

Pharmakologie und Toxikologie

**PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM  
ANTIEMETISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS DES ÄTHERISCHEN  
ÖLS VON INGWER (*ZINGIBER OFFICINALE* ROSCOE)**

Anja Riyazi

-2006-







Pharmakologie und Toxikologie

**PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM  
ANTIEMETISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS DES ÄTHERISCHEN  
ÖLS VON INGWER (*ZINGIBER OFFICINALE* ROSCOE)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Anja Riyazi

aus Hameln

-2006-

Dekan:	Prof. Dr. B. Wunsch
Erster Gutachter:	Prof. Dr. E.J. Verspohl
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. A. Hensel
Tag der Disputation:	04. Juli 2006
Tag der Promotion:	04. Juli 2006

„Wende immer Dein Gesicht der Sonne zu, dann fallen die Schatten hinter dich.“

(Sprichwort)

*Für die, die meinem Herzen am nächsten sind*





# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ingwer – <i>Zingiber officinale</i> ROSCOE</b>	<b>1</b>
1.1.1 Übersicht, Systematik und Botanik	1
1.1.2 Herkunft, Verbreitung, Anbau und Verarbeitung	3
1.1.3 Die Droge	4
1.1.4 Bekannte Inhaltsstoffe	6
1.1.5 Traditionelle Anwendung von Ingwer als Arzneimittel	13
1.1.6 Heutige Anwendung von Ingwer einschließlich der Studienlage	13
1.1.7 Sonstige Verwendung von Ingwer	17
<b>1.2 Übelkeit (Nausea) und Erbrechen (Emesis)</b>	<b>18</b>
1.2.1 Entstehungsmechanismen	18
1.2.2 Rolle von Serotonin und Serotoninrezeptoren	20
1.2.3 Verschiedene Formen von Nausea und Emesis	22
<b>1.3 Serotonin und seine Rezeptoren</b>	<b>26</b>
1.3.1 Überblick	26
1.3.2 Gastrointestinaltrakt	28
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>33</b>
<b>2 Material</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Zelllinien</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Drogenmaterial und Extrakte</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Chemikalien und Geräte</b>	<b>35</b>
2.3.1 Destillation, Analytik und Fraktionierung	35
2.3.2 Zellkultur	36
2.3.3 [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Influx, Rattenileum und Insulinsekretion	37
2.3.4 Sonstige Chemikalien	39
2.3.5 Sonstige Geräte	40
<b>2.4 Lösungen</b>	<b>40</b>
<b>3 Tiere</b>	<b>42</b>
<b>4 Methoden</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls</b>	<b>43</b>
4.1.1 Wasserdampfdestillation	43
4.1.2 Fraktionierung	44

---

4.1.3	Dünnschichtchromatographie	45
4.1.4	Gaschromatographie	45
4.1.5	Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol	47
<b>4.2</b>	<b>Pharmakologische Testung</b>	<b>48</b>
4.2.1	Testlösungen	48
4.2.2	[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Influx (N1E-115 Zellen)	49
4.2.3	Testung am isolierten Rattenileum	51
4.2.4	Insulinsekretion (INS-1 Zellen)	53
4.2.5	Mycoplasmentest	54
4.2.6	Statistik und graphische Darstellung	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls</b>	<b>56</b>
5.1.1	Destillation und Fraktionierung	56
5.1.2	Gaschromatographische Untersuchungen	58
5.1.3	Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol	66
<b>5.2</b>	<b>Pharmakologische Testungen</b>	<b>68</b>
5.2.1	[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Influx-Messung	68
5.2.2	Testung am isolierten Rattenileum	75
5.2.3	Insulinsekretion	80
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>6.1</b>	<b>Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls</b>	<b>84</b>
<b>6.2</b>	<b>Pharmakologische Testungen</b>	<b>87</b>
6.2.1	Ätherisches Öl, Fraktionen und Reinsubstanzen	87
6.2.2	Zusätzliche Untersuchungen einiger Extrakte	93
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP-DP	<i>N</i> -Acetyl-5-hydroxytryptophyl-5-hydroxytryptophan
ACh	Acetylcholin
BSA	Bovines Serumalbumin
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DC	Dünnschichtchromatographie
EC	Enterochromaffine Zellen
ENS	Enterales Nervensystem
ES COP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
GIT	Gastrointestinaltrakt
IgG	Immunglobulin G
IPP	Isopentenylidiphosphat, Isopentenylpyrophosphat
LRI	Linearer Retentionsindex
min	Minuten
NIST	National Institute for Safety and Technology
NMR	nuclear magnetic resonance, Kern-magnetische Resonanz-Spektroskopie
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVP	Polyvinylpyrolidon, Povidon
RIA	Radio-Immuno Assay
$R_i$	Retentionsindex
$R_t$	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SERT	Serotonin Reuptake Transporter
SP	Substanz P
SSRI	Selektive Serotonin Reuptake Inhibitoren
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ingwer – *Zingiber officinale* ROSCOE

### 1.1.1 Übersicht, Systematik und Botanik

Ingwer (*Zingiber officinale* ROSCOE) ist systematisch der Familie der Zingiberaceae zuzuordnen. Innerhalb dieser Familie ist er der Gattung Zingiber BOEHM angehörig, die über 50 Arten enthält. Nur *Zingiber officinale* ROSCOE wurde auf Grund der vielfältigen medizinischen Anwendungen und der internationalen Bedeutung in die Arzneibücher aufgenommen. Eine weitere Arzneipflanze aus der Familie der Zingiberaceae ist die javanische Gelbwurz (*Curcuma xanthorrhiza* ROXB.). Wie beim Ingwer findet auch hier nur das Rhizom Verwendung<sup>1-4</sup>. Andere Arten der Familie *Zingiberaceae*, wie Cardamom (*Elettaria cardamomum* White et Marson) und Kurkuma (*Curcuma longa* L.), finden schwerpunktmäßig im gewürz- und lebensmitteltechnischen Bereich Anwendung.

Innerhalb der Art *Zingiber officinale* ROSCOE werden 2 Varietäten unterschieden: *Zingiber officinale* var. *macrorrhizomum* MAKINO (offizineller Ingwer) und *Zingiber officinale* var. *rubens* MAKINO. Die als Kintoki-Ingwer in Japan bekannte Varietät *rubens* MAKINO zeigt deutliche Unterschiede zum offizinellen Ingwer, vor allem wegen ihres Gehalts an Diterpenlactonen (Galanolactone)<sup>5</sup>.

Ingwer ist ein ausdauerndes Kraut mit einem unterirdisch horizontal wachsenden Rhizom, das sich in einer Ebene zu Seitensprossen verzweigt, die sich wiederum in weitere Seitensprosse verzweigen. Dies verleiht dem Rhizom ein geweihartiges Aussehen. Es ist durch Blattnarben geringelt und mit fadenförmigen Wurzeln besetzt. An den Blattnarben entspringen bis zu 1,5 m hohe, einjährige Scheinstengel, die die überirdischen Organe bilden und aus langen Blattscheiden



*Zingiber officinale* Roscoe

**Abb. 1.1** Abbildung aus Köhler's Medizinal-Pflanzen<sup>87</sup>

Abgebildet sind der Wurzelstock mit Trieben, Blättern und Blüten. In den kleineren Abbildungen sind Bestandteile der Blüten und des Fruchtknotens dargestellt

gebildet werden. Die Blätter stehen gegenständig, sind weich und hellgrün. Die eiförmigen Blütenstände befinden sich auf etwa 30 cm langen Blütenstengeln, die dicht mit scheidigen Blättern besetzt sind. Die zygomorphen Blüten befinden sich in einer bis 5 cm langen Ähre. Sie entspringen einzeln in den Achseln

dachziegelartig übereinanderliegender, großer, verkehrt eiförmiger, grüner Deckblätter mit gelbem Rand. Der Kelch ist kurz, röhrenförmig und einseitig gespalten, die Kronblätter sind grünlichgelb, im unteren Teil röhrig, nach oben erweitert und in drei Zipfeln endend. Es sind 6 Staubblätter vorhanden, davon sind 5 jedoch zu Stamodien umgebildet. Die äußeren sind kronblattartig, die inneren zu einer auffälligen, dreilappigen, gelb-violett-braun gesprenkelten Lippe (Labellum) verwachsen. Nur ein Staubblatt des inneren Kreises ist fertil. Die Frucht ist eine fleischige, beerenartige Kapsel. Blüten und Früchte des Ingwers finden selten Verwendung<sup>3,5</sup>.

### **1.1.2 Herkunft, Verbreitung, Anbau und Verarbeitung**

Die Bezeichnung Zingiber wird auf den Namen für Ingwer im Sanskrit, „sringavera“, zurückgeführt, woraus sich wiederum der arabische Begriff „zindschabil“ (= Wurzel) ableitet. Ingwer wurde bereits seit früher Zeit in Indien und China kultiviert und gelangte durch Handel frühzeitig in den Mittelmeerraum und wurde dort von Griechen und Römern verwendet. Im 13. Jahrhundert kam die Pflanze mit den Arabern nach Ostafrika und im 16. Jahrhundert durch die Portugiesen nach Westafrika. Auch in Europa war Ingwer schon im Mittelalter ein wichtiges Gewürz<sup>5</sup>.

Ingwer ist im tropischen Asien heimisch, die freie Wildform ist allerdings kaum noch anzutreffen<sup>6,7</sup>. Inzwischen wird er überall dort angebaut, wo ein warmes tropisches Klima herrscht: In großen Teilen Asiens, Australiens, Afrikas, aber auch in Jamaika, Mexiko oder Hawaii. Der industriell verwendete Ingwer stammt ausschließlich aus Kulturen. Die Pflanze stellt hohe Ansprüche an den Boden, ein regelmäßiger Bodenwechsel und Düngung sind notwendig. Obwohl es sich um eine ausdauernde Pflanze handelt wird sie nach jeder Ernte neu gepflanzt. In Abhängigkeit vom Standort werden die Rhizomstücke von April bis Juli gesetzt, die Ernte erfolgt frühestens nach 6 Monaten, normalerweise nach 8 bis 10 Monaten, spätestens im Januar bis Februar des übernächsten Jahres, also ca. 20 Monate später. Früh geernteter Ingwer wird als „Grüner“ Ingwer bezeichnet und

frisch gehandelt. Nach der Ernte werden die Rhizome von Stengeln und Wurzeln befreit.

Die weitere Verarbeitung führt je nach Herkunft zu unterschiedlichen Handelssorten mit deutlichen Unterschieden in Geschmack und Qualität. Die zahlreichen Handelssorten, benannt nach ihrem Herkunftsland oder dem Ausfuhrhafen, unterscheiden sich durch den Grad ihrer Schälung, den Gehalt an ätherischem Öl und Scharfstoffen sowie durch den eventuellen Gebrauch von Bleich- und Schönungsmitteln. Im Allgemeinen werden die Rhizome gewaschen und kurz in kochendes Wasser getaucht oder begast, um Bakterien und Schädlinge abzutöten. Danach trocknen sie dann einige Tage auf Matten in der Sonne. Westafrikanischer Ingwer, der viel ätherisches Öl und Scharfstoffe enthält, wird ungeschält getrocknet („Schwarzer“ Ingwer), indischer hingegen wird mit speziellen Bambusmessern vorsichtig geschält und in Kalkmilch gelegt um ihn aufzuhellen und dann getrocknet („Weisser“ Ingwer). Jamaikanischer Ingwer hat das feinste Aroma und wird traditionell als Arzneibuchware gewählt<sup>7</sup>. Er wird in kaltem Wasser gewaschen, dann vorsichtig geschält und erneut gewässert, ist also nicht geschönt<sup>1,3,6,8</sup>. Allerdings ist jamaikanischer Ingwer heute fast nicht mehr erhältlich, da das Schälen eher einem vorsichtigen Abkratzen der Rinde entspricht, sehr mühsam ist und nur von Hand durchgeführt werden kann. Eine fast gleichwertige Qualität hat der Cochinchin- oder Bengalische Ingwer aus Indien, der nur wenig geschält und nur eventuell leicht gekalkt wird. In China und Japan wird der Ingwer oft in Stücke oder Scheiben geschnitten und in Zuckerlösung eingelegt bzw. kandiert. Wird das Gewürz in Reiswein oder –essig eingelegt und bekommt dann eine rosa Färbung, spricht man von „Rotem“ Ingwer<sup>3</sup>.

### 1.1.3 Die Droge

*Zingiberis rhizoma* ist das ungeschälte oder nur an den breiten Flachseiten oder ganz von Kork befreite, getrocknete oder frische Rhizom der Pflanze<sup>4,9,10</sup>. Das nur in einer Ebene sympodial verzweigte, seitlich flachgedrückte Rhizom zeigt eine ausgeprägte, quer verlaufende Segmentierung, die durch die Blattnarben der



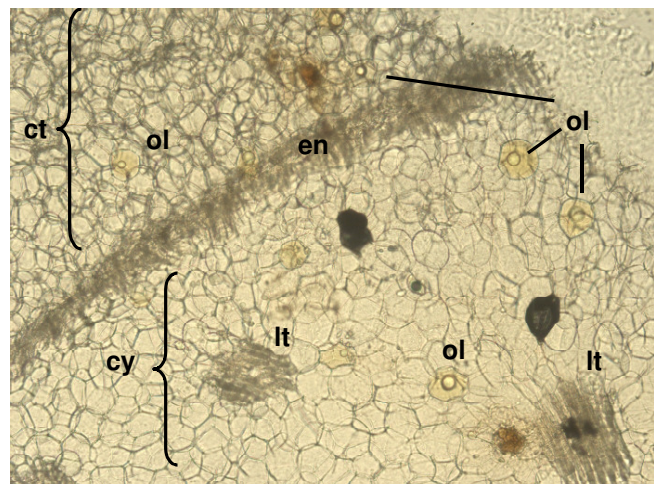
Niederblätter hervorgerufen wird. Einzelne Bruchstücke sind normalerweise 10-15 cm lang und 4 cm breit und zeigen einen ovalen Querschnitt. Die Enden der Sprosse hinterlassen an den Bruchstellen vertiefte, charakteristische Stengelnarben<sup>5</sup>.



**Abb. 1.2 Ingwerwurzelstock (Zingiberis officinalis rhizoma)**

Sowohl in der Cortex, als auch im Zentralzylinder befinden sich neben vielen Stärkekörnern oleoresinhalte Zellen. Der Inhalt ist gelblich gefärbt und von einer Korkwand umgeben. Eine starke Schälung der Droge würde diese Zellen vor allem in der Cortex zerstören und zu einer Ware mit vermindertem Gehalt an Scharfstoffen und ätherischem Öl führen.

Ingweröl wird gewöhnlich aus dem frisch gemahlenden, ungeschälten Ingwer mittels Wasserdampfdestillation gewonnen. Extrakte und das Oleoresin stammen aus dem getrockneten, ungeschälten Ingwer, da die geschälte Droge einen großen Anteil des



**Abb. 1.3 Mikroskopischer Querschnitt des Ingwerwurzelstocks**

Mikroskopischer Querschnitt von Zingiberis. Rhizoma: (ct) Cortex, (cy) Zentralzylinder, (en) Endodermis, (lt) Leitbündel, (ol) Oleoresinzellen

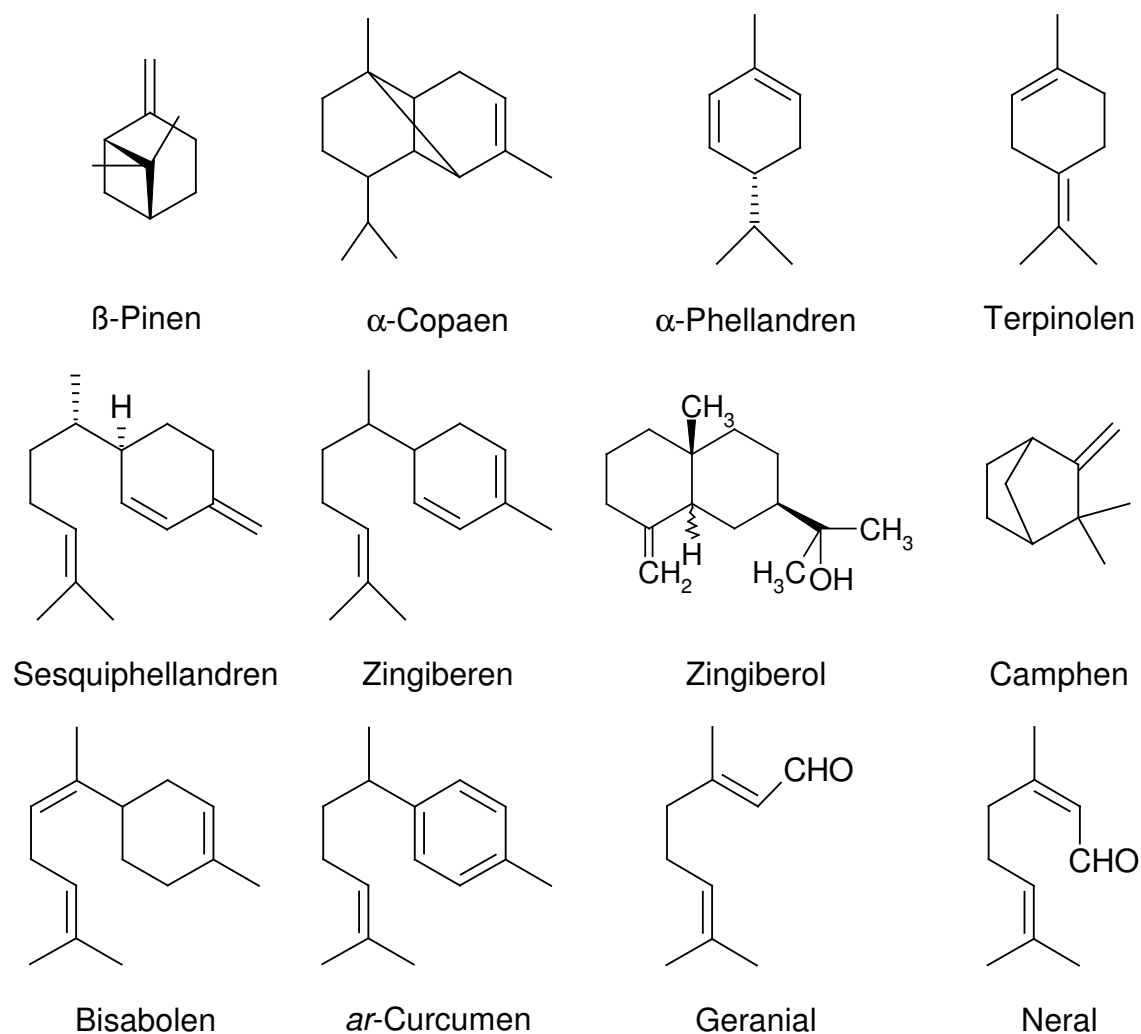
ätherischen Öls verliert.

### 1.1.4 Bekannte Inhaltsstoffe

Ingwer enthält ca. 5 bis 8 % eines zähflüssigen Balsams (Oleoresin), welcher eine ätherische Öl-Fraktion und eine nicht wasserdampfvlüchtige Scharfstoff-Fraktion enthält.

#### 1.1.4.1 Ätherisches Öl

Ingwer enthält bis zu 3 % ätherisches Öl, welches einen Anteil von ca. 20 bis 25 % des Oleoresins einnimmt. Je nach Herkunft schwankt die Zusammensetzung und damit auch das Aroma des ätherischen Öls stark, es konnten über 160 Komponenten nachgewiesen werden. In dem schwachgelben Öl sind die Hauptbestandteile Sesquiterpenkohlenwasserstoffe des Bisabolan-Typs, vor allem finden sich (-)- $\alpha$ -Zingiberen, (-)- $\beta$ -Bisabolen, (+)-*ar*-Curcumen, (-)- $\beta$ -Sesquiphellandren und das acyclische  $\alpha$ -Farnesen. Um eine Alterung des Öls, zum Beispiel durch lange Lagerung, bestimmen zu können, kann das Mengenverhältnis von (+)-*ar*-Curcumen zu (-)- $\alpha$ -Zingiberen und (-)- $\beta$ -Sesquiphellandren bestimmt werden. Bei *ar*-Curcumen nimmt der Gehalt mit der Zeit zu, bei  $\beta$ -Sesquiphellandren nimmt der Gehalt bei längerer Lagerung ab<sup>5</sup>.



**Abb. 1.4** Strukturformeln von wichtigen Mono- und Sesquiterpenen aus dem ätherischen Öl von Ingwer

Zudem nimmt die Viskosität des ätherischen Öls bei Lagerung zu, da die Sesquiterpene zur Polymerisation neigen<sup>11</sup>. Zusätzlich ist eine Vielzahl von Monoterpenen enthalten. Sie sind auf Grund der Flüchtigkeit vor allem für das Aroma des Ingwers verantwortlich, daneben gelten auch die Sesquiterpenalkohole Sesquiphellandrol und Zingiberol (ein Isomerengemisch aus *cis*- und *trans*- $\beta$ -Eudesmol) als Geruchsträger. Als Monoterpenkohlenwasserstoffe finden sich im Ingwer unter anderem Camphen, Limonen, Myrcen,  $\beta$ -Phellandren und  $\alpha$ -Pinen. In oxidierter Form findet man sie zum Beispiel als Borneol, 1,8-Cineol (Eucalyptol), Citronellol, Geranial, Geraniol, Geranylacetat, Linalool, Neral. Ein hoher Anteil an den Stereoisomeren Neral und Geranial führt zu einem deutlich

zitronenartigen Geruch, wie es zum Beispiel bei australischem Ingwer der Fall ist<sup>5,7</sup>. Einige Strukturformeln finden sich in Abb. 1.4. Nur Zingiberol, Sesquiphellandren und Sesquiphellandrol sind spezifisch für *Zingiber officinale* ROSCOE<sup>12</sup>.

Die Terpene sind Naturstoffe weit überwiegend pflanzlicher Herkunft. Sie sind aus Isopren-Untereinheiten,  $(C_5)_n$ , aufgebaut und werden daher auch als Isoprenoide bezeichnet. Terpene kommen hauptsächlich als Kohlenwasserstoffe ohne funktionelle Gruppe vor, man findet aber auch Alkohole, deren Glykoside, Ether, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren und Ester. Je nach Anzahl der Isopren- bzw. 2-Methylbutan-Einheiten unterscheidet man *Hemi-* ( $C_5$ ), *Mono-* ( $C_{10}$ ), *Sesqui-* ( $C_{15}$ ), *Di-* ( $C_{20}$ ), *Sester-* ( $C_{25}$ ), *Tri-* ( $C_{30}$ ), *Tetra-* ( $C_{40}$ ) und *Polyterpene*  $(C_5)_n$  mit  $n > 8$ . Die biogenetische Vorstufe der Terpene ist Acetyl-Coenzym A („aktivierte Essigsäure“), welches in zwei Äquivalenten zu Acetoacetyl-Co A kondensiert und mit einem weiteren Äquivalent Acetyl-Co A zu  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-Co A reagiert. In weiteren Reaktionsschritten, über die Zwischenprodukte Mevalonsäure und Mevalonsäurediphosphat, entsteht Isopentenylpyrophosphat (Isopentenyl-diphosphat, IPP). Mit Hilfe einer Isomerase wird daraus  $\gamma,\gamma$ -Dimethylallylpyrophosphat. Die beiden Isomere reagieren über Kopf-Schwanz-Addition zum Geranylpyrophosphat, einem Monoterpen. Wenn dieses mit einem weiteren Äquivalent IPP reagiert entsteht das Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat (vgl. Abb. 1.5). Durch weitere Anlagerung von IPP oder Verknüpfung von zwei Äquivalenten Farnesyl- bzw. Geranylpyrophosphat entstehen die höheren Terpene. Dieser Biogeneseweg ist in den Lehrbüchern gut beschrieben und wird hier nur aufgeführt, da im Folgenden die Inhaltsstoffe des Ingweröls pharmakologisch getestet wurden. Obwohl alle Substanzen dem gleichen Biogeneseweg entstammen, zeigen sich Unterschiede in der Wirksamkeit dieser Terpene.

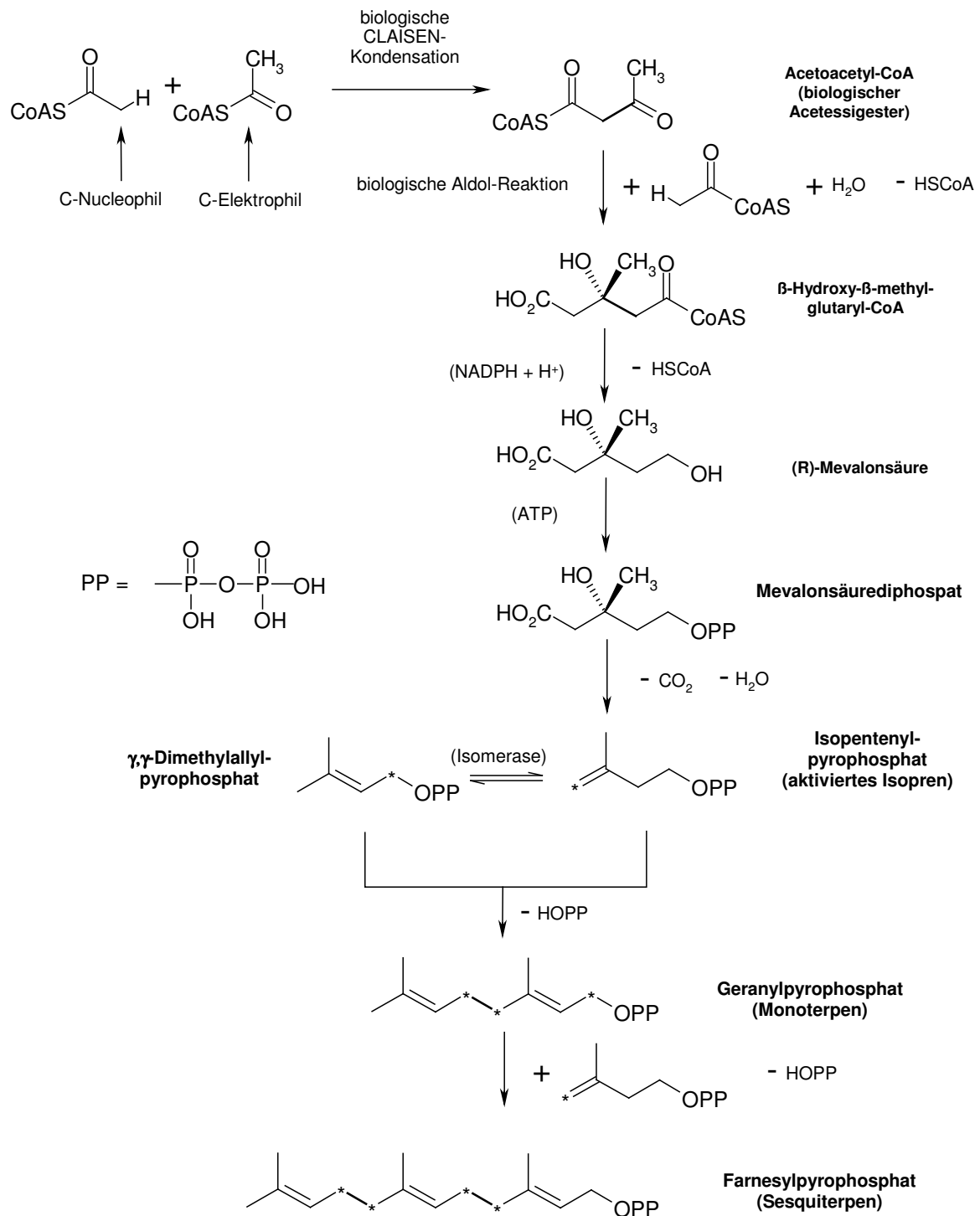
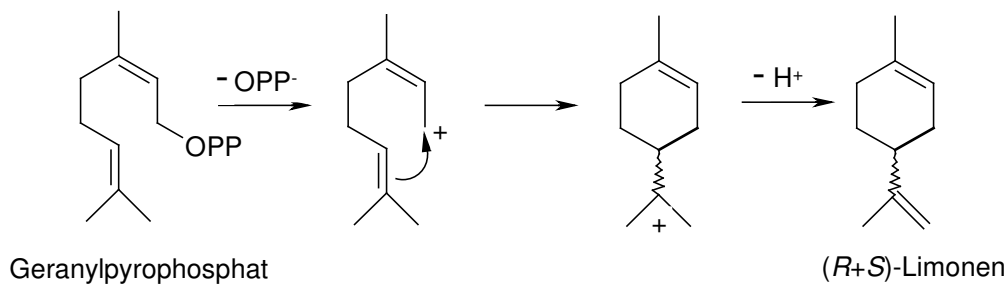


Abb. 1.5 Schema zur Biogenese von Mono- und Sesquiterpenen

Die Biogenese cyclischer und polycyclischer Terpene ist nur vereinzelt nachgewiesen und beruht auf der hypothetischen Bildung intermediärer Carbeniumionen (Abb. 1.6). Die Abbildung zeigt dies beispielhaft an der Bildung von *R*- oder *S*-Limonen aus Geranylpyrophosphat.

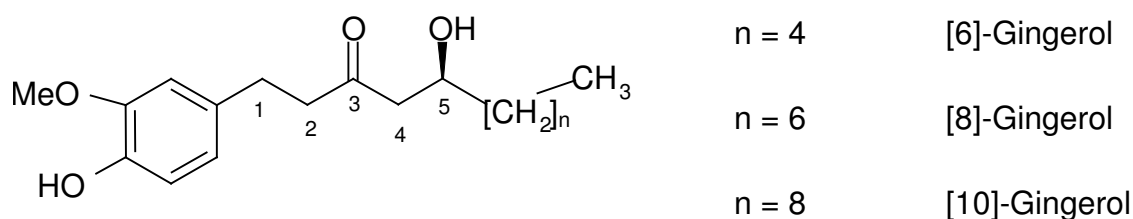


**Abb. 1.6 Hypothese zur Biogenese von cyclischen Terpenen am Beispiel (*R+S*)-Limonen**

Pharmakologische Untersuchungen zum ätherischen Öl von Ingwer sind rar. Eine Medline-Recherche am 21.04.2006 in PubMed ergab 56 Publikationen zu den Suchbegriffen „ginger AND oil“. Diese Zahl verringerte sich auf 24 Publikationen, wenn der Suchbegriff „pharmacol\*“ hinzugefügt wurde. Zur antiemetischen Wirksamkeit des ätherischen Öls oder Interaktionen mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor liegen keine Veröffentlichungen vor.

#### 1.1.4.2 Gingerole

Die Hauptkomponente der Scharfstoff-Fraktion stellt die homologe Reihe der Gingerole dar. Das Kohlenstoffgerüst der Gingerole entsteht aus Ferulasäure und Malonsäure, welche die Methylengruppe zwischen den sauerstofftragenden Kohlenstoffatomen der Seitenkette bildet, sowie aus einer aliphatischen Fettsäure, von der sich die Seitenkette ableitet. So bilden sich die [3]-, [4]- bis [12]-Gingerole. Wird als Fettsäure Hexansäure eingebaut, entsteht [6]-Gingerol. Dies stellt innerhalb der Gingerole die scharfe Komponente dar, wohingegen die längerkettigen Homologe [8]- und [10]-Gingerol praktisch keine Scharfwirkung besitzen. Insgesamt ist die Schärfe im Vergleich zu Capsaicin moderat<sup>5</sup>.

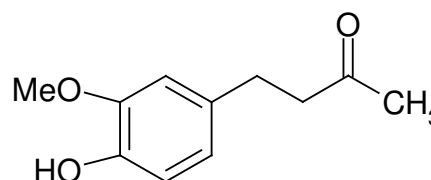


**Abb. 1.7 Allgemeine Strukturformel der Gingerole**

### 1.1.4.3 Shogaole

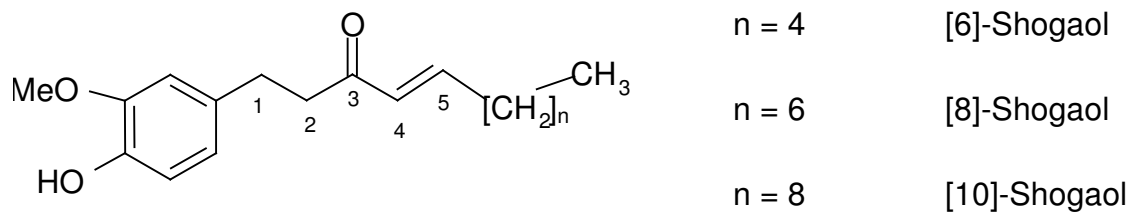
Durch Dehydratisierung der Gingerole kommt es leicht zur Bildung von nicht genuinen Shogaolen, die ihrerseits in Analogie zu den Gingerolen eine homologe Reihe darstellen. Dies geschieht während der Lagerung von Ingwer bzw. des Oleoresins und der Einwirkung von höheren Temperaturen. Die Schärfe der Shogaole übertrifft deutlich die der Gingerole. Der Name Shogaol leitet sich von „shoga“ ab, dem japanischen Begriff für Ingwer<sup>5</sup>. In frischem Ingwer oder frischem Oleoresin sind Shogaole nur in geringen Mengen zu finden. Auf Grund der Labilität der Gingerole bietet das Verhältnis der Konzentration von Gingerolen zu Shogaolen einen nützlichen Index zur Beurteilung der Frische von Ingwer. Es erlaubt eine Aussage über die Art der Trocknung, die Aufarbeitung und das Alter des Ingwers<sup>5</sup>. Oft wird eine Bildung von Shogaolen als Wertminderung der Droge betrachtet, allerdings konnte gezeigt werden, daß auch sie zu der antiemetischen Wirksamkeit von Ingwer beitragen<sup>13-15</sup>. Die genuine Zusammensetzung der Pflanze ist also nicht immer alleine für eine pharmakologische Wirkung verantwortlich.

Unter ungünstigen Bedingungen kann es zur Zersetzung der Gingerole im Sinne einer Retro-Aldol-Reaktion zu Zingeron (s. Abb. 1.8) und den korrespondierenden Alkanen kommen. In frischem Ingwer ist



**Abb. 1.8 Strukturformel von Zingeron**

Zingeron gar nicht oder nur in Spuren zu finden. Insgesamt deutet das Vorhandensein von Zingeron auf minderwertige Ware hin. In dem durch Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öl konnten die durch thermischen Abbau aus den nichtflüchtigen Gingerolen entstehenden aliphatischen Aldehyde nachgewiesen werden<sup>5</sup>.



**Abb. 1.9 Allgemeine Strukturformel der Shogaole**

#### 1.1.4.4 Weitere Inhaltstoffe

Im Ingwer sind auch Dehydrogingerdione zu finden, als Intermediate aus der Gingerolsynthese, und Diarylheptanoide, die auch als Curcuminoiden bezeichnet werden, mit ihrem prominentesten Vertreter Hexahydrocurcumin. In *Zingiber officinale* var. *rubens* MAKINO (Kintoki-Ingwer), findet man Diterpenlactone, zu dem das Galanolacton gehört. In anderen Ingwer-Provenienzen konnte diese Verbindungsklasse nicht nachgewiesen werden<sup>5</sup>.

Der Gehalt an Gesamtlipiden in der Ingwer-Wurzel beträgt 7 bis 9 %, es finden sich ca. 50 % Stärke, aber nur 0,1 % freie Monosaccharide, wie Arabinose und Glucose. Nach Freisetzung aus ihren Verbindungen können Ferulasäure, *p*-Cumarsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Sinapinsäure und Vanillinsäure gefunden werden. Des Weiteren konnten Aminosäuren,  $\beta$ -Amylase, Proteasen und Anthocyanidine nachgewiesen werden<sup>5,7</sup>.



### **1.1.5 Traditionelle Anwendung von Ingwer als Arzneimittel**

Traditionell wird Ingwer als Acro-Aromaticum (scharfes Bittermittel) zur Stärkung und Förderung der Verdauungsfunktion eingesetzt<sup>8</sup>.

Seit dem Altertum wird Ingwer wegen seiner Geschmacks- und Gewürzqualitäten geschätzt. Er ist in chinesischen Arzneibüchern, in der altindischen ayurvedischen Medizin, in der griechischen und römischen Medizin, bei Hildegard von Bingen und Paracelsus, in den Kräuterbüchern des 16. Jahrhunderts sowie in den alten angelsächsischen Tierarzneibüchern aufgeführt. In der chinesischen Medizin wird die Wirkung von frischem Ingwerwurzelstock vor allem als schweißtreibend, hustenreizstillend und antiemetisch beschrieben, während das getrocknete Rhizom ebenfalls als antiemetisch und zusätzlich als antidiarrhoisch, schleimlösend, expektorierend, antiasthmatisch, hämostatisch und kardiotonisch gilt<sup>7</sup>.

In der westlichen Volksmedizin findet man die Anwendung von Ingwertee bei Magenbeschwerden, Dysmenorrhoe und Durchblutungsstörungen. Ingwertinktur wird äußerlich zur Behandlung von rheumatischen Beschwerden und Muskelzerrungen, sowie in Mund- und Gurgelwässern und als Zahntinktur eingesetzt. Wird das ätherische Öl in eine fettige Grundlage, zum Beispiel Butter, eingearbeitet, kann es zu Einreibungen bei Husten genutzt werden. Eine Art Ingwerglühwein ist ein Hausmittel zur Behandlung von grippalen Infekten mit mäßigem Fieber<sup>3</sup>.

### **1.1.6 Heutige Anwendung von Ingwer einschließlich der Studienlage**

Wie bereits erwähnt sind für Ingwer viele traditionelle Anwendungen bekannt und viele dieser, vor allem volksmedizinischen Ansätze, sind in Studien mehr oder weniger gut untersucht. Neben den auch in die Monographie der Kommission E<sup>16</sup> aufgenommenen antiemetischen, positiv-inotropen und cholagogen Eigenschaften

sollen hier noch einige weitere Ergebnisse pharmakologischer und klinischer Studien vorgestellt werden. Auf die Studienlage bezüglich der antiemetischen Wirkungen von *Zingiber officinale* ROSCOE im speziellen soll weiter unten eingegangen werden.

#### 1.1.6.1 Überblick über einige pharmakologische Wirkungen

Eine jeweils schwach antibakterielle<sup>17</sup>, antifungale<sup>18,19</sup>, molluskizide<sup>20</sup> und antinematode<sup>21</sup> Wirkung konnte nachgewiesen werden. Getestet wurden vor allem Organismen, die nahrungsmittelrelevant sind, da Ingwer neben seiner medizinischen Anwendung häufig bei der Speisezubereitung verwendet wird<sup>8</sup>.

Ingwerpräparate senken den Cholesterinspiegel sowohl im Serum, als auch in der Leber<sup>22,23</sup>. Untersucht wurde der Einfluß des Oleoresins während einer cholesterinreichen Diät bei Ratten. Der Effekt einer regelmäßigen Ingwereinnahme auf die Cholesterinspiegel wird mit dem antioxidativen Effekt sowie einer verstärkten Umwandlung des Cholesterins zu Gallensäuren erklärt<sup>22,24</sup>. Eine neuere Untersuchung an diabetischen Ratten konnte diese Ergebnisse bestätigen und auf die Triglyceridspiegel im Blut ausweiten, die ebenfalls von einem ethanolischen Ingwerextrakt gesenkt werden konnten. Ein anti-arteriosklerotischer Effekt wird damit postuliert<sup>25,26</sup>.

Weiter stellte man in einer japanischen Studie im Bezug auf das Herz-Kreislauf-System fest, daß verschiedene Gingerole aus Ingwer dosisabhängig positiv-inotrope Effekte haben<sup>27</sup>, was auf eine Aktivierung der calciumpumpenden ATPase zurückzuführen ist<sup>28</sup>. Zusätzlich werden die Blutgefäße durch die positive Beeinflussung der Prostacyclin-Synthese weitgestellt und dadurch ein blutdrucksenkender Effekt erreicht.

Unter dem Einfluß von Ingwer kommt es auch zu einer verringerten Bildung von Thromboxan, womit die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten herabgesetzt wird. Dieser Effekt tritt aber nur bei Konsum von frischem Ingwer auf. Die übliche Dosierung von getrocknetem Ingwer, vor allem als Antiemetikum von bis zu 2 g täglich, zeigt keinen Einfluss auf die Plättchenaggregation<sup>29</sup> oder eine Interaktion

mit Warfarin<sup>30</sup>. Die verminderte Bildung von Thromboxan wird unter anderem durch eine COX-1 Inhibition hervorgerufen.

Diese Inhibition wird stärker als die von Acetylsalicylsäure beschrieben<sup>31,32</sup>. Dies macht Ingwer und seine Inhaltsstoffe vielversprechend für die Anwendung bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises<sup>33-36</sup>.

In Bezug auf einzelne Inhaltsstoffe konnten für viele dieser Wirkungen die Gingerole, Shogaole und Dehydrogingerdione verantwortlich gemacht werden. Gute Übersichten zu weiteren *in vivo* und *in vitro* Studien findet man bei Chrubasik *et al.* (2005)<sup>37</sup>, Kemper (1999)<sup>38</sup> und in Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis<sup>5</sup>. Keine der hier beschriebenen Wirkungen hat jedoch zu einer Zulassung für den Arzneimittelmarkt oder einer entsprechenden Positivmonographie geführt.

#### 1.1.6.2 Untersuchungen zur antiemetischen Wirkung von Ingwer

In der westlichen Welt hat Ingwer nur durch seine antiemetische Wirksamkeit Bedeutung erlangt. Dieser Effekt wird in mehreren Studien belegt. Eine Übersicht zu verschiedenen Formen von Übelkeit und Erbrechen, einschließlich der Reisekrankheit sowie deren Ätiologie, findet sich in Kapitel 1.2.

In einer *in vitro* Studie gelang es Yamahara *et al.* (1990)<sup>39</sup> am Meerschweinchenileum einen acetonischen Ingwerextrakt und [6]-, [8]- und [10]-Gingerol als antiserotoninerg wirksame Komponenten zu identifizieren.

In Tierexperimenten wurden verschiedene Ingwerextrakte (acetonisch, ethanolisch, wässrig) und Inhaltsstoffe wie [6]-, [8]-, [10]-Gingerol, [6]-, [8]- und [10]-Shogaol auf ihre Fähigkeit hin untersucht ein Erbrechen, welches durch hauptsächlich cytotoxische Substanzen ausgelöst wurde, zu unterdrücken oder zu mildern. Eine Übersicht in Tabellenform zu diesen Studien findet man bei Abdel-Aziz *et al.* (2004)<sup>13</sup>. Als Wirkungsmechanismus werden Interaktionen mit dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, Radikalfängereigenschaften oder ein zentraler Effekt diskutiert.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß Ingwer bei verschiedenen Formen von Übelkeit und Erbrechen wirksam ist. In randomisierten und doppelblinden Untersuchungen konnte ein positiver Effekt von Ingwerpulver zur Prävention von Reiseübelkeit nachgewiesen werden<sup>40,41</sup>, wobei ein vergleichbarer Effekt zu Dimenhydrinat festgestellt wurde<sup>42</sup>. In einer dieser Studien<sup>40</sup> wurde Ingwer mit sechs weiteren freiverkäuflichen oder rezeptpflichtigen Arzneimitteln verglichen. Es konnte kein Unterschied in der Wirksamkeit von Ingwer im Vergleich mit diesen Mitteln, aber ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit gegenüber Placebo aufgezeigt werden. Allerdings gibt es auch Studien, die dieses Ergebnis nicht reproduzieren konnten<sup>43,44</sup>. Insgesamt scheint es, daß in diesen Arbeiten der Fokus auf zentrale Effekte von Ingwerzubereitungen gelegt wurde, wohingegen Untersuchungen, die Effekte im gastrointestinalen System untersuchten, immer eine gute Wirksamkeit von Ingwer zeigten. Auch Schwangerschaftserbrechen konnte in einer randomisierten, doppelblinden Studie durch 250 mg Ingwerpulver viermal täglich signifikant gegenüber Placebo unterbunden werden<sup>45</sup>. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Ingwer bei postoperativer Übelkeit mit Erbrechen lieferten widersprüchliche Ergebnisse<sup>46-48</sup>, eine neue Metaanalyse<sup>49</sup> zeigt eine Überlegenheit von Ingwer gegenüber Placebo.

Eine Verkürzung der Magenentleerungszeit scheint nicht für die antiemetische Wirksamkeit von Ingwer verantwortlich zu sein<sup>50</sup>, auch zentrale Effekte sind eher als untergeordnet zu betrachten<sup>43</sup>.

In allen klinischen Studien wurde eine Tagesdosis von 500 bis 2000 mg Ingwer, meistens in getrockneter Pulverform, verabreicht. Diese Dosis konnte in Untersuchungen zur Toxizität als sicher beurteilt werden, generell sind bei der Anwendung von Ingwer keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zu beobachten. In China wird sogar zum Teil ein zehnfaches dieser bei uns üblichen Dosierung verwendet. Außerdem sollte man nicht vergessen, daß Ingwer ein Gewürz mit weiter Verbreitung ist und in vielen Rezepten in großen Mengen eingesetzt wird.

Zu der antiemetischen Wirkung von Ingwer finden sich in der jüngeren Literatur viele Reviews und Metaanalysen<sup>37,49,51</sup>, leider fehlen weiterhin Studien mit

größeren Patientenkollektiven, speziell was die Wirksamkeit bei Kinetosen und bei postoperativer Übelkeit und Erbrechen angeht.

### **1.1.7 Sonstige Verwendung von Ingwer**

Als Gewürz findet Ingwer eine vielfache und vielfältige Anwendung. Man kann ihn frisch oder getrocknet, im Ganzen, in Scheiben oder Stücke geschnitten oder gemahlen verwenden<sup>11</sup>.

Als Zubereitung stehen die Getränke auf Ingwer-Basis im Vordergrund. Man unterscheidet „ginger beer“, ein gebrautes Ingwerbier, und „ginger ale“, welches als kohlenensäurehaltiges Erfrischungsgetränk angeboten wird und aus Extrakten von Ingwer, Zitrusfrüchten und anderen Früchten, sowie Capsicumextrakten hergestellt wird. Vom „ginger ale“ gibt es eine weniger süße Variante für alkoholische Mixgetränke („pale ginger ale“) und eine aromatischere, süßere Variante, die auch pur genossen werden kann<sup>3,11</sup>.

Weiterhin finden kandierter Ingwer oder Ingwer in Sirup eine breite Anwendung in der Küche. Um ihn haltbarer zu machen, kann Ingwer auch in Salz eingelegt oder sauer eingemacht werden („pickles“)<sup>11</sup>.

Ingweröl und das Oleoresin werden ebenfalls industriell verwendet, vor allem um die oben genannten Getränke herzustellen oder als Aromazusatz zu Gebäck, Saucen und Gewürzmischungen wie zum Beispiel Curry<sup>8,11</sup>.

## 1.2 Übelkeit (Nausea) und Erbrechen (Emesis)

### 1.2.1 Entstehungsmechanismen

Nausea ist als „unangenehme subjektive Empfindung“ definiert, die sich auf den oberen Gastrointestinaltrakt beschränkt und mit dem Drang zu Erbrechen verbunden ist. Es muss jedoch nicht zur Emesis kommen, ist aber mit einer vegetativen Begleitsymptomatik vergesellschaftet, die durch Aktivierung des Sympathikus (Blässe, Tachykardie, kalter Schweiß, Mydriasis) und des Parasympathikus (gesteigerte Salivation) entsteht. Da Übelkeit ein subjektives Empfinden ist, gibt es hierfür kein geeignetes Tiermodell<sup>52</sup>.

Erbrechen ist eine instinktive Abwehrreaktion, verursacht durch einen somato-autonomen Reflex (Fremdreflex). Er hat die Aktivierung des autonomen und somatischen Nervensystems und die Entleerung des Mageninhaltes zum Ziel. Periphere emetogene Rezeptoren finden sich vor allem im Bereich der Sinnesorgane. Weitere Rezeptoren, die einen emetogenen Stimulus erzeugen finden sich im Gastrointestinaltrakt. Es sind Rezeptoren der Magen- und Dünndarmschleimhaut, sowie afferente Nervenendigungen des Vagus, die sich direkt an den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes befinden. Sie wirken als Chemorezeptoren der Darmmucosa und werden unter anderem auch gereizt durch Änderungen des Darmmilieus auf der luminalen Seite, wie etwa Osmolarität, pH-Wert, Dehnung, Temperatur oder Nahrungspartikel. Die afferenten vagalen Nervenfasern begleiten die *Vena portae* und werden somit direkt durch vom Darm in die Blutbahn freigesetzte Mediatoren erregt. Es erfolgt eine Aktivierung viszeraler afferenter Nerven, die im *Nervus vagus* verlaufen und zur *Area postrema* ziehen, hier liegt die Chemorezeptor-Triggerzone (CTZ). Die *Area postrema* befindet sich am kaudalen Ende des IV. Hirnventrikels.

Die CTZ liegt außerhalb der Blut-Hirn-Schranke und ist somit zur Aufnahme emetogener Noxen aus dem Blut und der zerebrospinalen Flüssigkeit befähigt. Auch der *Nucleus tractus solitarii* empfängt eine Vielzahl von Afferenzen, darunter von gastrointestinalen, viszeralen und arteriellen Chemorezeptoren. Ihm entspringen Efferenzen zur *Area postrema* und zum Rückenmark<sup>52</sup>. Dem *Nucleus tractus solitarii* wird eine Kontrollfunktion als gemeinsame Endstrecke verschiedener emetogener Stimuli zugeschrieben. Ebenfalls involviert in das Auslösen von Erbrechen ist die *Formatio reticularis* der *Medulla oblongata*. Sie empfängt direkt afferente Impulse aus sympathischen und parasympathischen Nervenfasern. Man kann somit von einem Brechfunktionszentrum sprechen, zusammengesetzt aus dem *Nucleus tractus solitarii*, der *Area postrema*, der *Medulla oblongata* und umliegenden Hirnarealen. Die neurochemischen und neuronalen Mechanismen scheinen deutlich komplizierter zu sein als die emetischen Stimuli selbst<sup>53</sup>.

Als Folge der Aktivierung des Brechreflexes kommt es im Bereich des oberen GI-Traktes zu einer Erschlaffung des Magens, retrograden Peristaltik des Dünndarms und zu tonischen Längskontraktionen der pharyngo-ösophagalen Verbindung. Der anschließende Vorgang des Erbrechens, mit Herauswürgen des Mageninhaltes, ist durch wiederholte Kontraktion der Bauchmuskulatur, der Muskulatur zwischen den Rippen, des Zwerchfells und des *Musculus geniohydoideus* (bewirkt Mundöffnung) gekennzeichnet.

Dopamin-Rezeptoren, die in der Chemorezeptor-Triggerzone (CTZ) im *Nucleus tractus solitarii* und den vagalen Neuronen des Magens lokalisiert sind spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Übelkeit und Erbrechen. Eine Anwendung von Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten wie Metoclopramid und Domperidon gehört zu den Standardtherapien bei vielen Formen von Nausea und Emesis<sup>53</sup>.

### 1.2.2 Rolle von Serotonin und Serotoninrezeptoren

Auch Serotonin (5-HT) und speziell der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zeigen in verschiedenen Studien einen Zusammenhang mit dem emetischen Geschehen auf<sup>54,55</sup>. Emetogene Substanzen können die Freisetzung von 5-HT aus enterochromaffinen Zellen (EC) des Intestinums erhöhen. Dadurch werden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auf abdominalen Afferenzen des *Vagus* aktiviert und es kommt durch Projektion dieser Fasern in die *Area postrema* zu einer weiteren Freisetzung von Serotonin, Stimulation der Serotoninrezeptoren (5-HT<sub>3</sub>) und Auslösung des Brechreflexes. Dieser Mechanismus wird eher als Ursache von Emesis nach Exposition mit emetogenen Substanzen angesehen, als eine direkte Wirkung der Substanzen in der *Area postrema*<sup>53</sup>. Ein Beweis für die Ausschüttung einer größeren Menge an Serotonin in die Peripherie nach einem emetogenen Stimulus ist ein meßbar erhöhter Spiegel von 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), einem Metaboliten von 5-HT, der nach Bindung des freien Serotonins an Blutplättchen (Thrombozyten) in der Leber gebildet wird. 5-HIAA wird mit dem Urin ausgeschieden und kann hier nachgewiesen werden<sup>53</sup>.

Die Freisetzung von Serotonin aus den EC unterliegt einem komplizierten calciumabhängigen Kontrollmechanismus. Die Rolle von 5-HT-Autorezeptoren bei der Kontrolle der Freisetzung ist noch umstritten. Ein selektiver 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonist produziert einen dosisabhängigen Anstieg der 5-HT-Freisetzung, dieser läßt sich allerdings nur durch ebenfalls selektive 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten blocken. Nichtselektive Antagonisten können diesen Effekt nicht aufheben. Sie weisen oft einen partiellen Agonismus an 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren auf, deren Stimulation die Ausschüttung von Serotonin verhindert. Allerdings haben Parvez *et al.* (1997)<sup>53</sup> eine Stimulation der Serotoninfreisetzung mit dem selektiven 5-HT<sub>4</sub>-Agonisten 5-Methoxytryptamin beobachtet. Sie führen dies auf eine indirekte Wirkung über einen cholinergen Mechanismus zurück. Schwörer *et al.* (1997)<sup>52</sup> konnten zeigen, daß unter anderem die Stimulation von nicotinischen und muscarinischen Acetylcholinrezeptoren die Freisetzung von Serotonin aus EC erhöht.



Wie schon erwähnt, findet sich auch in der *Area postrema* Serotonin, die Freisetzung erfolgt nicht direkt aus den vagalen Afferenzen. Sie beeinflussen aber serotoninerge Neurone. Bindungsstudien konnten eine hohe Dichte von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren nachweisen. Viel Serotonin wurde auch im Raphe-Kern nachgewiesen. Der *Nucleus tractus solitarii* bekommt Input aus dem Raphe-Kern, allerdings ist noch nicht ganz geklärt ob dies mit dem emetischen Geschehen zusammenhängt.

Die Neurone in der *Area postrema* werden nicht nur durch Serotonin, sondern auch durch Gastrin, Histamin, Substanz P, Dopamin und Enkephaline angeregt. Alle diese Substanzen kommen auch im Gastrointestinaltrakt vor.

Da die Beeinflussung des serotoninergen Systems des Gastrointestinaltrakts (GIT) einen Einfluß auf die gastrointestinale Sekretion, Motilität und Sensibilität hat, spielen Serotoninantagonisten mit ihren verschiedenen Ansatzpunkten eine immer größere Rolle in der Therapie von funktionellen Magen-Darm-Erkrankungen wie zum Beispiel dem Reizdarmsyndrom. Je nach dem dominierenden Leitsymptom, Diarrhö oder Obstipation, finden Antagonisten am 5-HT<sub>3</sub>- oder Agonisten am 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor ihre Anwendung. Tropisetron als 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist und partieller 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonist verspricht hier besonders gute Wirksamkeit bei der diarrhö-dominanten Form, da die Physiologie des peristaltischen Reflexes von beiden Rezeptorsubtypen gesteuert wird und das Ausschalten eines Typs durch den anderen Rezeptor kompensiert wird. Der nur partielle Agonismus am 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor führt zu einer normalisierten serotoninartigen Wirkung. Bei funktioneller Dyspepsie können 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptorantagonisten wie Sumatriptan Linderung verschaffen<sup>56</sup>.

## 1.2.3 Verschiedene Formen von Nausea und Emesis

### 1.2.3.1 Chemotherapie-induzierte Emesis

Bei der chemotherapie-induzierten Übelkeit unterscheidet man die akute Form (Übelkeit tritt innerhalb von 24 Stunden auf) oder auch Frühemesis, die verzögerte Form mit spätem Erbrechen (Spätemesis) und die antizipatorische Form, bei der eine Übelkeit mit Erbrechen schon vor erneutem Behandlungsbeginn auftritt und bei welcher der Patient bereits in vorhergehenden Therapiezyklen erbrechen mußte. Krebstherapeutika zielen auf Gewebe mit einer hohen Zellteilungsrate. Neben dem Tumorgewebe ist davon auch das gastrointestinale Gewebe, speziell das Epithel betroffen. Es verliert seine Schutzfunktion und sensorische Reize gelangen leichter und stärker an die darunterliegende Mucosa, wo auch die enterochromaffinen Zellen lokalisiert sind. Deren sekretorische Aktivität wird erhöht und es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von Serotonin. Dies spielt vor allem bei der akuten Form des zytostatikainduziertem Erbrechen eine Rolle<sup>52</sup>. Nach Verabreichung von Cisplatin oder Cyclophosphamid konnte eine erhöhte Aktivität der Tryptophanhydroxylase (TPH) im Ileum gemessen werden. Sie ist für die Biosynthese von Serotonin von entscheidender Bedeutung. Ein Anstieg der Monoaminoxidaseaktivität (MAO-Aktivität) konnte nicht festgestellt werden<sup>57</sup>. Neben Zytostatika induzieren auch Radikale die Freisetzung von Serotonin. Im Zusammenspiel mit Zytostatika oder Strahlentherapie bei Tumorpatienten wird dieser Effekt vervielfacht. Das Cisplatin-induzierte Erbrechen konnte durch „Radikalfänger“ abgeschwächt werden.

Eine effektive antiemetische Therapie soll Übelkeit und Erbrechen vollständig verhindern. Dies ist durch Blockade der Rezeptoren für Dopamin, Serotonin, Substanz P und Enkephaline im Brechzentrum möglich.

Den höchsten therapeutischen Index bei der Therapie von akuter Übelkeit und Erbrechen nach Chemotherapie haben 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten und Glucocorticoide. Von den 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten sind Granisetron (Kevatril<sup>®</sup>), Ondansetron (Zofran<sup>®</sup>) und Dolasetron (Anemet<sup>®</sup>) am besten dokumentiert. Sie alle sind ähnlich wirksam

und haben ein vergleichbares Nebenwirkungsspektrum. Die orale Anwendung ist der intravenösen Gabe vorzuziehen<sup>58</sup>.

### 1.2.3.2 Reiseübelkeit/Kinetose

Reiseübelkeit oder eine Kinetose treten auf, wenn die sensorischen Signale vom Auge oder dem Gleichgewichtsorgan im Innenohr über die Position des Körpers nicht mit dem übereinstimmen, was das Gehirn erwartet („Positions-Gedächtnis“)<sup>59,60</sup>. Sie treten zum Beispiel bei abrupter Änderung der Bewegung auf, wie es bei turbulenten Flügen und starkem Seegang der Fall sein kann. Sie können auch durch das Beobachten von bewegten virtuellen Szenen, während der Körper unbewegt ist, ausgelöst werden („Imaxx-360°-Kinos“). Die ersten Anzeichen einer Kinetose sind Blässe, Unruhe, kalter Schweiß und übermäßiger Speichelfluß. Danach kommt es zu Übelkeit und Erbrechen.

Auf Neurotransmitterebene spielen vor allem Acetylcholin und Noradrenalin eine Rolle. Das ZNS reagiert auf provokative Stimuli, zusätzlich werden vestibuläre Impulse in die vestibulären Nuclei, das Cerebellum und die reticulären Bereiche des Hirnstamms geleitet<sup>59</sup>. In diesen Bereichen vermischen sich adrenerge mit cholinergen Neuronen, ihre Wirkung ist gegensätzlich. Die Acetylcholin-innervierten Neurone zeigen eine erhöhte Aktivität nach vestibulärer Stimulation und aktivieren das Brechzentrum, wohingegen die noradrenergen Neurone zu einer Stabilisierung und damit Vermeidung der Übelkeit beitragen.

Medikamentös können anticholinerge oder Noradrenalin-aktivierende Substanzen verwendet werden. Diese sind allerdings größtenteils ohne Zulassung. Zu den therapeutisch verwendeten Anticholinergika gehören Scopolamin, Atropin, Dimenhydrinat, Cyclizin, Meclizin und Promethazin. Zu den (theoretisch) anwendbaren Sympathomimetika gehören d-Amphetamin, Metamphetamin, Phenmetazin und Methylphenidat<sup>61</sup>. Zusätzlich werden H<sub>1</sub>-Antihistaminika zur Therapie der Kinetose angewendet. Eine Wirksamkeit von anderen potenten Antiemetika, wie 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten oder D<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten,

konnte bisher nicht belegt werden. Welchen Einfluß Ingwer bei Reiseübelkeit hat, ist in verschiedenen Studien widersprüchlich dargelegt<sup>62</sup>.

### 1.2.3.3 Postoperative Übelkeit und Erbrechen (PONV)

Unter postoperativer Übelkeit und Erbrechen (postoperative nausea and vomiting, PONV) versteht man eine für den Patienten sehr unangenehme Nebenwirkung eines chirurgischen Eingriffs unter Allgemeinanästhesie. Neben der Unannehmlichkeit für den Patienten kann PONV die Inzidenz von postoperativen Komplikationen erhöhen und führt durch verlängerte Krankenhausaufenthalte der Patienten zu einer Kostensteigerung. Die Gesundheit des Patienten ist gefährdet, da Aspiration des Erbrochenen, Elektrolytverschiebungen, Auseinanderklaffen der Nähte (Nahtdehiszenzen) und relevante Nachblutungen durch das Erbrechen auftreten können<sup>63</sup>.

Die Ursache von PONV ist nicht ganz geklärt. Besonders Eingriffe im Hals- und Nasenbereich sowie im oberen Gastrointestinaltrakt und urologische Operationen zeigen eine hohe Inzidenz von postoperativem Erbrechen. Dies läßt sich zum Teil mit der stark irritierenden Wirkung von Blut auf die ösophagalen Chemo- und Nozirezeptoren erklären. Hinzu kommt eine mechanische Reizung von Pharynx und direkte Irritation der *Nervi trigeminus* und *glossopharyngeus*. Bei Eingriffen im Bereich des Ohres stehen Irritationen von vestibulären und vagalen Afferenzen im Vordergrund<sup>63,64</sup>.

Therapeutisch und zur Prophylaxe von POVN werden Dopamin-Rezeptor-Antagonisten, H<sub>1</sub>-Antagonisten, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten und Glucocorticoide angewendet.

### 1.2.3.4 Übelkeit und Erbrechen in der Schwangerschaft

In den westlichen Industrieländern klagen 50 % bis 90 % aller Schwangeren über Übelkeit. Emesis gravidarum (Erbrechen während der Schwangerschaft) tritt bei rund einem Drittel aller Schwangeren und meistens nur bis zur

20. Schwangerschaftswoche auf. Dieses Erbrechen ist als weitgehend ungefährlich anzusehen. Abzugrenzen hiervon ist die potentiell lebensbedrohliche Hyperemesis gravidarum, die bei 0,3 bis 2 % der Schwangeren auftreten kann. Hier sind ein umgehender Ausgleich von Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten, Ausgleich von Kalorien- und Vitaminszufuhr, sowie eine antiemetische Therapie notwendig.

Zur Pathophysiologie ist nur soviel bekannt, als daß die Hormonumstellung während der Schwangerschaft und die dabei gebildeten Hormone als auslösende Agenzien diskutiert werden. Jedoch konnten weder humanes Choriogonadotropin, noch das Schwangerschaftshormon SP1, Estrogene oder Progesteron eindeutig als Ursache zugeordnet werden<sup>65</sup>.

Die antiemetische Therapie während der Schwangerschaft ist durch prospektive, randomisierte Studien wenig untersucht, was aus ethischer Sicht verständlich ist. Eine Metaanalyse spricht den Antihistaminika einen positiven Therapieeffekt zu und verneint das früher angenommene teratogene Potenzial dieser Substanzklasse. Auch Vitamin B<sub>6</sub> (Pyridoxin) zeigt eine gute Wirksamkeit, obwohl der Wirkmechanismus ungeklärt ist. Dopamin- und Serotonin-Rezeptor-Antagonisten sowie Phenothiazine (Antipsychotika) sind nur wenig untersucht und sollten daher nur in begründeten Einzelfällen angewendet werden. Alternative Therapieoptionen wie Ingwer in Kapselform, Akkupunktur oder Akkupressur sind bisher nur in Fallbeschreibungen oder kleineren Studien beschrieben worden<sup>65</sup>.

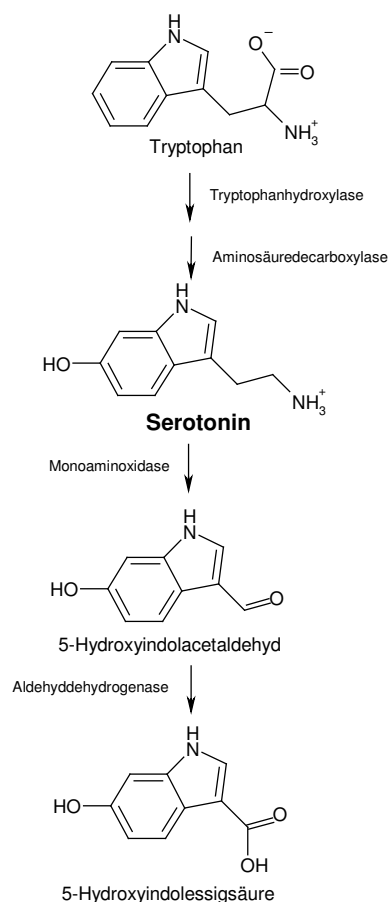
## 1.3 Serotonin und seine Rezeptoren

### 1.3.1 Überblick

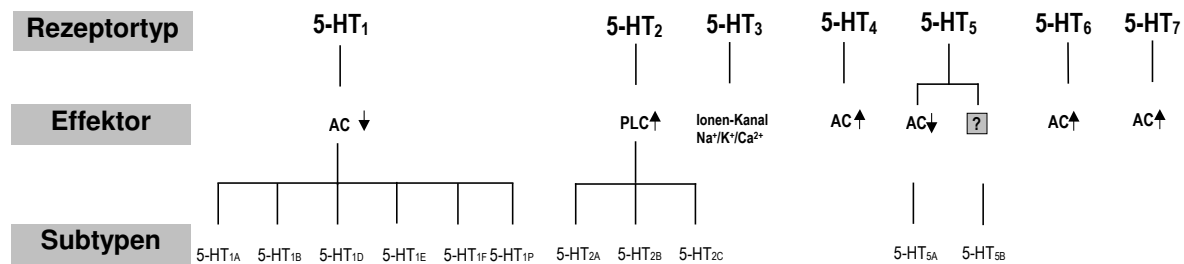
Der Name Serotonin ist zusammengesetzt aus den Begriffen „Serum“ und (Muskel-) „Tonus“ und leitet sich ab von der Beobachtung, daß sich in geronnenem Blut ein Faktor befindet, der die Blutgefäße verengen kann. Diese Beobachtung wurde schon 1868 gemacht, aber erst 1948 konnten Rapport *et al.*<sup>66</sup> das Indolamin 5-Hydroxytryptamin (= Serotonin) als diesen Faktor identifizieren. Etwa zeitgleich wurde Serotonin auch im Gastrointestinaltrakt (GIT) und im Gehirn von Säugetieren gefunden<sup>67</sup>.

Serotonin wird *in situ* aus der Aminosäure Tryptophan über den Zwischenschritt 5-Hydroxytryptophan gebildet. Über eine Decarboxylierung entsteht 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) (s. Abb. 1.10). Der Abbau von Serotonin erfolgt mit Hilfe von Monoaminoxidasen hauptsächlich in der Leber<sup>68,69</sup>. Serotonin wird in intrazellulären Vesikeln von Neuronen gespeichert und bei Depolarisation der Zelle in den synaptischen Spalt freigesetzt. Seine Wirkung wird schnell durch eine Wiederaufnahme in die Neuronen durch spezifische Transporter (SERT) terminiert.

Die Serotoninrezeptoren lassen sich in sieben Hauptfamilien unterteilen, alle mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkungen, regionaler Verteilung und physiologischer Bedeutung. Bei den meisten Serotoninrezeptorfamilien finden sich weitere Subtypen. Anhand ihrer physiologischen Effekte und *second-messenger* Systeme lassen sich die Serotoninrezeptoren in vier Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören der 5-HT<sub>1</sub>- und der 5-HT<sub>5</sub>-Rezeptor, die G<sub>i</sub>-gekoppelt sind und bei Aktivierung zu einer Erniedrigung der Adenylatcyclaseaktivität führen. Der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor bildet die zweite Gruppe, die eine G<sub>q</sub>-Kopplung zeigt und damit zu einer Erhöhung der Phospholipase C-β/Proteinkinase C-Aktivität führt. In der dritten Gruppe finden sich Serotoninrezeptoren aus der G<sub>s</sub>-Protein-Superfamilie, deren Aktivierung eine Erhöhung der Adenylatcyclaseaktivität bewirken. Zu dieser Gruppe gehören der 5-HT<sub>4</sub>-, 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptorsubtyp. In der letzten Gruppe befindet sich der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, der im Gegensatz zu allen anderen Serotoninrezeptorfamilien nicht in die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, sondern einen ligandengesteuerten, nichtselektiven Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Ionenkanal bildet. Er gehört zu der Gruppe der Cys-Schleifen-Rezeptoren und macht ihn damit verwandt mit dem nicotinischen Acetylcholin-, dem GABA<sub>A</sub>- und dem Glycinrezeptor. Eine Übersicht ist in Abb. 1.11 dargestellt.



**Abb. 1.10 Biosynthese und Metabolismus von Serotonin**



**Abb. 1.11 Übersicht der Serotonin-Rezeptoren, ihrer *second messenger* und der Subtypen**

AC = Adenylatcyclase, PLC = Phospholipase C, modifiziert nach<sup>70</sup>

Serotonin ist bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, wie dem endokrinen und circadianen Rhythmus, Nahrungsaufnahme, Schlaf, Reproduktion, motorische Funktionen, Gedächtnis, Stimmung und Angst. Auch außerhalb des ZNS ist Serotonin weit verbreitet und findet sich unter anderem in den Blutplättchen, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und vor allem in den EC des GIT. Es besteht ein Konsensus, daß die EC und das Gehirn zu den Hauptproduzenten für Serotonin gehören und eine Speicherung neben den produzierenden Zellen hauptsächlich in Blutplättchen und Mastzellen erfolgt<sup>71</sup>.

So vielseitig wie die Physiologie von Serotonin sind auch die Erkrankungen, bei denen dieser Neurotransmitter eine Rolle spielt. Zu nennen sind unter anderem Depressionen, Angst, Panik, Migräne, Eßstörungen, maligne Hyperthermie und nicht zuletzt gastrointestinale Störungen wie Übelkeit und Erbrechen.

Etwa 80 % des körpereigenen Serotonins kommen im Gastrointestinaltrakt vor. 95 % dieses gastrointestinalen Serotonins finden sich in den EC des Darms. Daher soll im Folgenden vor allem auf Serotoninrezeptoren und ihre Wirkungen eingegangen werden, die im GIT von Bedeutung sind.

### 1.3.2 Gastrointestinaltrakt

Das Darmnervensystem befähigt den Darm, als einziges Organ im menschlichen und tierischen Körper, Reflexe und einheitliche nervale Aktivität zu zeigen, sogar



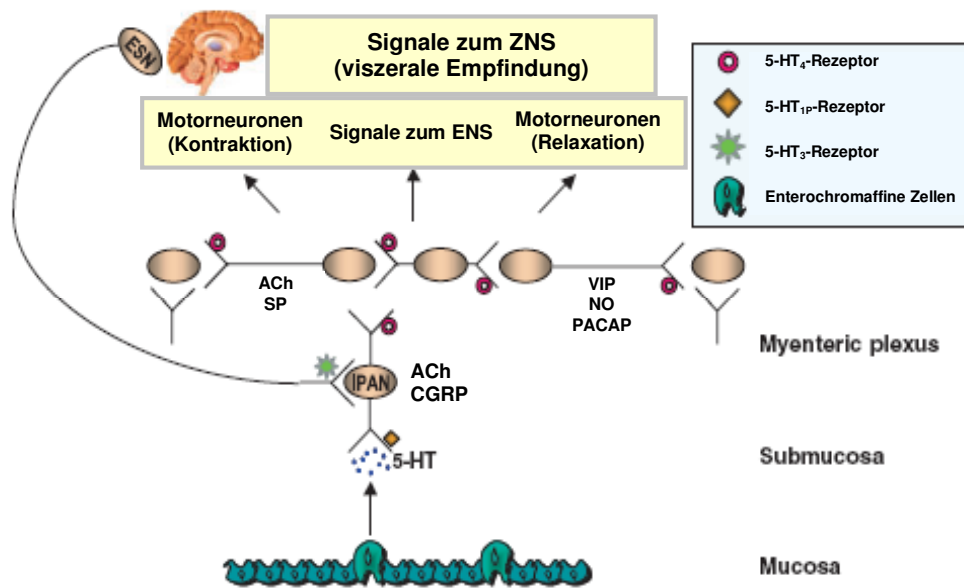
dann, wenn es vom zentralen Nervensystem abgetrennt ist. Die EC spielen hierbei eine bedeutende Rolle, da sie als sensorische Überträger fungieren und sowohl intrinsische als auch extrinsische primär-afferente Neuronen aktivieren können, dies erfolgt durch Freisetzung von Serotonin.

Über den 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor werden peristaltische und sekretorische Reflexe via intrinsische primär-afferente Neurone (IPAN) in der Submucosa ausgelöst<sup>72</sup>. Das „P“ im Suffix steht für „peripheral“, dieser Rezeptor konnte nicht im zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen werden und taucht daher in vielen Übersichten zu Serotoninrezeptoren nicht auf<sup>73</sup>. Er ist aber ebenfalls in der Haut und in lymphatischem Gewebe zu finden. Es handelt sich um einen G-Proteingekoppelten Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer langsamen Depolarisation von Neuronen führt. Agonisten am 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor sind in Position 5 oder 6 des Indolringes hydroxylierte Indalpine (Metaboliten des Antidepressivums Indalpine)<sup>73</sup>, Sumatriptan<sup>74</sup> und Renzapride, wobei letzteres nicht selektiv ist. Antagonisten sind BRL 24924 und das Dipeptid *N*-Acetyl-5-hydroxytryptophyl-5-hydroxytryptophan (5-HTP-DP). Ein Agonismus am 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor führt zu starker Diarrhoe, da die Peristaltik und Sekretion des Darmes erhöht werden. Ein Antagonismus dagegen führt zu einer absoluten Darmträgheit bis hin zum Darmverschluss (Ileus), so daß eine Beeinflussung dieses Serotonin-Rezeptor-Typs aus pharmazeutisch-medizinischer Sicht nicht besonders attraktiv erscheint<sup>75</sup>. In einigen Darstellungen zur Serotonin-Rezeptorverteilung im GIT findet man die Beschreibung eines „5-HT<sub>1</sub>-like“-Rezeptors. Es ist nicht ganz klar, ob damit der 5-HT<sub>1P</sub>-Rezeptor gemeint ist oder ob man, wie im ZNS, den 5-HT<sub>7</sub>-Subtyp meint. Die Bezeichnungen gehen durcheinander und es ist sehr schwierig eine klare Aussage zu finden. Der 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor soll hier daher nicht weiter behandelt werden.

Die Stimulation von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren führt zu einer erhöhten Freisetzung von Transmittern wie Acetylcholin und calcitonin gene-related peptide (CGRP) im Rahmen des prokinetischen Reflexbogens. Man kann sagen, daß die Effektivität der nervalen Stimulation oder des Ansprechens der intestinalen glatten Muskulatur von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren verstärkt wird, eine direkte Aktivierung erfolgt allerdings

nicht. Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor ist, wie fast alle Serotonin-Rezeptoren, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der sich auf Nervenzellen, und dabei vor allem auf cholinergen Neuronen, befindet. Seine Aktivierung erzeugt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und es kommt zu einer Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle über eine cAMP-abhängige Proteinkinase. Man findet ihn bei vielen Spezies und in fast allen Geweben. Zu den Agonisten zählen Tegaserod, Cisaprid und Rezaprid. Antagonistisch wirksam ist die Substanz GR 113808<sup>72,75</sup>.

Eine einzigartige Ausnahme, nicht nur innerhalb der Population der Serotonin-Rezeptoren, aber auch aller Mono- und Diaminneurotransmitter-Rezeptoren, bildet der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Es handelt sich um einen liganden-gesteuerten Ionenkanal, dessen Aktivierung zu einer schnellen Depolarisierung der Nervenzelle führt. Dadurch werden vor allem extrinsische sensorische Nerven aktiviert. Die Verbindung des enteralen Nervensystems (ENS) mit dem ZNS wird hauptsächlich über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelt. Es ist bekannt, daß im Intestinum hervorgerufene Empfindung wie Übelkeit, Schmerz, Blähungen und Druck auch das Gemüt und die Wahrnehmung beeinflussen können. Der größte Teil der vagalen Nervenfasern überträgt sensorische Informationen zwischen Darm und Gehirn. Agonisten am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor sind 2-Methyl-5-HT und SR 57227A, zu den Antagonisten gehören Tropisetron, Ondansetron, Granisetron und Alosetron. Die ersten drei finden eine therapeutische Anwendung bei chemotherapieinduzierter Übelkeit und Erbrechen, Alosetron wird bei der Therapie des Reizdarmsyndroms mit Diarrhö angewendet<sup>72,75</sup>.



**Abb. 1.12 Schematische Darstellung eines Teils des serotonergen Systems des ENS. Nach Cash et al. (2005)<sup>88</sup>**

ACh = Acetylcholin; CGRP = Calcitonin gene-related peptide; ENS = enterisches Nervensystem; ESN = extrinsische sensorische Neurone; IPAN = intrinsische primär-afferente Neurone; NO = Stickstoffmonoxid; PACAP = pituitary adenylate cyclase-activating peptide; SP = Substanz P; VIP = vasoaktives intestinales Peptid; ZNS = zentrales Nervensystem

Die Komplexität des Zusammenspiels von 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im GIT ist noch nicht vollständig geklärt. Serotonin wird aus den enterochromaffinen Zellen auf der basalen Seite freigesetzt und kann an verschiedenen Subtypen der Serotonin-Rezeptoren, vor allem im *Plexus myentericus* und *Plexus submucosus*, wirken (Abb. 1.12). Eine wichtige Rolle spielen ebenfalls die nachgeschalteten Neurotransmitter VIP (vasoaktives intestinales Peptid), NO (Stickstoffmonoxid), ACh (Acetylcholin), CGRP (calitonin gene-related peptide) und SP (Substanz P), die auf Grund des Serotoninstimulus freigesetzt werden und ihrerseits an der Darmmuskulatur und den Epithelzellen eine Wirkung ausüben.

Eine weitere wichtige Rolle für Serotonin im Gastrointestinaltrakt spielen die Serotonin Reuptake Transporter (SERT) der Enterozyten in der Mucosa, da es für

5-HT, im Gegensatz zu Acetylcholin, keine extrazellulären Enzyme für den Abbau gibt. Die notwendigen Abbauenzyme finden sich nur innerhalb der Zellen, so daß die Antwort auf eine 5-HT-Freisetzung nur über einen Transport in die Zellen oder durch Diffusion aus dem synaptischen Spalt beendet werden kann. Dieser Vorgang ist weiterhin notwendig, um eine Rezeptordesensitivierung zu verhindern. Bekannte Arzneistoffe, die die SERT beeinflussen, sind die Tricyclischen Antidepressiva, selektive Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRI) und Cocain. Alle diese Wirkstoffe zeigen Nebenwirkungen im GIT.

Zusammenfassend sind die folgenden Komponenten für die Serotoninwirkung im GIT verantwortlich: die enterochromaffinen Zellen, da sie Serotonin als ersten Signalstoff ausschütten, dann die serotonin-empfindlichen Nerven, die das Signal spezifizieren, je nachdem welchen Serotonin-Rezeptor-Typ sie tragen und schließlich die SERT, die die Antwort auf die Serotoninausschüttung beenden.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das ätherische Öl von *Zingiber officinale* ROSCOE auf seine pharmakologische Wirksamkeit, speziell im serotoninergen System des Gastrointestinaltraktes und des ZNS, untersucht werden. Zu Grunde liegt die Fragestellung, ob ätherisches Öl von Ingwer in Ingwerpräparaten zu den beschriebenen pharmakologischen Wirkungen, vor allem zu der antiemetischen Wirksamkeit, beiträgt und daher als wertbestimmender Anteil Beachtung finden muß.

Das ätherische Öl sollte gewonnen werden und dann die Vielzahl der enthaltenen Komponenten in Fraktionen aufgetrennt werden. Die in den Fraktionen enthaltenen Substanzen sollten identifiziert werden, um sie in Reinform in den pharmakologischen Testsystemen hinsichtlich einer antiserotoninergen Wirkung untersuchen zu können. Das ätherische Öl, die gewonnenen Fraktionen sowie ausgewählte Reinsubstanzen aus dem Öl sollten in einem zellkulturbasierten Assay sowie am isolierten Rattenileum getestet werden, um einen möglichen Antagonismus zu Serotonin, speziell am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor, aufzuzeigen. Dies wäre ein Hinweis auf einen antiemetischen Wirkmechanismus der Komponenten.

Weiterhin war es Ziel dieser Arbeit, einen in der Literatur beschriebenen hemmenden Effekt von Serotonin auf die Insulinsekretion von Inselzellen des Pankreas an INS-1-Zellen zu untersuchen. Ein Hexanextrakt aus Ingwer, der in anderen Testungen bereits eine antiserotoninerge Wirksamkeit gezeigt hatte, sollte dann auf die Möglichkeit untersucht werden, diesen Serotonineffekt zu hemmen.

Extrakte der Firma Finzelberg, die mit unterschiedlichen Verfahren hergestellt worden waren, wurden auf ihre Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor getestet.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Zelllinien

Die Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in 20 ml Kompletmedium bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellzahl wurde mittels Zellzählung in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

#### 2.1.1.1 N1E-115

Neuroblastomazellen des Klons N1E-115 von der Maus wurden für die [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messungen verwendet. Die Zellen dieses Klons exprimieren den ligandengesteuerten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und den Tetrodotoxin-sensitiven, spannungsabhängigen Natrium-Kanal. Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Bönisch, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.1.2 INS-1

Diese Zelllinie wurde aus einem Röntgen-induzierten Ratteninsulinom kultiviert. Es handelt sich um eine permanente Zelllinie, die 1992 von Asfari *et al.*<sup>76</sup> etabliert wurde. Sie weist ähnliche Charakteristika wie native Beta-Zellen auf und reagieren auf eine Glucosestimulation in nahezu physiologischen Konzentrationen (2,8 – 20 mM) mit entsprechender Insulinsekretion.

## 2.2 Drogenmaterial und Extrakte

Zingiberis officinalis rhizoma DAB 1999, Chargennummern 00110836 (Herkunftsland: Nigeria) und 15700648 (Herkunftsland: Vietnam) wurde von der Firma Finzelberg, Andernach zur Verfügung gestellt.

Ebenfalls von der Firma Finzelberg stammten die untersuchten Ingwer-Extrakte UB 2005-141 (ein Spissum-Extrakt), UB 2005-193 (ein aus UB 2005-141 hergestellter Siccum-Extrakt) und Polyvinylpyrrolidon (Povidon, PVP) als Trägermaterial des Siccum-Extraktes und Vergleichssubstanz.

## 2.3 Chemikalien und Geräte

Alle Chemikalien wurden nach Möglichkeit in *pro analysis*-Qualität verwendet

### 2.3.1 Destillation, Analytik und Fraktionierung

#### Chemikalien

Silikonöl	Merck, Darmstadt
Dünnschichtchromatographie-Aluminiumplatten, Beschichtung: Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , 250 µm, 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt
Toluol	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Kieselgel für die Säulenchromatographie Korngröße: 0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh	Merck, Darmstadt
n-Hexan	Merck, Darmstadt

n-Pentan	AppliChem, Darmstadt
2-Chlorpropan	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

## Geräte

Glasdestillationsapparatur nach DAB 9	Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Münster
Glaschromatographierohr, 250 mm x 30 mm	eigener Laborbestand
GC-Gerät: Agilent 6890N	Agilent Technologies, Böblingen
GC-Säule: Agilent 19091S-433, HP5-MS, 0,25 mm x 30 m x 0,25 µM	Agilent Technologies, Böblingen
MS-Detektor: Agilent 5973	Agilent Technologies, Böblingen
Injector: Agilent 7683B	Agilent Technologies, Böblingen

## 2.3.2 Zellkultur

### Chemikalien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Penicilin/ Streptomycin, 100fach	PAA, Cölbe
L-Glutamin, 200 mM	PAA, Cölbe
HEPES, 1M	PAA, Cölbe
Natriumpyruvat, 100 mM	PAA, Cölbe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe



Mercaptoethanol, 50 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 1:125, 10fach	PAA, Cölbe
PBS-Puffer	PAA, Cölbe

## Geräte

Kryobehälter	Taylor-Wharton
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kühlzentrifuge CR412	Jouan GmbH, Dinslaken
Lichtmikroskop	Krüss GmbH
Multiwellplatten 24er für INS-1-Zellen	Nunc, Wiesbaden
Multiwellplatten 24er für N1E-115-Zellen	Biochrom, Berlin
Pipettboy	Abimed
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Werkbank	Antair BSK, Kaarst
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbecht
Zellkultur-Brutschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin
Zellkulturschrank IG 150	Jouan GmbH, Dinslaken

### 2.3.3 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx, Rattenileum und Insulinsekretion

#### Chemikalien

Serotonin creatinine sulphate monohydrat	Fluka, Buchs, Schweiz
Veratridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tropisetron	Novartis Pharma, Frankfurt
[ <sup>14</sup> C]Guanidinium-HCl	Biotrend, Köln

Szintillationsflüssigkeit Unisafe 1	Zinsser Analytik, Frankfurt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure und N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt
Cholinchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Riedel de Häen, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
D-Glucose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, Holland
Triton X 100	Fluka, Buchs, Schweiz
Acetylcholin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ondansetron HCl	GlaxoWellcome, Bad Oldesloe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Riedel de Häen, Seelze
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt

## Geräte

Beta-Counter MicroBeta 1450	Perkin-Elmer
Soft-Wells 24er für MicroBeta 1450, 1ml Inhalt	Wallac Oy, Turku, Finland
24-well-Cassette für Microbeta 1450	Perkin-Elmer
Organbad	Eigenbau
Multi-Pen-Recorder	Rikadenki Kogyo, Tokio, Japan
Hebelaufnehmer Lever Transducer B40 Typ 373	Hugo Sachs Elektronik, March

2-Kanal-Brückenverstärker, Typ 301

Hugo Sachs Elektronik, March

Thermostat Haake D1

Fisons, Berlin

## 2.3.4 Sonstige Chemikalien

### Inhaltsstoffe des ätherischen Öls von *Zingiber officinale* ROSCOE

(-)- $\alpha$ -Pinen	Fluka, Buchs, Schweiz
Camphen	Merck, Darmstadt
Myrcen	Fluka, Buchs, Schweiz
$\beta$ -Pinen	Fluka, Buchs, Schweiz
$\alpha$ -Phellandren	Fluka, Buchs, Schweiz
(+)-R-Limonen	Fluka, Buchs, Schweiz
Terpinolen	Fluka, Buchs, Schweiz
(-)- $\alpha$ -Copaen	Fluka, Buchs, Schweiz
(+)-Aromadendren	Fluka, Buchs, Schweiz
(+)-3-Caren	Fluka, Buchs, Schweiz
(-)-Borneol	Fluka, Buchs, Schweiz
$\alpha$ -Terpineol	Merck, Darmstadt
Terpineol (Isomeregemisch)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ocimen	Fluka, Buchs, Schweiz

### Mycoplasmenkit

VenorGEM<sup>®</sup> Mycoplasmen-Detektionskit

Biochrom, Berlin

Sonstige Chemikalien, die nicht speziell aufgeführt werden, entsprechen dem üblichen Laborbedarf.

