

LCMS von Phloridzin und seinen Metaboliten im Blut und Urin der Laborratte

Autoren: Krüger, Ralf; Barth, Stephan W.

Organisation(en): Max Rubner-Institut, Deutschland

Keywords: Polyphenole, Metabolismus, Ernährung

Einleitung

Phloridzin gehört zur Gruppe der Dihydrochalkon-Polyphenole und kommt vor allem in Äpfeln vor, aber auch in anderen Obstarten wie Birne oder Kirsche. Es wirkt unter anderem antioxidativ und reduziert die Glukose-Aufnahme durch Hemmung des intestinalen Glukose-Transporters SGLT1. Die systemische Bioverfügbarkeit ist relativ gering, wobei der Zuckerrest im Magen-Darm-Trakt gespalten wird und im Wesentlichen das Aglykon Phloretin aufgenommen, metabolisiert und ausgeschieden wird [1,2]. Im Zuge eines Pilotversuchs wurden Indizien für zwei unerwartete Metabolite gefunden: das intakte Glucosid Phloridzin und ein acetyliertes Phloretin.

Experimenteller Teil

Chromatographie: Acquity HSS T3, 150x2.1mm, 1.8µm (Waters); Methanol-Gradient, 0.01% Ameisensäure

Detektion: ESI-MS/MS negativ; Quantifizierung: MRM 2 Übergänge je Analyt (Acquity H-Class, Xevo TQD, Waters); matrixadaptierte Kalibration (gespiktes Humanplasma); Identifizierung: information-dependent acquisition (1290 UHPLC, Agilent; TripleTOF 5600, AB Sciex)

Tierversuch: Orale Applikation (Schlundsonde) in 0.5% Essigsäure: Phloridzin (3mg/kg, 9mg/kg) und Negativ-Kontrolle; Sektion mit Blut- und Organentnahme 30 Minuten, 60 Minuten und 24 Stunden nach Applikation (n=3 pro Gruppe); Sammelurinprobe 24 Stunden

Probenaufbereitung Plasma, Urin: mit und ohne enzymatische Spaltung Phase-II-Metabolite (Glucuronidase, Sulfatase); Proteinfällung mit Acetonitril (incl. ISTDs Narinigin, Hesperetin), Quantifizierung plus SPE (Strata-X RP, Phenomenex)

Acetylierung in vitro: Phloridzin und Phloretin in 0.5% Essigsäure, mit HCl auf 5 pH-Werte eingestellt (0.14 bis 2.0), zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (0 bis 7 Tage)

Ergebnisse und Diskussion

Zur Identifizierung der Metabolite wurde eine Pilotstudie mit Ratten durchgeführt. In Übereinstimmung mit einer schnellen Spaltung des Glucosids im Magen-Darm-Trakt konnten wir in Blut und Urin fast ausschließlich Phloretin-Metabolite (als Summe) sowie freies Phloretin quantifizieren. Die Konzentrationen im Blutplasma waren beim kürzesten Zeitpunkt von 30 min bereits maximal, nach 24 h waren keine Metabolite mehr nachweisbar. Die niedrigere Dosis war ausreichend für eine sichere Quantifizierung mit LC-MRM. Insbesondere bei höherer Dosierung wurden zusätzlich geringe Mengen des ungespaltenen Phloridzins gefunden.

Bei der nachfolgenden Analyse derselben Proben mittels LC-HR-MS/MS wurden, in Übereinstimmung mit der MRM-Quantifizierung, hauptsächlich das Aglykon Phloretin und dessen Metabolite identifiziert: Hauptmetabolite waren drei Glucuronide, außerdem ein Diglucuronid und zwei gemischte Glucuronid-Sulfate. Zusätzlich wurde die Identifizierung des intakten Glucosids Phloridzin per exakter Masse, Isotopenmuster und Fragmentierung in Urin und Plasma eindeutig bestätigt.

Aus einem ersten Screening ergaben sich Anhaltspunkte dass auch ein acetyliertes Produkt gebildet würde. Dies ließ sich jedoch in vivo nicht bestätigen. Da die Applikation von Phloridzin im Tierversuch in Essigsäure erfolgte, ist eine Acetylierung auch ex vivo denkbar, z.B. im Magen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden essigsäure Lösungen von Phloridzin und Phloretin nach Ansäuern mit HCl bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Dabei wurde eindeutig nachgewiesen, dass mit zunehmend saurer Lösung (pH <2) nicht nur der Zucker des Glucosids gespalten wird, sondern auch eine Acetylierung stattfindet.

Referenzen

[1] Crespy et al., J. Nutr. 132: 3227–3230, 2002. Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats;

[2] Marks et al., J. Agric. Food Chem. 57: 2009–2015, 2009. Absorption, Metabolism, and Excretion of Cider Dihydrochalcones in Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie

Abstracts

Posterbeiträge



Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie