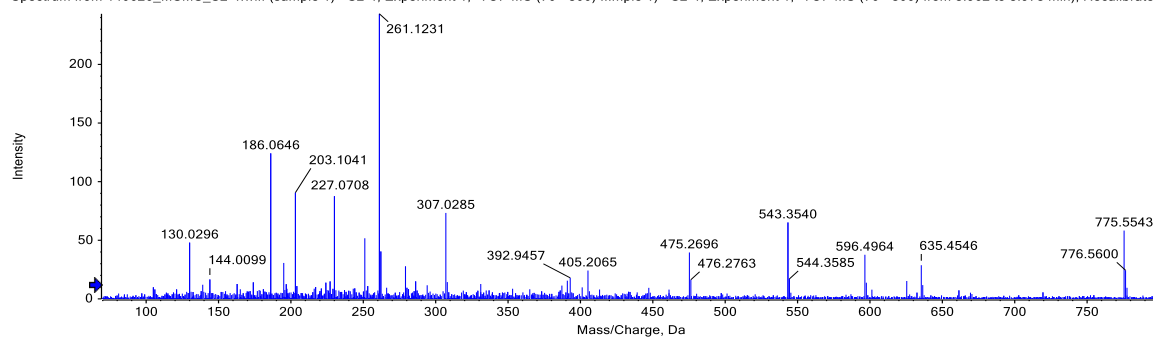


Abbildung C.81: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum eines Dihydroresveratrol-Glucuronids (m/z 405,1).

C Massenspektren

Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) ...mple 1) - S2-4, Experiment 1, -TOF MS (70 - 800) from 8.962 to 8.978 min), Recalibrated



Spectrum from 140626_MSMS_S2-4.wiff (sample 1) - S2-4, Experiment 3, -TOF MS^2 of 307.0...(sample 1) - S2-4, Experiment 3, -TOF MS^2 of 307.0 (50 - 350) from 8.855 to 8.871 min)

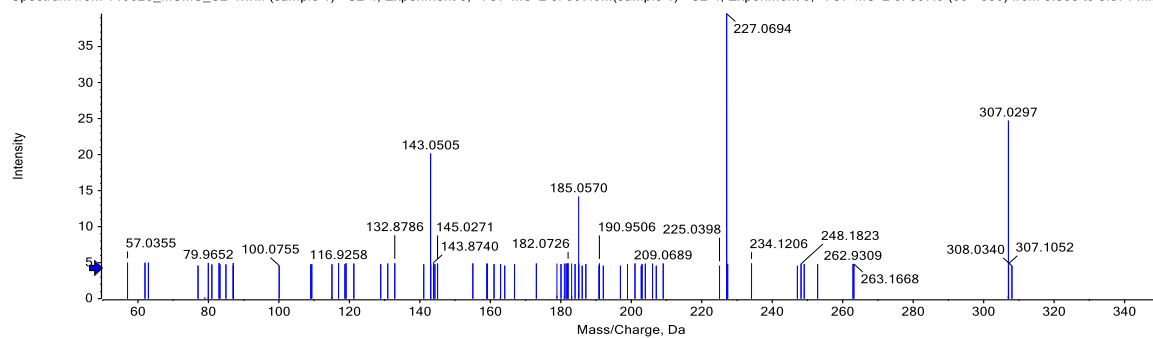


Abbildung C.82: Übersichts- und Fragmentierungsspektrum von Resveratrol-3-Sulfat (m/z 307,1).