### 2.3.5 Sonstige Geräte

Alle sonstigen Geräte, die nicht im speziellen aufgeführt werden, entsprechen der üblichen Laborausrüstung.

## 2.4 Lösungen

### Zellkulturmedien

<b>INS-1-Zellen</b>	RPMI 1640	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	HEPES	10 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	Mercaptoethanol	0,5 ml

<b>N1E-115-Zellen</b>	DMEM, high Glucose	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml

### Puffer

<b>[<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx Inkubationspuffer pH 7,4</b>	HEPES	25 mM
	Tris	25 mM
	KCl	5,4 mM
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,98 mM

	D-Glucose	5,5 mM
	Cholinchlorid	135 mM
	BSA	1 mg/ml
<b>[<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx</b>		
<b>Waschpuffer</b>		
<b>pH 7,4</b>		
	HEPES	25 mM
	Tris	25 mM
	KCl	5,4 mM
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,98 mM
	D-Glucose	5,5 mM
	NaCl	135 mM
<b>Rattenileum</b>		
<b>Krebs-Henseleit-Lösung</b>		
<b>pH 7,4</b>		
	NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
	D-Glucose	5,5 mM
	NaCl	119 mM
	KCl	4,7 mM
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
<b>Insulinsekretion</b>		
<b>Krebs-Ringer-HEPES</b>		
<b>pH 7,4</b>		
	NaCl	119 mM
	KCl	4,8 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2,5 mM
	HEPES	10 mM
	BSA	0,5 %

Dem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer wurde als Inkubationspuffer für die Insulinsekretionsversuche Glucose in den Konzentrationen 3 und 5,6 mM hinzugefügt.

### 3 TIERE

Die Versuche am isolierten Rattenileum wurden mit Wistar-Ratten durchgeführt. Dies ist ein Stamm von Albino-Ratten, der 1906 im Wistar-Institut in Philadelphia, USA, gezüchtet wurde. Sie stammen von der braunen Ratte *Rattus norvegicus* ab.

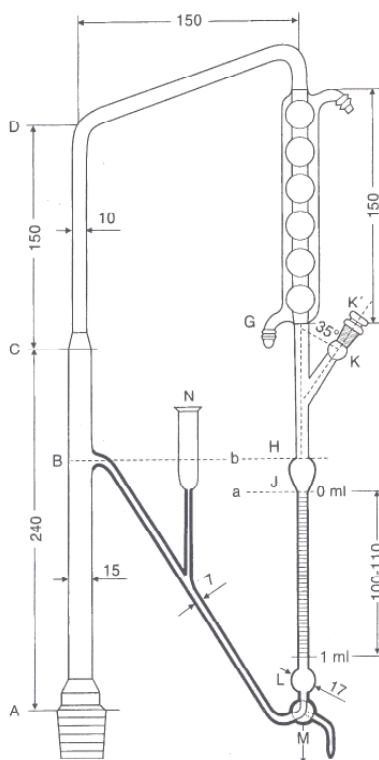
Die Tiere erhielten Wasser und eine Standard-Pellet-Diät der Firma Altromin *ad libitum* und wurden in einem Raum mit einer Temperatur von durchschnittlich 22 °C gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug zwölf Stunden. Zum Versuchszeitpunkt hatten die Tiere ein Gewicht von 170 – 300 g.

## 4 METHODEN

### 4.1 Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls

#### 4.1.1 Wasserdampfdestillation

Um das ätherische Öl des Ingwers zu gewinnen wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt.



**Abb. 4.1** Wasserdampfdestillationsanlage

Alle Maßangaben in cm; A = Kolbenansatz; G = Kühlung; J - L = Sammelrohr; M - B = Rücklaufrohr

30 g Droge wurden fein zerschnitten und mit 250 ml Aqua destillata in einer Wasserdampfdestillationsapparatur nach Europäischem Arzneibuch (Abb. 4.1) destilliert. Die Destillationszeit betrug zwei Stunden. Um ein starkes Schäumen des Ansatzes zu verhindern, wurden zwei Tropfen Silikonöl zugesetzt.

Nach dem Ablassen wurde das ätherische Öl in einem Schnappdeckelglas gesammelt und das suspendierte Wasser mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (wasserfrei) entfernt. Nach jeder Destillation wurde das ätherische Öl bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Um eine quantitative Bestimmung des destillierten Öls vorzunehmen, wurde die

Wasservorlage in der Destillationsapparatur mit 0,5 ml Xylol als Hilfsphase versetzt.

### 4.1.2 Fraktionierung

Das ätherische Öl von Ingwer stellt ein Multikomponentensystem dar. Da es ein Ziel dieser Arbeit war, einzelne Bestandteile oder zumindest Inhaltsstoffgruppen pharmakologisch zu testen, war es notwendig, eine Fraktionierung des Öls vorzunehmen. Diese Vortrennung sollte es ermöglichen, durch Vereinfachung der Probenzusammensetzung einzelne Stoffe zu identifizieren und auf Grund der Polarität in Substanzklassen einzuteilen.

Mit Hilfe der trockensäulenchromatographischen Fraktionierung nach Kubeczka (1973)<sup>77</sup>, wurde das ätherische Öl in fünf Fraktionen aufgeteilt. Die Apparatur besteht aus einem Chromatographierohr aus Glas von 250 mm Länge und 30 mm im Durchmesser. Das untere Ende dieses Rohres ist mit einem Dreiwegehahn verschlossen, das obere Ende ist mit einem Ansatzstück mit Schliff NS 29/32 versehen. Auf diesen Schliff wird zur Fraktionierung ein Flash-Aufsatz angebracht. Als Vorlage dienen Rundkolben NS 29/32 unterschiedlicher Größe. In die Säule wurde Kieselgel für die Säulenchromatographie 10 cm hoch eingerüttelt. Auf das obere Ende wurden 3 ml einer 20 %igen Lösung des ätherischen Öls in n-Hexan gleichmäßig aufgegeben und mit ca. 1 cm Kieselgel und etwas Watte abgedeckt. Mit Hilfe des Flash-Aufsatzes wurde mit 200 ml n-Pentan (Fraktion 1) eluiert. Fraktion 2 wurde durch Elution der trockengelauften Säule mit 120 ml 2-Chlorpropan erhalten. Nach Trockenlaufen der Säule konnten die stärker polaren Anteile schließlich durch Dreiteilung der Säulenfüllung im Verhältnis 4:3:3 von unten nach oben und anschließender Elution mit 40 ml Ether-Methanol (8+2) erhalten werden. Die Eluate wurden zur Entfernung des Methanols jeweils zweimal mit 40 ml Wasser ausgeschüttelt und die Etherphase über Natriumsulfat getrocknet. Alle fünf Fraktionen wurden bei ca. 400 mbar bei RT eingengt.



### 4.1.3 Dünnschichtchromatographie

Eine dünnschichtchromatographische Analyse des ätherischen Öls, sowie der gewonnenen Fraktionen, wurde auf DC-Kieselgelplatten (Aluminiumplatten beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 250 µm, 20x10 cm) durchgeführt. Als Fließmittel diente ein Toluol-Ethylacetat-Gemisch im Verhältnis 9:1. Zur Detektion wurden UV 365 nm, 254 nm und Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz verwendet. Die Entwicklung erfolgte für ca. 3 min. bei 110 °C im Trockenschrank. Vor dem Auftragen auf die Platten wurden das ätherische Öl und die Fraktionen stark in n-Hexan verdünnt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 2 bis 8 µl auf die Chromatographieplatten aufgetragen.

### 4.1.4 Gaschromatographie

Das ätherische Öl, die gewonnenen Fraktionen 1 bis 5, wurden mit Hilfe der Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) bestimmt. Zusätzlich wurden bekannte Inhaltsstoffe des Öls mit dieser Methode untersucht. Dies sollte eine Identifizierung der in den Fraktionen erhaltenen Komponenten erleichtern.

Die Proben wurden in n-Hexan verdünnt (1:1000 bis 1:100000) und nach dem in Tabelle 4.1 dargestellten Temperaturprogramm gaschromatographisch aufgetrennt.

Starttemperatur:	40 °C
Split:	50:1
Inlettemperatur:	220 °C
Carriergas:	Helium
Flow:	1 ml/min
Detektortemp.:	280 °C

Phase	Heizrate (°C/min)	Endtemperatur (°C)	Haltezeit (min)
1	4	125	3
2	1	140	0
3	10	250	5

**Tabelle 4.1 Temperaturprogramm Gaschromatographie**

Die erhaltenen Massenspektren wurden mit der elektronischen Datenbank des National Institute for Safety and Technology (NIST), Gaithersburg, USA, verglichen, um Inhaltsstoffe zu identifizieren. Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse erfolgte ein zusätzlicher Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten der Reinsubstanzen mit den GC-Spektren der Fraktionen und des ätherischen Öls. Zusätzlich wurden für alle eluierten Substanzen die linearen Retentionsindices (LRIs) bestimmt.

#### 4.1.4.1 Bestimmung linearer Retentionsindices (LRIs)

Um die gaschromatographische Analyse von komplexen ätherischen Ölen auswerten zu können, werden Retentionsindices eingesetzt. Das von Kováts 1958<sup>78</sup> beschriebene Retentionsindexsystem ermöglicht es, die Lage einer Verbindung relativ zu zwei benachbarten aliphatischen Kohlenwasserstoffen zu beschreiben. Die Berechnung des Retentionsindex  $R_i$  gilt allerdings streng genommen nur für eine isotherme Arbeitsweise. 1963 wurde daher von Van den Dool und Kratz<sup>79</sup> der lineare Retentionsindex für temperaturprogrammierte Arbeitsweisen eingeführt. Er beruht auf der Annahme, daß bei linearer Programmierung der Temperatur mit niedriger Aufheizrate (1 - 4 °C/min) ein linearer Zusammenhang zwischen  $t(n)$  und  $n$  (= Kettenlänge) erreicht wird. Dies

ermöglicht die Berechnung des  $R_i$  bei temperaturprogrammierter Arbeitsweise nach folgender Formel<sup>80</sup>:

$$R_i (A, T, P, \text{Progr.}) = 100 \cdot n + 100 \cdot \frac{t(A) - t(n)}{t(n+1) - t(n)}$$

$R_i$	= linearer Retentionsindex
A	= Analyt
T	= Temperatur
P	= stationäre Phase
Progr.	= Temperaturprogramm
n	= Kettenlänge des n-Alkans welches vor dem Analyten erscheint
t	= Retentionszeit

Mit der gleichen Methode, mit der auch das Ingweröl und die Fraktionen gaschromatographisch untersucht wurden, wurde eine n-Alkanreihe (Octan bis Docosan) getrennt. Man erhält so Bezugswerte, mit deren Hilfe man die LRIs der zu identifizierenden Komponenten bestimmen und diese mit Literaturdaten<sup>81</sup> vergleichen kann.

#### 4.1.5 Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol

Um zu überprüfen, ob die Gingerole wasserdampflich sind, wurden ein paar Tropfen [6]-Gingerol in einer Mini-Destillationsanlage in ca. 30 ml Wasser gegeben, es wurde zwei Stunden in Gegenwart von Xylol im Sammelrohr destilliert. Nach der Destillation wurden sowohl die Xylophase als auch die Wasserphase aus dem Sammel- und dem Rücklaufrohr, zwei Proben der Wasserphase aus dem Rundkolben und Xylol, [6]-Gingerol und [6]-Shogaol als Vergleichslösungen auf eine DC Platte (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 250 µm, 10x10 cm)

aufgetragen (je 2  $\mu$ l) und mittels Toluol : Ethylacetat 9:1 (V/V) entwickelt. Detektiert wurde unter UV 365 nm, UV 254 nm und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, Entwicklung ca. 3 Minuten bei 110 °C im Trockenschrank.

Zum Vergleich wurde eine Destillation unter gleichen Bedingungen ohne [6]-Gingerol, aber mit Xylolvorlage, durchgeführt.

## **4.2 Pharmakologische Testung**

### **4.2.1 Testlösungen**

Das ätherische Öl, die Fraktionen 1 bis 5 und die Reinsubstanzen wurden in Wasser unter Zusatz von maximal 3 % DMSO gelöst, bzw. im Ultraschallbad suspendiert. Verdünnungen wurden mit Wasser so hergestellt, daß über mindestens eine Stunde keine Auftrennung der Komponenten sichtbar war. Wenn ein Zusatz von mehr als 3 % DMSO notwendig war, um die Lösungen oder Suspensionen zu stabilisieren, wurde eine höher konzentrierte Stammlösung angesetzt, aus der die entsprechenden Verdünnungen mit Wasser hergestellt wurden.

Es ist möglich, daß einige pharmakologisch wirksame Bestandteile des ätherischen Öls durch die Fraktionierung verloren gingen. Um dies zu überprüfen wurde eine Mischung der Fraktionen 1 bis 5 (Mix) hergestellt, in der diese, entsprechend ihrem Anteil am ätherischen Öl, vertreten waren. Diese Mischung wurde bei der Testung des [ $^{14}$ C]Guanidinium-Influxes eingesetzt und mit dem Effekt des unfraktionierten Öls verglichen.

## 4.2.2 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx (N1E-115 Zellen)

### 4.2.2.1 Untersuchungen am ätherischen Öl von Ingwer, den Fraktionen und verschiedenen Reinsubstanzen

Der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx wird an murinen Neuroblastomazellen des Klons N1E-115 bestimmt. Er ist ein Maß für die Offenwahrscheinlichkeit des durch den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor gebildeten ligandengesteuerten Ionenkanals. [<sup>14</sup>C]Guanidinium ist ein radioaktiv markiertes, organisches Kation, welches in natriumfreier Umgebung den Ionenkanal passieren kann.

Die N1E-115-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), welches Natriumpyruvat, Glucose (4,5 g/ml) und Pyridoxin enthielt, kultiviert. Dem Wachstumsmedium wurde Penicillin (100 I.U./ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 10 % fötales Kälberserum zugesetzt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank unter feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und zweimal pro Woche subkultiviert. Drei Tage vor dem [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx Experiment wurden die Zellen zu 2,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml in einer 24er-Multiwell-Platte ausgesät.

Nach Absaugen des Wachstumsmediums wurden die Zellen gewaschen und für 20 Minuten mit auf 37 °C erwärmten Inkubationspuffer (300 µl/Well) und zu testenden Substanzen vorinkubiert. Die Vorinkubation fand unter feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen bei Raumtemperatur für weitere 2,5 Minuten mit dem gleichen Inkubationspuffer, welcher zusätzlich 5 µM [<sup>14</sup>C]Guanidinium (spezifische Aktivität 55 mCi/mmol), die zu untersuchende Substanz und 100 µM Serotonin enthielt, inkubiert. Die Inkubation wurde durch Absaugen des Inkubationspuffers und zweimaliges schnelles Waschen mit eiskaltem Waschpuffer beendet. Danach wurden die Zellen in 0,5 ml 0,1 % Triton X 100 aufgelöst und der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Gehalt der entstandenen Lösung durch eine Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Alle Experimente wurden als Duplikate oder Triplikate durchgeführt. 100 µM Tropicsetron diente als Positiv-Kontrolle.

Wirksame Substanzen, im Sinne eines Serotonin-Antagonismus, inhibieren den Influx des radioaktiven Kations.

Da N1E-115-Zellen nicht nur über den 5-HT<sub>3</sub>-gekoppelten, sondern auch über einen spannungsabhängigen Ionenkanal verfügen, wurde der Einfluß der Testsubstanzen zusätzlich auf die Durchlässigkeit dieses Kanals für Kationen untersucht. Auch der spannungsabhängige Ionenkanal ist durchlässig für [<sup>14</sup>C]Guanidinium und trägt mit zu dem Blankwert (keine Serotoninstimulation) des oben genannten Assays bei.

Die Durchführung dieses zweiten Assays entspricht der oben beschriebenen Arbeitsweise, allerdings wurde als Effektor Veratridin statt Serotonin verwendet, da es die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Ionenkanals verlängert. Als Vergleichssubstanz diente auch hier Tropisetron.

#### 4.2.2.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit eines ethanologischen Spissum-Extraktes

Ingwer wird auch heute schon im Bereich der Phytotherapie als Antiemetikum verwendet. Im Rahmen der evidence-based-medicine (EBM) sind Untersuchungen zu Wirksamkeit und Wirkmechanismus von Phytopharmaka für die Hersteller von besonderem Interesse. Im Folgenden wurde ein Extrakt der Firma Finzelberg mit dem [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Assay auf 5-HT<sub>3</sub>-antagonistische Aktivität untersucht.

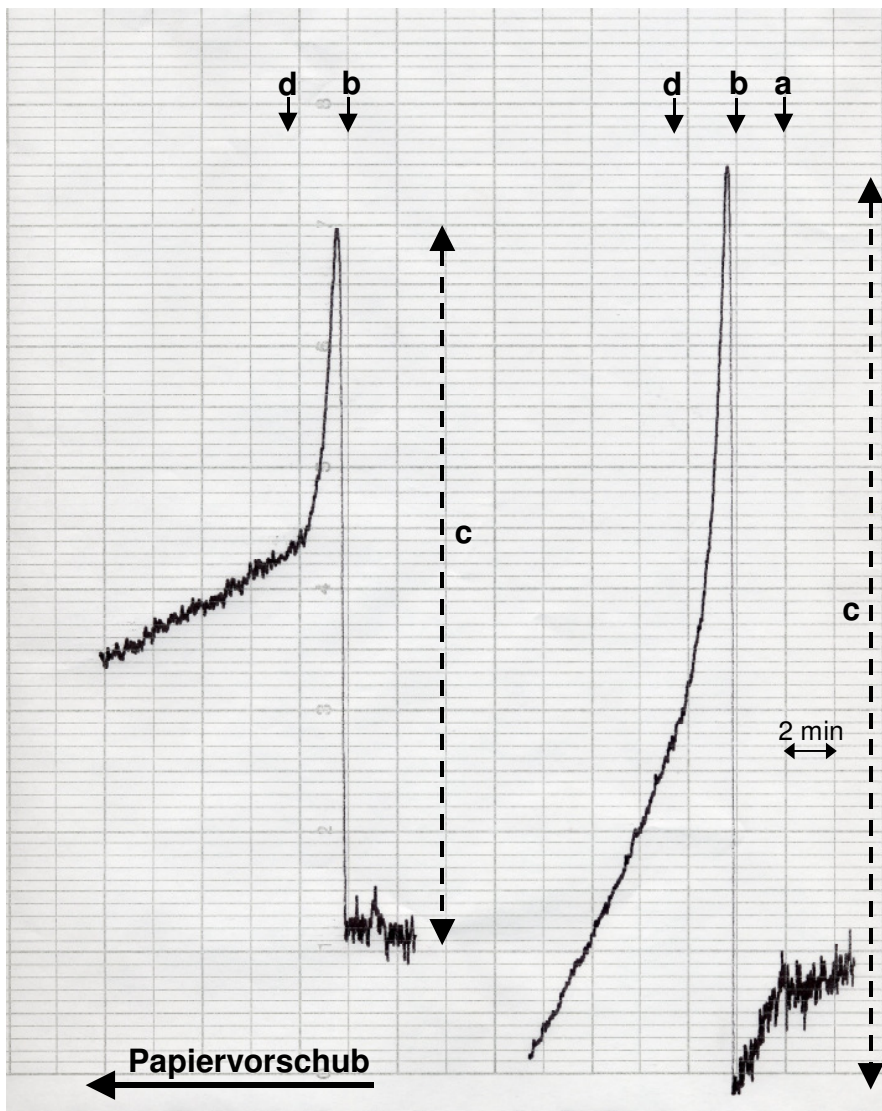
Bei dem Extrakt handelte es sich um ein rieselfähiges, gut wasserlösliches Pulver, welches in einem Sprühtrocknungsverfahren aus einem ethanologischen Spissum-Extrakt (UB 2005-141), unter Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (Povidon, PVP), hergestellt wurde. Der Trockenextrakt (Siccum-Extrakt, UB 2005-193) enthielt 28 % nativen Extrakt. Das Lösungsmittel Ethanol war im Spissum-Extrakt nur noch in Spuren enthalten. Ziel der Untersuchung war es, die Wirksamkeit des nativen Spissum-Extraktes und des Siccum-Extraktes zu prüfen und festzustellen, ob während des Herstellungsprozesses wirksame Komponenten verloren gehen. Zusätzlich wurde PVP untersucht, um einen Eigeneffekt dieser Substanz zu überprüfen.

### 4.2.3 Testung am isolierten Rattenileum

Weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 170-300 g wurden durch Vertiefung einer Ethernarkose getötet. Das Ileum wurde sofort nach dem Tod der Tiere entnommen, vom Gekröse befreit, in etwa 2 cm lange Stücke geschnitten und an beiden Seiten mit Fadenschlaufen versehen. Dies geschah in der Art, daß das Lumen an beiden Seiten offen blieb. Danach wurde das Organstück in 10 ml Krebs-Henseleit Puffer (pH 7,4) eingehängt und unter 1,0 g Spannung gehalten. Der Puffer im Organbad wurde über eine Kanüle mit Carbogen begast, ein umgebendes Wasserbad hielt ihn auf 37 °C erwärmt. Die Equilibration im Organbad dauerte ca. 45 Minuten, danach konnte eine stabile Basislinie mit dem Schreiber aufgezeichnet werden. Die Kontraktionen des Organsegments wurde über einen Hebelarm isotonisch aufgenommen. Aus dem Puffervorratsgefäß wurde mit Carbogen begaster Puffer über eine spiralförmige Glassäule, die sich ebenfalls im temperierten Wasserbad befand, direkt zu dem Organbad geleitet, so daß das darin befindliche Organ immer mit 37 °C warmen Puffer gespült wurde.

Zu Beginn des Versuchs wurde das Organ mit 10 µM Serotonin kontrahiert, um einen Vergleichswert zu erhalten. Danach wurden die Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf einen spasmolytischen Effekt hin untersucht. Dazu wurde die jeweilige Testsubstanz in der entsprechenden Verdünnung zwei Minuten vor einer Serotoninzugabe in das Organbad gegeben. Die in Gegenwart von Substanz durch 10 µM Serotonin erzeugte Kontraktion wurde aufgezeichnet. Nach jeder Testung wurde das Organbad sechs bis sieben Mal gespült und nach etwa 25 Minuten wurde eine Kontrollkontraktion mit 10 µM Serotonin durchgeführt, um einen neuen Vergleichswert für die folgende Testung zu erhalten.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die Restkontraktion 2,5 min nach Serotoninzugabe gemessen und in Relation zu der Maximalkontraktion zum Zeitpunkt der Zugabe gesetzt. Dieses Vorgehen veranschaulicht Abb. 4.2. Eine Angabe der Ergebnisse erfolgt in Prozent (Rest-)Kontraktion.



**Abb. 4.2 Originalversuchsaufzeichnung der Testung am isolierten Rattenileum**

a = Zugabe Ätherisches Öl 40 nl/ml, b = Zugabe Serotonin 10  $\mu$ M, c = Maximalkontraktion nach Serotoninzugabe, d = Restkontraktion nach 2,5 min; Papiervorschub: 30 cm/h

In einer weiteren Auswertung wird der Einfluss der Testsubstanzen auf die Maximalkontraktion nach Serotoninzugabe dargestellt. Hierzu wird die Größe der entsprechenden Kontraktion mit der vorhergehenden kontraktilen Antwort auf alleinige Serotoninzugabe verglichen. Auch hier erfolgt die Darstellung der Ergebnisse als Prozent Kontraktion.



#### 4.2.4 Insulinsekretion (INS-1 Zellen)

Um den Einfluß von Ingwerextrakten auf die Insulinsekretion quantitativ bestimmen zu können, wurden zellkulturbasierte Insulinsekretionsversuche an Ratteninsulinoma-Zellen durchgeführt.

Dafür wurden INS-1 Zellen in 24er Multiwells ausgesät und bis zur halben Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wachsen gelassen. Am Versuchstag werden die Zellen zweimal mit eiskaltem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH-Puffer) gewaschen und anschließend mit Inkubationspuffer (KRH-Puffer mit 5,6 mM Glucose) und den Testsubstanzen für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Vergleichsansatz, um die Basalinsulinsekretion der Zellen zu bestimmen, dient KRH-Puffer mit 3 mM Glucose. Um die Stimulierbarkeit der INS-1 Zellen über die glucoseinduzierte Insulinsekretion (Glucose 5,6 mM) hinaus zu belegen, wurden die Zellen zusätzlich mit Glibenclamid (1 µg/ml) als positive Kontrolle inkubiert. Dies soll sicherstellen, daß ein eventuell Insulinsekretionssteigernder Effekt auch beobachtet werden kann. Im Inkubationspuffer kumuliert die gesamte über diesen Zeitraum sezernierte Menge Insulin. Die Inkubation wird durch Eiskühlung des Multiwells beendet und Aliquote des überstehenden Puffers entnommen. Diese werden bei -20 °C tiefgekühlt bis zur Bestimmung des Insulingehalts.

Die Insulinbestimmung erfolgte mittels eines kompetitiven Radioimmunoassays. In Standards und Proben enthaltenes Insulin konkurriert mit radioaktiv-markiertem Insulin um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen an einen Antikörper (Antikörper 1). Ein zweiter Antikörper (Antikörper 2) wird dem Ansatz hinzugefügt, um gebundenes Insulin von ungebundenem abzutrennen. Dieser zweite Antikörper ist gegen die Spezies gerichtet, aus der der Antikörper 1 stammt. Wenn nun Carrier-IgG hinzugefügt wird, kommt es zu einer Ausfällung des Antigen-Antikörperkomplexes. Die Radioaktivität der gebundenen, nun ausgefällten Fraktion kann im Gamma-Counter bestimmt werden. Je mehr unmarkiertes Insulin in der Probe ist, desto geringer ist die Menge an gebundenem [<sup>125</sup>I]-Insulin. Mit

Hilfe einer Kalibriergeraden aus Standards mit bekannter Insulinkonzentration (Ratteninsulin) kann der Insulingehalt unbekannter Proben bestimmt werden.

Die maximale Bindung von Insulin durch den Antikörper ( $B_0$ ) wird in einem Ansatz ohne unmarkiertes Insulin bestimmt, so daß nur markiertes Insulin die Bindungsstellen besetzen kann. Diese Bindung wird gleich 100 % gesetzt. Die unspezifische Bindung (NSB) des Insulins ist die Bindung, die zusätzlich zur spezifischen Bindung an den Antikörper stattfindet, wie zum Beispiel an Komponenten des Reaktionsgefäßes. Sie wird bestimmt, in dem man den Versuchsansatz ohne Antikörper behandelt. Subtrahiert man den NSB-Wert von der gemessenen Gesamtbindung ( $B_{Ges}$ ), erhält man die spezifische Bindung ( $B$ ).

#### **4.2.5 Mycoplasmentest**

Die N1E-115- und INS-1-Zellen wurden mit Hilfe des Venor<sup>®</sup> GeM-Testkits für Mycoplasmen der Firma Biochrom auf eine mögliche Kontamination mit diesen Mikroorganismen untersucht. Eine Mycoplasmenkontamination kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Der Venor<sup>®</sup> GeM-Test beruht auf der PCR und ermöglicht einen direkten Nachweis von Mycoplasmen-RNA.

Bei den untersuchten Zelllinien konnte keine Mycoplasmen-RNA nachgewiesen werden. Die Zellkultur ist also nicht kontaminiert.

#### **4.2.6 Statistik und graphische Darstellung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Anzahl  $n$  der unabhängigen Versuche dient als Grundlage.

Für die statistische Auswertung wurde die Einweg-Varianz-Analyse (ANOVA) gewählt, anschließend wurde ein ungepaarter t-Test mit dem Programm RS/1. durchgeführt. Statistisch signifikant sind Ergebnisse, wenn der Wert  $p < 0,05$  ist.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot von SYSTAT Software Inc., USA.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls

#### 5.1.1 Destillation und Fraktionierung

Bei der Wasserdampfdestillation des gepulverten Ingwerrhizoms wird ein klares, gelbes Öl gewonnen, welches sehr aromatisch, mit einer leichten zitronenartigen Note, riecht. Die Ausbeute der Destillation liegt zwischen 0,9 % (grobe Stücke, V/m) und 1,6 % (fein gepulvert, V/m).

Die bei der Fraktionierung per Kieselgelsäule gewonnenen Fraktionen lassen sich wie folgt beschreiben:

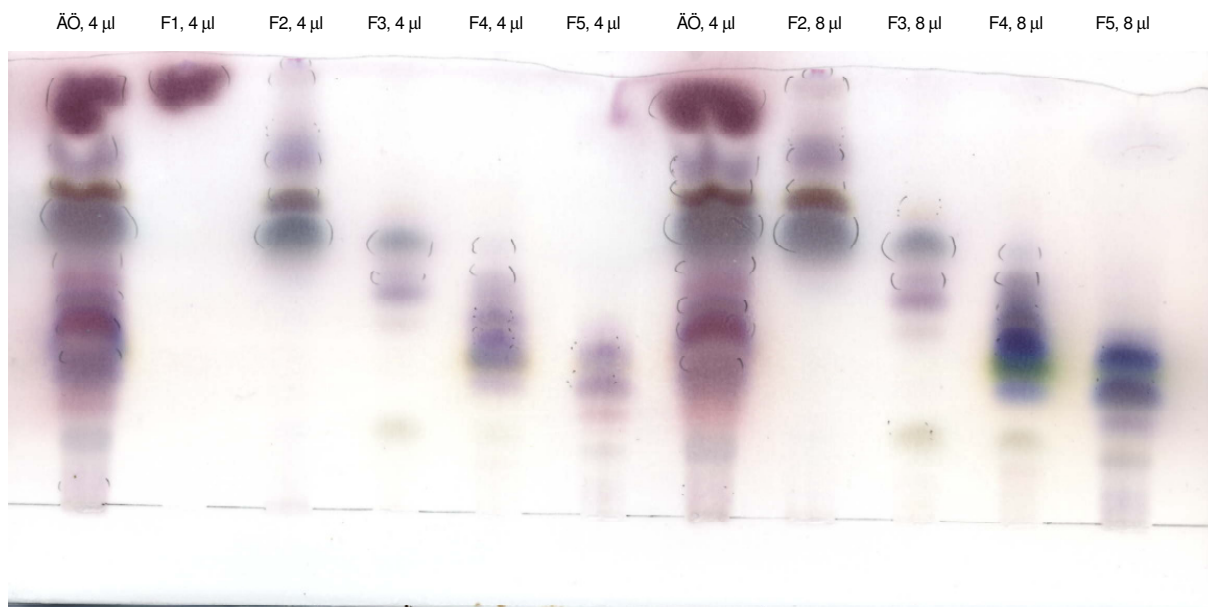
Fraktion	Ausbeute (%)	R <sub>f</sub>	Farbe	Geruch
1	50,5	0,93 – 0,98	farblos	aromatisch-stechend
2	12,4	0,59 - 0,96	leicht gelb	aromatisch
3	8,5	0,50 - 0,68	gelb	aromatisch
4	7,5	0,34 - 0,59	leicht gelb	aromatisch-süß
5	4,9	0,27 - 0,43	leicht gelb	aromatisch-süß
<b>SUMME</b>	<b>84,8</b>			

**Tabelle 5.1 Übersicht Fraktionen**

Die Tabelle zeigt die Ausbeute und die Eigenschaften, Farbe und Geruch der durch Fraktionierung an Kieselgel gewonnenen Fraktionen 1 bis 5

Die erste Fraktion besteht, auf Grund des sehr lipophilen Elutionsmittels n-Pentan, ausschließlich aus reinen Kohlenwasserstoffen, also zum Beispiel Mono- und Sesquiterpenen ohne funktionelle Gruppen. In der zweiten und dritten Fraktion sind vor allem wenig polare Verbindungen wie Ester, Aldehyde, Ether und Ketone der Terpene zu erwarten. Fraktion 4 und 5 zeigen ein Spektrum von Alkoholen, Säuren und anderen polaren Verbindungen<sup>82</sup>.

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung an Kieselgel zeigt deutlich, daß sich die Fraktionen in ihrem Inhaltsstoffspektrum unterscheiden. Überschneidungen zwischen den Fraktionen 2 bis 5 sind in den Randzonen der detektierten Bereiche erkennbar. Ein Teil der Zonen ist bei UV 254 nm sichtbar, durch die Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz können aber weitaus mehr Zonen sichtbar gemacht werden (s. Abb. 5.1). Bei UV 365 nm sind keine fluoreszierenden Zonen erkennbar.



**Abb. 5.1 DC der Fraktionen 1 bis 5 und des ätherischen Öls**

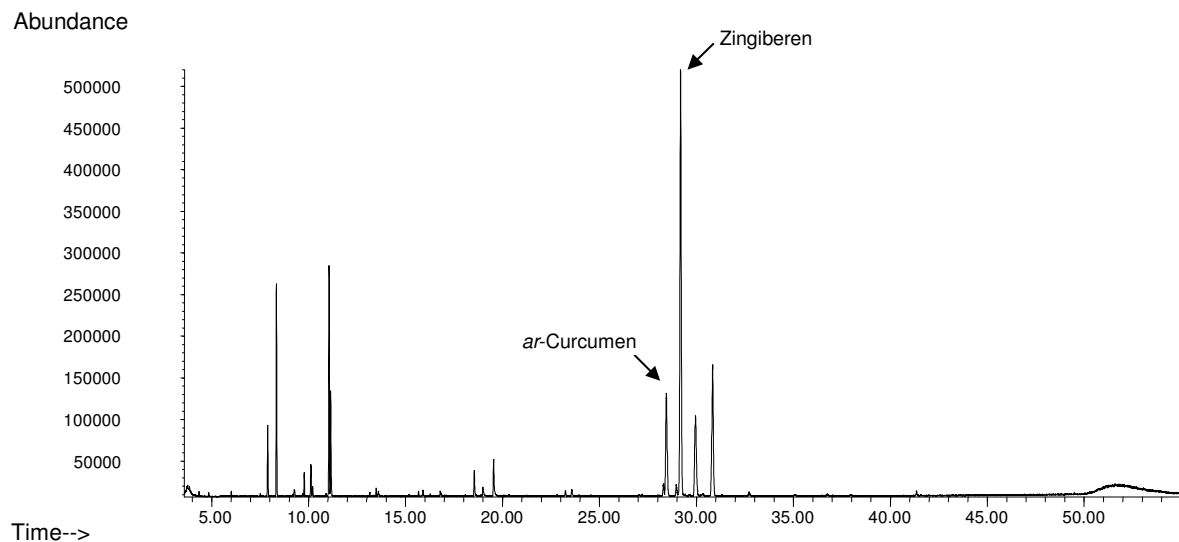
Photographie der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Fraktionen 1 bis 5 (F1-F5) sowie des ätherischen Öls (ÄÖ) als Vergleich. Alle Substanzen wurden in n-Hexan gelöst, Fließmittel: Toluol/Ethylacetat (9:1, V/V), Detektion unter UV 254 nm (in Klammern) und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (farbige Zonen)

## 5.1.2 Gaschromatographische Untersuchungen

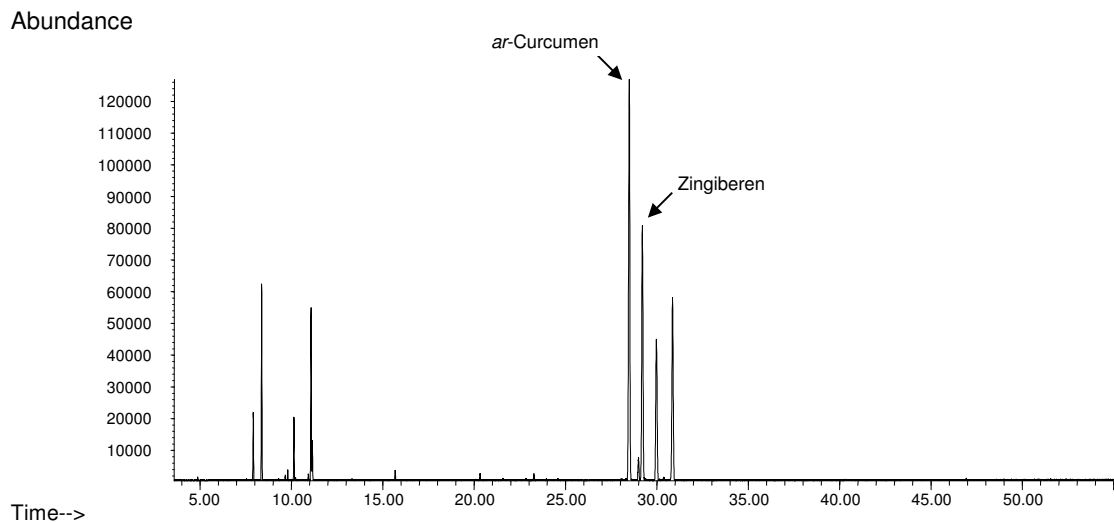
Das ätherische Öl, die gewonnenen Fraktionen 1 bis 5 und die Reinsubstanzen wurden mittels GC-MS untersucht. Da es nicht Zielsetzung dieser Arbeit war, eine geeignete analytische Methode darzustellen, sollen im Folgenden nur einige wichtige Chromatogramme gezeigt werden.

### 5.1.2.1 Ätherisches Öl

Da das ätherische Öl aus Ingwerrhizom aus zwei verschiedenen Anbaugebieten, Nigeria und Vietnam, untersucht wurde, ist es wichtig die Zusammensetzung zu vergleichen um die Einheitlichkeit der erhaltenen Ergebnisse zu gewährleisten.



**Abb. 5.2** Gaschromatogramm des ätherischen Öls von Ingwerrhizom (Herkunft: Nigeria)



**Abb. 5.3 Gaschromatogramm des ätherischen Öls von Ingwerrhizom (Herkunft: Vietnam)**

Der größte Unterschied ist in den Mengenverhältnissen der Sesquiterpene ( $R_t > 28$  min) zu erkennen. Der erste Peak entspricht *ar*-Curcumen ( $R_t = 28,5$  min) und ist bei dem Öl des vietnamesischen Ingwers deutlich größer als der Peak der nachfolgenden Komponente (Zingiberen,  $R_t = 29$  min). Beim nigerianischen Ingwer dominiert Zingiberen diese Inhaltsstoffgruppe (s. Pfeile in den Chromatogrammen Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Des Weiteren sind Unterschiede in der Zusammensetzung der Öle in dem Retentionsbereich 11 min bis 28 min sichtbar. Das nigerianische Öl weist hier mehr Komponenten auf als das vietnamesische. Ansonsten stimmt die Zusammensetzung überein. Eine Auflistung der Retentionszeiten, LRIs, identifizierten Substanzen und ihr Gehalt in den Ölen unterschiedlicher Herkunft findet sich in Tabelle 5.2 und Tabelle 5.3.

<b>R<sub>t</sub></b>	<b>LRI</b>	<b>Name</b>	<b>Gehalt [%]</b>	<b>Quelle</b>
7,9	931,6	α-Pinen	2,7	DB/Lit.
8,3	946,0	Camphen	8,5	DB/Lit.
9,2	972,1	Sabinen	0,1	Lit.
9,3	974,7	β-Pinen	0,3	DB/Lit.
9,7	987,9	unbekannt	0,1	
9,8	990,5	Myrcen	0,9	DB/Lit.
11,1	1027,7	β-Phellandren	9,9	DB/Lit.
11,1	1030,1	Eucalyptol	4,6	DB/Lit.
13,2	1087,6	Terpinolen	0,1	Lit.
13,5	1097,0	Perillen	0,3	Lit.
13,6	1100,2	unbekannt	0,3	
15,9	1165,1	Borneol	0,3	DB/Lit.
18,5	1241,7	unbekannt	1,3	
19,0	1255,0	trans-Sabinenhydrataacetat?	0,3	Lit.
19,6	1271,4	unbekannt	1,9	
23,3	1372,6	unbekannt	0,2	
23,6	1381,3	unbekannt	0,3	
28,3	1477,3	γ-Muurolen	0,7	Lit.
28,5	1480,1	ar-Curcumen	8,4	DB/Lit.
29,0	1489,9	β-Selinen?	0,7	Lit.
29,2	1494,1	α-Zingiberen	38,0	DB
29,9	1507,1	Bisabolen	7,6	DB
30,8	1520,6	β-Sesquiphellandren	11,9	DB
32,7	1549,5	unbekannt	0,3	
41,4	1690,3	unbekannt	0,2	

**Tabelle 5.2 Übersicht der Zusammensetzung des ätherischen Öls von Ingwer (Herkunft: Nigeria) mit LRIs**

R<sub>t</sub> = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>; DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank



$R_t$	LRI	Name	Gehalt [%]	Quelle
7,9	932,4	$\alpha$ -Pinen	2,3	DB/Lit.
8,4	946,8	Fenchon Camphen	7,3	Lit. DB
11,1	1028,3	$\beta$ -Phellandren	6,6	DB/Lit.
11,1	1030,4	Eucalyptol	1,2	DB/Lit.
28,5	1480,8	<i>ar</i> -Curcumen	32,6	DB/Lit.
29,0	1490,5	Valencen?	1,4	Lit.
29,2	1494,6	$\alpha$ -Zingiberen	20,7	DB/Lit.
30,0	1507,4	Bisabolen	12,3	DB/Lit.
30,1	1520,9	$\beta$ -Sesquiphellandren	15,6	DB/Lit.

**Tabelle 5.3 Übersicht der Zusammensetzung des ätherischen Öls von Ingwer (Herkunft: Vietnam) mit LRIs**

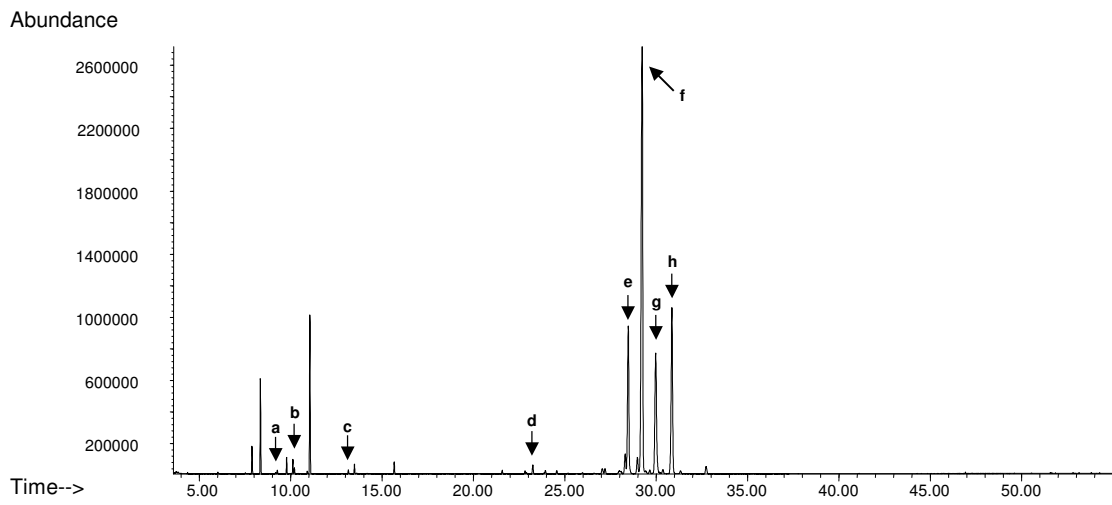
$R_t$  = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>; DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

### 5.1.2.2 Fraktionen

Alle fünf mit Hilfe der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen wurden gaschromatographisch untersucht. Wie schon bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung sieht man bei den gewonnenen Chromatogrammen einen Unterschied in der Zusammensetzung. Die Überlagerung (Abb. 5.5) verdeutlicht dies noch mal und zeigt auch, bei welchen Komponenten Überschneidungen der einzelnen Fraktionen vorliegen.

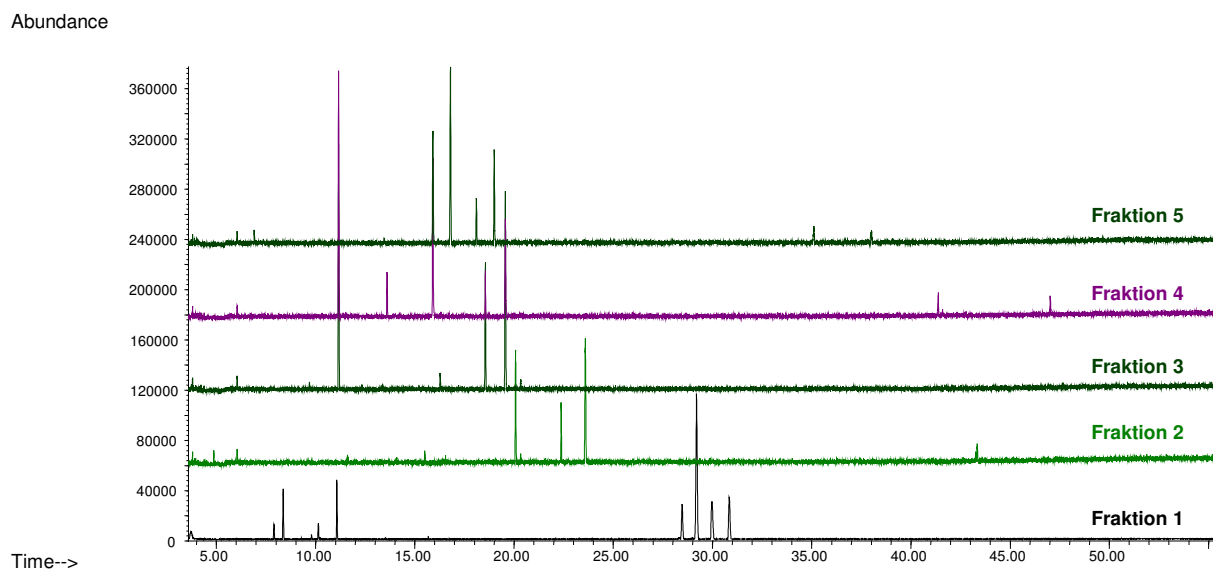
Bei Fraktion 1 (Abb. 5.4) sind die vier Komponenten  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Copaen,  $\beta$ -Pinen und Terpinolen gekennzeichnet, da diese Substanzen in der pharmakologischen Testung besonders hervortraten. Nur in Fraktion 1 finden sich die Sesquiterpene *ar*-Curcumen, Zingiberen, Bisabolen und Sesquiphellandren.

Bei den weiteren Fraktionen 2 bis 5 sind keine Inhaltsstoffe gekennzeichnet, da diese, bis auf Fraktion 4, keiner weiteren Untersuchung unterlagen. Die Menge an Testkomponenten und Reinstoffen machte eine Beschränkung auf Teile der Fraktionen und ihrer Inhaltsstoffe notwendig.



**Abb. 5.4 Gaschromatogramm Fraktion 1 (TIC-Modus)**

a =  $\beta$ -Pinen ( $R_t = 9,3$  min); b =  $\alpha$ -Phellandren ( $R_t = 10,2$  min); c = Terpinolen ( $R_t = 13,2$  min);  
 d =  $\alpha$ -Copaen ( $R_t = 23,3$  min); e = *ar*-Curcumen ( $R_t = 28,5$  min); f = Zingiberen ( $R_t = 29,2$  min);  
 g = Bisabolen ( $R_t = 30,0$  min); h = Sesquiphellandren ( $R_t = 30,9$  min)



**Abb. 5.5 Graphische Überlagerung der Gaschromatogramme von Fraktion 1 bis 5**

### 5.1.2.3 Bestimmung der linearen Retentionsindices

Die linearen Retentionsindices wurden für alle Fraktionen bestimmt. Die folgenden Tabellen (Tabelle 5.4 bis Tabelle 5.8) listen die berechneten Werte auf. Eine

R <sub>t</sub>	LRI	Name	Gehalt [%]	Quelle
7,9	931,6	α-Pinen	1,0	DB
8,3	945,9	Camphen	3,5	DB
9,3	974,6	β-Pinen	0,1	DB/Lit.
9,8	990,8	Myrcen	0,6	Lit.
10,1	1001,2	Siloxan		DB
10,2	1003,5	α-Phellandren	0,2	DB/Lit.
11,1	1027,7	β-Phellandren	6,7	DB/Lit.
13,2	1087,5	Terpinolen	0,2	DB/Lit.
13,5	1097,2	Perillene	0,4	Lit.
15,7	1159,0	Siloxan		DB
21,6	1327,9	Siloxan		DB
22,8	1361,1	Cyclosativen	0,1	Lit.
23,3	1372,6	α-Copaen	0,5	DB/Lit.
23,9	1390,7	β-Cubeben	0,2	DB/Lit.
24,6	1405,2	unbekannt	0,2	
27,1	1453,2	β-Farnesen	0,4	DB/Lit.
27,2	1456,1	allo-Aromadendren	0,3	DB/Lit.
28,3	1477,2	γ-Muurolen Germacren D	oder 1,2	DB/Lit. DB/Lit.
28,5	1480,5	ar-Curcurmen	11,9	DB/Lit.
29,0	1490,1	Valencen Viridifloren	oder 1,2	Lit.
29,2	1495,1	α-Zingiberen	41,6	Lit.
29,4	1499,1	α-Muurolen	0,1	DB/Lit.
29,6	1502,4	Germacren A	0,3	Lit.
30,0	1507,4	β-Bisabolen	12,6	DB/Lit.
30,4	1513,6	7-epi-α-Selinen	0,3	Lit.
30,9	1521,1	β-Sesquiphellandren	15,7	Lit.
31,3	1528,3	γ-Bisabolen	0,2	Lit.
32,7	1549,8	γ-Elementen	0,6	DB

**Tabelle 5.4 LRIs der Fraktion 1 und die entsprechenden Komponenten dieser Fraktion**

R<sub>t</sub> = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>;  
DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

Identifizierung erfolgte mit Hilfe der NIST-Datenbank und über einen Vergleich der bei Adams<sup>81</sup> nach aufsteigendem  $R_t$  aufgelisteten MS-Spektren der entsprechenden Substanzen. Auf die Angabe von Stereoisomeren wurde verzichtet, da eine Identifizierung in dieser Richtung nur unter Zuhilfenahme der Kern-Magnetischen Resonanz-Spektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance) oder anderen strukturaufklärenden Verfahren vorgenommen werden kann.

$R_t$	LRI	Name	Gehalt [%]	Quelle
6,0	867,1	unbekannt	3,1	
15,5	1154,2	Citronellal?	2,0	Lit.
20,1	1286,9	Isobornylacetat	31,1	DB/Lit.
20,3	1294,6	unbekannt	1,5	
22,4	1349,3	neo-iso-Carvomenthylacetat oder Citronellylacetat	17,6	Lit.
23,6	1381,8	Geranylacetat	44,7	Lit.

**Tabelle 5.5 LRIs der Fraktion 2 und die entsprechenden Komponenten dieser Fraktion**

$R_t$  = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>; DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

$R_t$	LRI	Name	Gehalt [%]	Quelle
6,0	866,8	unbekannt	1,5	
11,2	1030,6	Eucalyptol	39,4	DB/Lit.
16,3	1176,2	unbekannt	2,6	
18,6	1242,1	Neral	19,9	DB/Lit.
19,6	1271,6	Geranial	34,6	DB/Lit.
20,3	1294,4	unbekannt	2,0	

**Tabelle 5.6 LRIs der Fraktion 3 und die entsprechenden Komponenten dieser Fraktion**

$R_t$  = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>; DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

<b>R<sub>t</sub></b>	<b>LRI</b>	<b>Name</b>	<b>Gehalt [%]</b>	<b>Quelle</b>
4,4	800,2	Octan	0,7	DB/Lit.
4,7	812,6	unbekannt	2,2	
6,0	866,6	Xylen?	1,6	
7,5	919,8	unbekannt	1,1	
8,3	943,1	unbekannt	0,8	
13,6	1100,0	unbekannt	11,3	
14,4	1121,6	unbekannt	1,6	
15,3	1147,9	Camphenhydrat	1,2	Lit.
15,9	1165,2	Borneol	23,6	DB/Lit.
16,3	1177,4	unbekannt	0,8	
16,8	1190,8	$\alpha$ -Terpineol?	1,6	Lit.
17,4	1208,0	unbekannt	0,5	
18,1	1228,6	unbekannt	0,5	
18,9	1252,6	unbekannt	1,6	
19,0	1255,6	unbekannt	0,5	
29,1	1491,8	cis- $\beta$ -Guaien Valencen	oder 0,9	Lit.
30,3	1511,9	Butyliertes Hydroxytoluen	3,1	Lit.
32,7	1549,3	unbekannt	3,3	
36,8	1612,5	Epi-Cedrol?	18,1	Lit.
37,4	1623,3	unbekannt	2,5	
41,4	1690,3	Cedren-13-ol?	17,5	Lit.
41,6	1694,2	$\alpha$ -trans-Bergamotol	5,0	Lit.

**Tabelle 5.7** LRIs von Fraktion 4 und die entsprechenden Komponenten dieser Fraktion

R<sub>t</sub> = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>;  
DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

<b>R<sub>t</sub></b>	<b>LRI</b>	<b>Name</b>	<b>Gehalt [%]</b>	<b>Quelle</b>
6,0	867,1	unbekannt	1,5	
6,9	901,2	unbekannt	1,6	
15,9	1165,7	Borneol	22,9	DB/Lit.
16,8	1190,9	$\alpha$ -Terpineol	37,4	DB/Lit.
18,1	1228,8	Citronello?	8,0	Lit.
19,0	1255,2	Geraniol	20,1	DB/Lit.
35,1	1586,2	unbekannt	4	
38,0	1633,6	unbekannt	4,4	

**Tabelle 5.8 LRI's der Fraktion 5 und die entsprechenden Komponenten dieser Fraktion**

R<sub>t</sub> = Retentionszeit; LRI = Linearer Retentionsindex; Lit. = Identifizierung nach Adams<sup>81</sup>;  
DB = Identifizierung nach NIST-Datenbank

Einige Komponenten waren nicht identifizierbar. Dies war vor allem bei Fraktion 4 (Tabelle 5.7) der Fall. Auch eine Wiederholung der Gaschromatographie brachte kein besseres Ergebnis, so daß als Ursache eine mangelhafte Auftrennung in der Chromatographie auszuschließen ist.

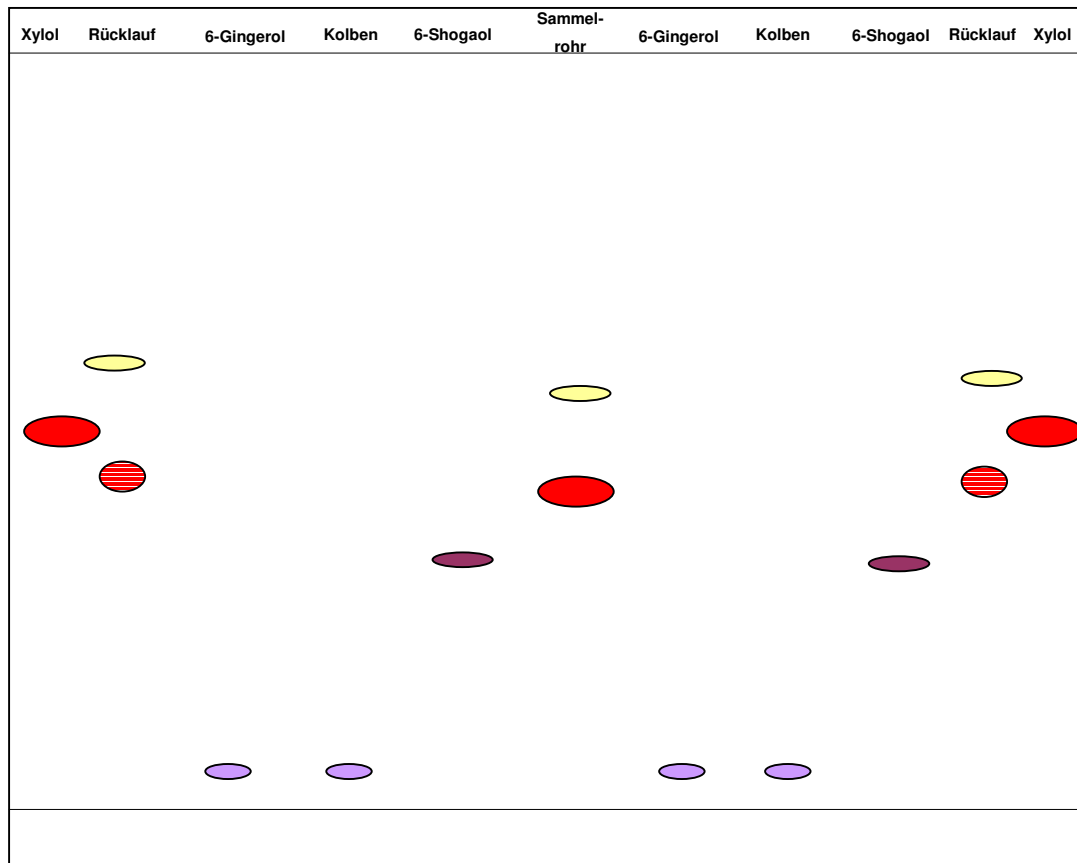
### 5.1.3 Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol

Es ist denkbar, daß in dem gewonnenen ätherischen Öl Bestandteile der Scharfstofffraktion enthalten sind. Um dies zu überprüfen, wurde eine analoge Wasserdampfdestillation mit [6]-Gingerol als Vertreter dieser Gruppe durchgeführt und anschließend mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht, ob sich diese Substanz im Sammel- oder Rücklaufrohr der Destillationsapparatur wiederfindet.

[6]-Gingerol läßt sich nur in dem Rundkolben wiederfinden, in dem es zur Destillation vorgelegt wurde. Das Abbauprodukt von [6]-Gingerol, [6]-Shogaol, findet sich in keiner der entnommenen Proben wieder. Das Chromatogramm des Inhlats des Rücklaufrohrs zeigte mehrere durch Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz rot und gelb gefärbte Zonen (Abb. 5.6). Nachdem eine Leerdestillation

nur mit Xylolvorlage durchgeführt wurde, konnten diese Zonen dem Xylol selbst und dessen Abbauprodukten zugeordnet werden.

Weder bei UV 365 nm, noch bei UV 254 nm, noch mit Detektionsreagenz traten Zonen auf, die [6]-Gingerol oder einem Abbauprodukt entsprachen.



**Abb. 5.6 DC der Testung auf Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol (Nachzeichnung)**

Schema der dünnschichtchromatographischen Auftrennung verschiedener Proben aus dem Bereich der Destillationsanlage. Als Vergleichssubstanzen wurden [6]-Gingerol und [6]-Shogaol aufgetragen. Fließmittel: Toluol/Ethylacetat (9:1, V/V), Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (farbige Zonen)

## 5.2 Pharmakologische Testungen

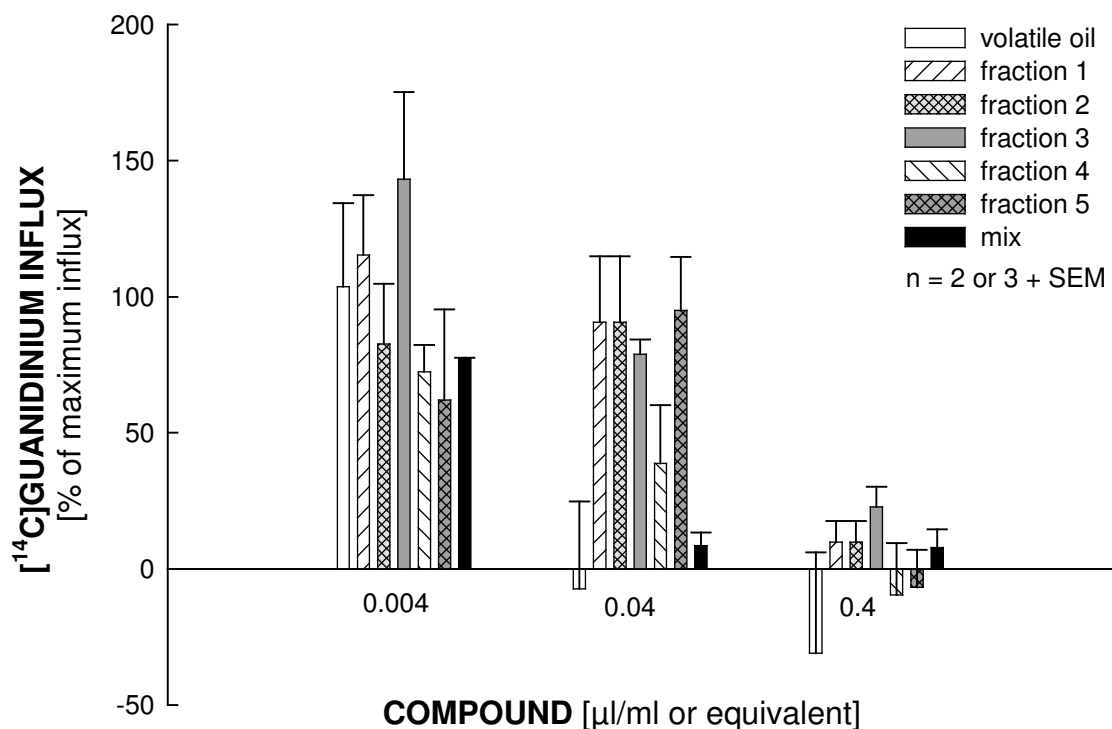
### 5.2.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messung

#### 5.2.1.1 Untersuchungen am Ätherischen Öl von Ingwer, den Fraktionen und verschiedenen Reinsubstanzen

Das ätherische Ingweröl, die gewonnenen Fraktionen und die Reinsubstanzen wurden in dem *in vitro* Testsystem hinsichtlich ihrer Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht. Mit Hilfe der N1E-Zellen kann der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in die Zellen gemessen werden. Dies erlaubt eine Aussage über eine Beeinflussung des rezeptorgekoppelten, ligandengesteuerten Ionenkanals. Serotonin als endogener Ligand würde zu einer Kanalöffnung führen und erzeugt daher hohe [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Werte im Inneren der Zellen. Ein Ansatz, bei dem der Ionenkanal nur einer Serotoninstimulation ohne Zusatz von Testsubstanzen ausgesetzt ist, dient als 100 %-Wert. Jede Substanz, die die Öffnung des Ionenkanals verhindert, sei es durch direkten Antagonismus zu Serotonin oder eine andersartige Modulation des Kanals, vermindert den Serotonin-stimulierten Kationen-Einstrom in die Zellen.

Die wirksamste Inhibierung des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influxes zeigt das ätherische Öl. Bereits eine Konzentration von 0,04 µl/ml vermag den Kationen-Einstrom komplett zu hemmen. Bei den Fraktionen zeigt Fraktion 4 den deutlichsten Effekt auf den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx. Schon eine Konzentration äquivalent zu 0,004 µl/ml ätherisches Öl vermag den Einstrom auf  $72,44 \pm 9,84$  % zu erniedrigen. Der Mix aus allen Fraktionen ist deutlich wirksamer als jede einzelne Fraktion, aber weniger wirksam als das gesamte ätherische Öl (vgl. Abb. 5.7).



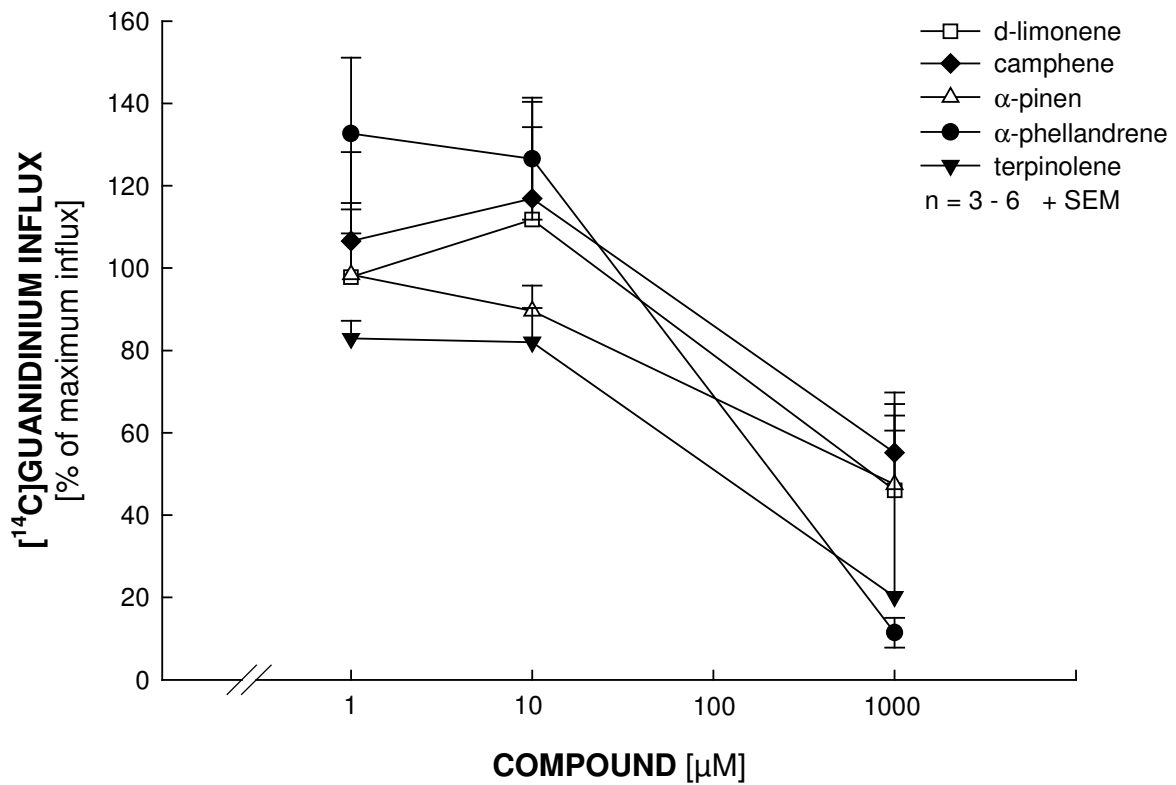


**Abb. 5.7** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch ätherisches Öl von Ingwer und seine Fraktionen

Gemessen wurde der [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Fraktionen wurden in einer Konzentration getestet, die ihrem Anteil im ätherischen Öl entspricht. Mix = alle Fraktionen wurden entsprechend ihrem Anteil im ätherischen Öl zusammengemischt und getestet.

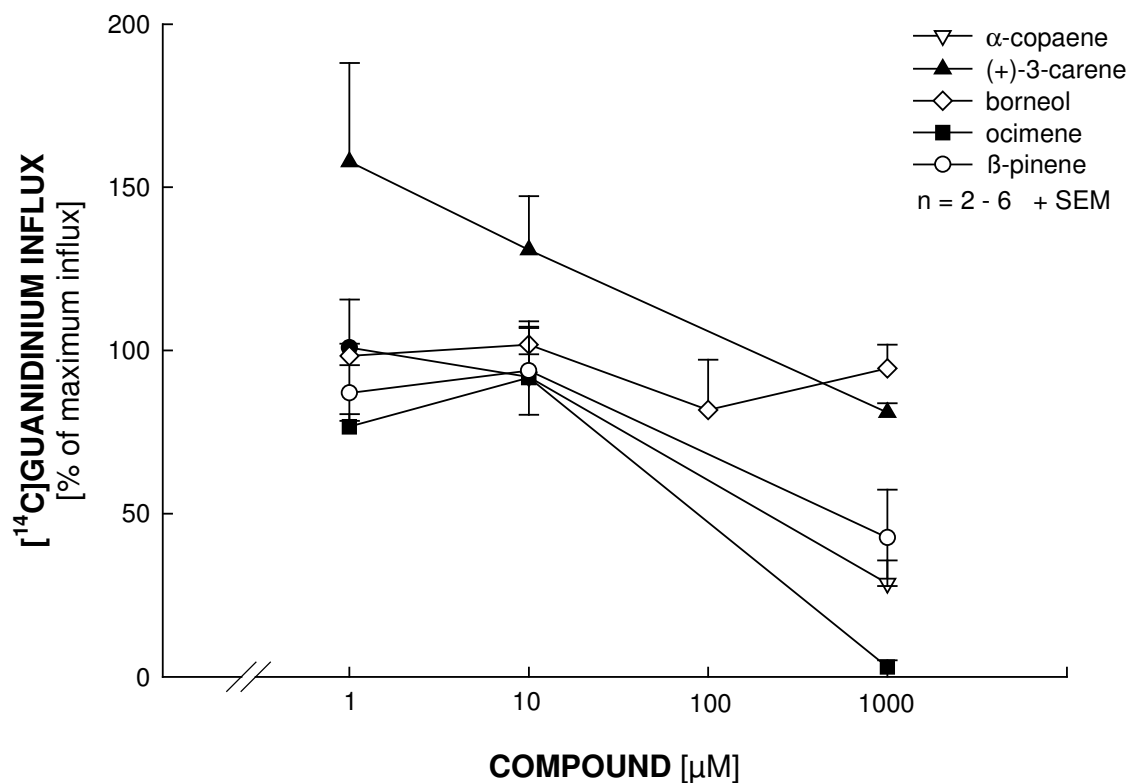
Betrachtet man den Einfluss der Reinsubstanzen auf den Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx, so zeigt sich, daß fast alle Komponenten die Wirkung von Serotonin an dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor konzentrationsabhängig antagonisieren können (siehe Abb. 5.8 und Abb. 5.9). Bis auf Borneol und (+)-3-Caren können alle Substanzen in hohen Konzentrationen (1 mM) den Kationen-Einstrom in die Zellen deutlich verhindern. (+)-3-Caren erhöht sogar den [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in niedrigen Konzentrationen (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) und zeigt damit keinen antagonistischen Effekt (Abb. 5.9). Bei den Substanzen  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Copaen,  $\beta$ -Pinen, Terpinolen und Ocimen ist der Einfluss auf den Serotoninrezeptor besonders

deutlich. Terpinolen kann schon in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  den Guanidinium-Influx auf  $83 \pm 4,5\%$  senken.



**Abb. 5.8** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch Komponenten des ätherischen Öls von Ingwer (Teil 1)

Gemessen wurde der [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

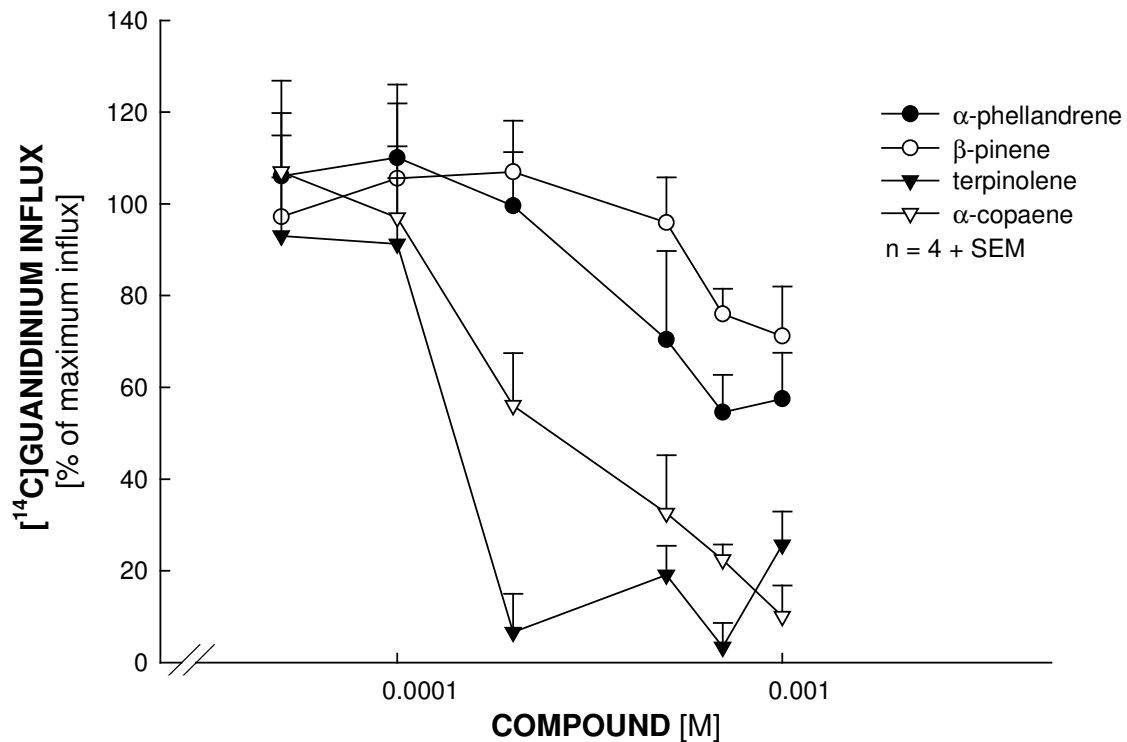


**Abb. 5.9** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch Komponenten des ätherischen Öls von Ingwer (Teil 2)

Gemessen wurde der [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit  $100\ \mu\text{M}$  Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei  $37\ ^\circ\text{C}$  inkubiert.

Diese Substanzen wurden daher in einer genaueren Konzentrations-Wirkungs-Untersuchung, die hauptsächlich den Bereich von  $100\ \mu\text{M}$  bis  $1\ \text{mM}$  abdeckte, getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.10 dargestellt. Ocimen wurde keiner weiteren Testung unterzogen, da eine Zuordnung als Inhaltsstoff des ätherischen Ingweröls per Gaschromatographie nicht sicher vorzunehmen war. Anhand der gewonnenen Daten läßt sich nun für diese vier Komponenten des ätherischen Öls eine Wirksamkeitsrangfolge darstellen:

Terpinolen >  $\alpha$ -Copaen >  $\alpha$ -Phellandren >  $\beta$ -Pinen.



**Abb. 5.10** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch  $\alpha$ -Phellandren,  $\beta$ -Pinen, Terpinolen und  $\alpha$ -Copaen

Gemessen wurde der [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Weder das ätherische Ingweröl, noch die Fraktionen, noch die Reinsubstanzen beeinflussen den Veratridin-induzierten [ $^{14}\text{C}$ ]Guanidinium-Influx in N1E-115 Zellen. Eine Beeinflussung des spannungabhängigen Ionenkanals konnte somit nicht nachgewiesen werden.

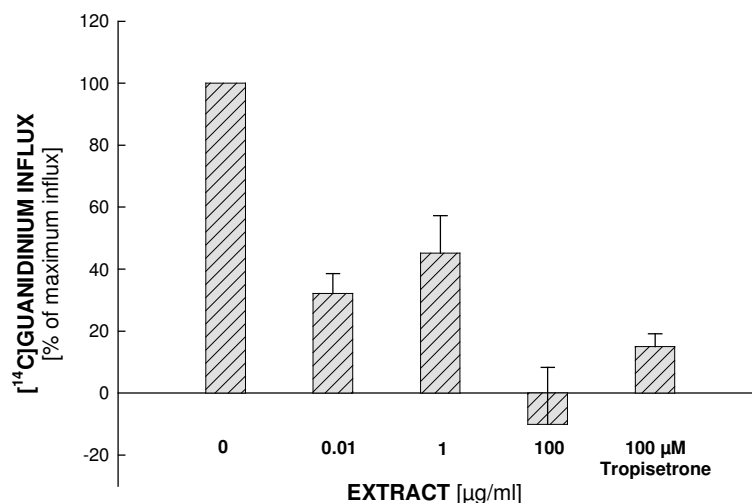
#### 5.2.1.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit eines ethanolischen Ingwer-Spissum-Extraktes

In Ergänzung zum Ingweröl wurden zusätzlich noch zwei Extrakte an N1E-115 Zellen einer *in vitro* Testung unterzogen. Es handelte sich hierbei um einen

Spissum-Extrakt (UB 2005-141), einen daraus hergestellten Siccum-Extrakt (UB 2005-193) sowie das Trägermaterial für den Trockenextrakt, PVP, welches ebenfalls getestet wurde.

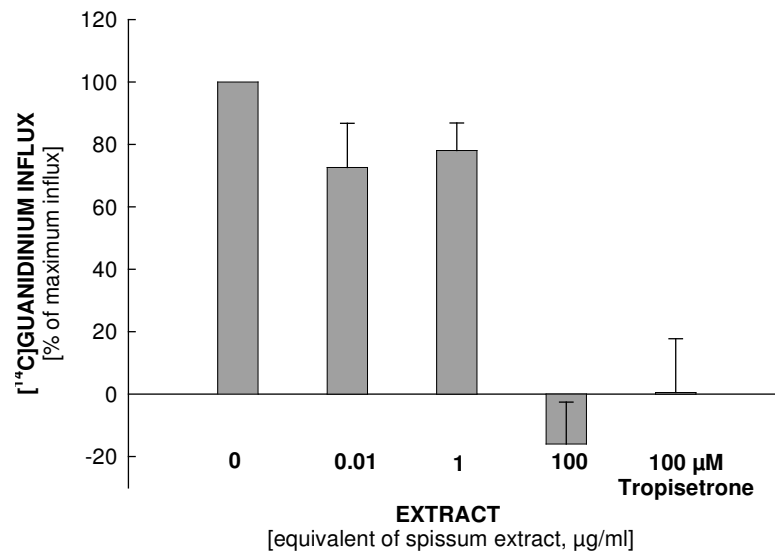
Für jede Testkomponente wurde der Wert, bei dem kein Zusatz an Substanz erfolgte, gleich 100 % gesetzt, so daß sich in der graphischen Darstellung für jede Komponente eine entsprechende Säule findet. Ebenfalls sind für alle drei Testkomponenten die Vergleichswerte mit 100 µM Tropicsetron dargestellt. Dies soll verdeutlichen, daß die Ergebnisse dieser Testung natürlichen Schwankungen unterliegen.

Sowohl der Spissum-Extrakt als auch der Siccum-Extrakt sind konzentrationsabhängig antagonistisch wirksam am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ( $p = 0,039$  bzw.  $p = 0,001$ ). PVP alleine zeigt erwartungsgemäß keine Wirkung an diesem Rezeptor. Wenn man den Siccum- mit dem Spissum-Extrakt vergleicht, so zeigt sich eine marginal schwächere Wirksamkeit des Siccum-Extraktes, die aber keine statistische Signifikanz zeigt (Abb. 5.11, Abb. 5.12 und Abb. 5.13).



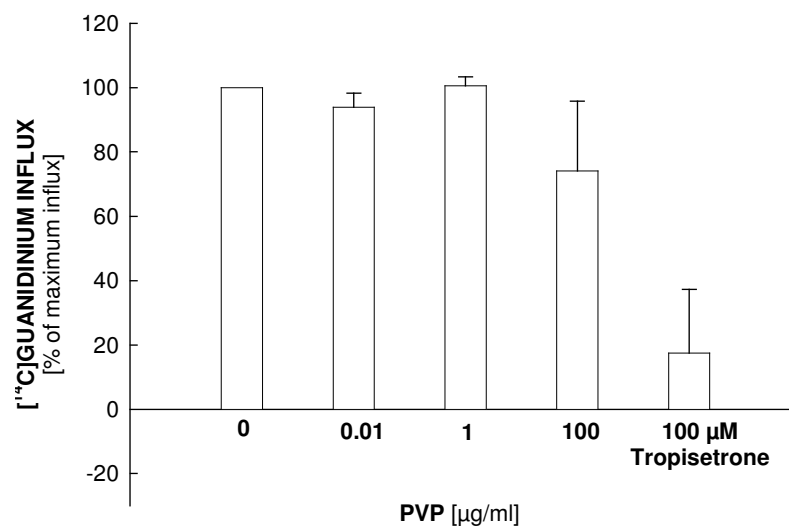
**Abb. 5.11 Beeinflussung des Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch einen ethanolschen Spissum-Extrakt von Ingwer**

Gemessen wurde der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100 µM Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37 °C inkubiert. Tropicsetron diente als Kontrollsubstanz bei allen drei Testungen.



**Abb. 5.12** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch einen ethanolschen Siccum-Extrakt von Ingwer

Gemessen wurde der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100 µM Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37 °C inkubiert. Die zu testende Menge Siccum-Extrakt wurde eingestellt auf den Anteil Spissum-Extrakt um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Tropisetron diente als Kontrollsubstanz bei allen drei Testungen.



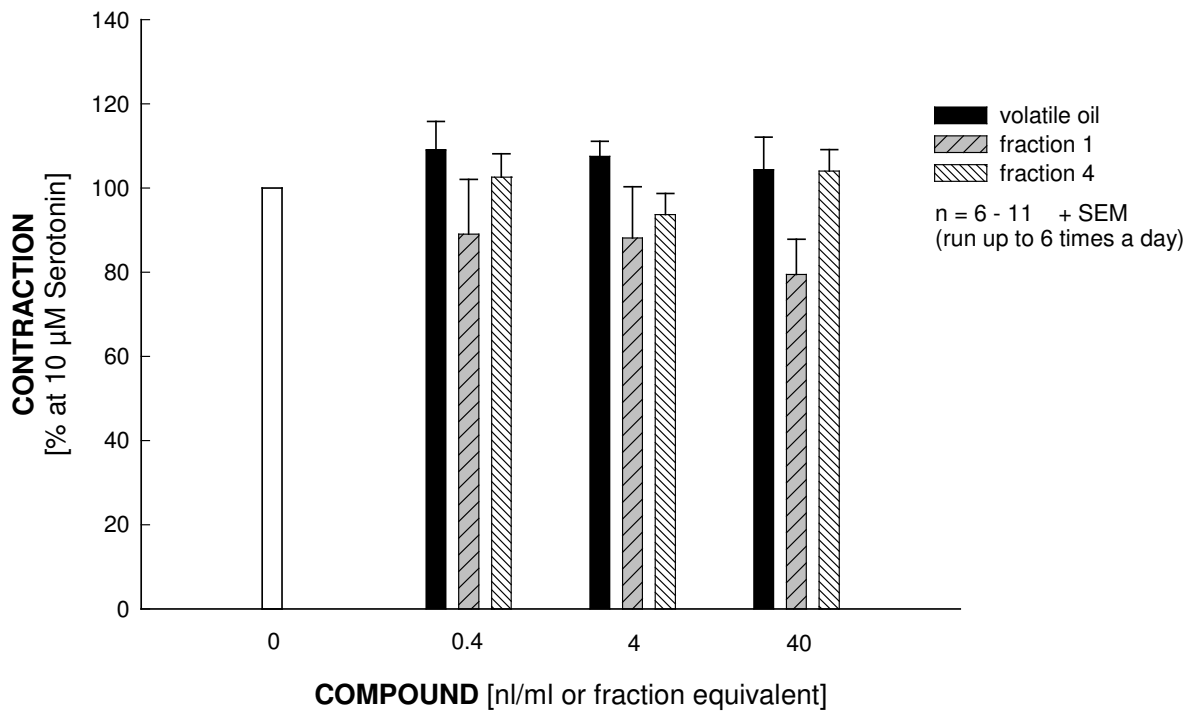
**Abb. 5.13** Beeinflussung des Serotonin-induzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch PVP

Gemessen wurde der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx in N1E-Zellen nach Stimulation mit 100 µM Serotonin. Die Zellen wurden vorher 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen bei 37 °C inkubiert. Tropisetron diente als Kontrollsubstanz bei allen drei Testungen.

### 5.2.2 Testung am isolierten Rattenileum

Nach der pharmakologischen Testung in dem *in vitro* Testsystem der N1E-Zelllinie sollte das ätherische Öl, die Fraktionen 1 und 4 sowie ausgewählte Reinsubstanzen in einem komplexeren *in vitro* Modell zur Absicherung zusätzlich untersucht werden. Das isolierte Rattenileum ist hierfür ein geeignetes System, da das ENS weitestgehend erhalten bleibt und nur die Afferenzen und Efferenzen zum ZNS verloren gehen. Untersucht wurde der Einfluß der verschiedenen Komponenten zum einen auf die initiale Kontraktion direkt nach Serotonin-Zugabe (= Peak-Kontraktion) und zusätzlich die Beeinflussung der Restkontraktion nach zweieinhalb Minuten.

Sowohl das ätherische Öl als auch die Fraktionen 1 und 4 können die initiale Kontraktion, die durch 10 µM Serotonin ausgelöst wird, nicht signifikant vermindern. Bei Fraktion 1 ist eine Tendenz in diese Richtung erkennbar (Abb. 5.14), denn die Maximalkontraktion ist über den gesamten Konzentrationsbereich gegenüber der Vergleichskontraktion signifikant kleiner ( $p = 0,033$ ). Eine konzentrationsabhängige Verminderung dieser Kontraktion läßt sich allerdings nicht signifikant nachweisen. Alle Werte wurden bis zu sechs Mal am Tag an mindestens drei Versuchstagen bestimmt.

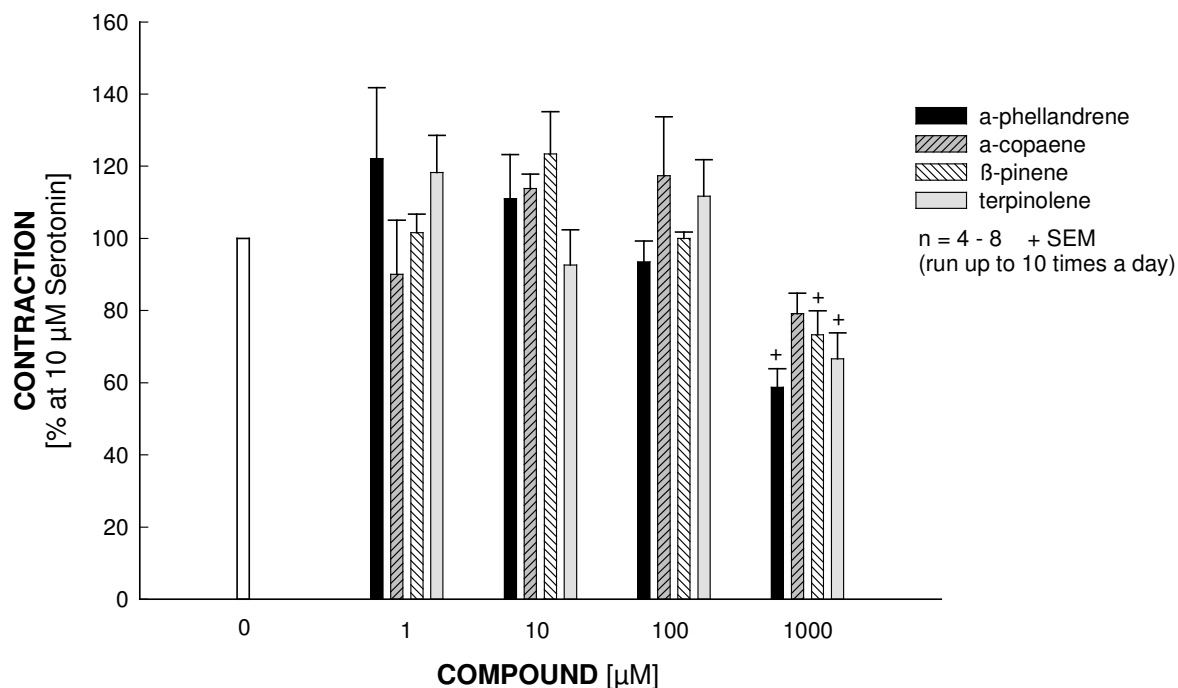


**Abb. 5.14** Beeinflussung der maximalen Serotonin-ausgelösten Kontraktion am isolierten Rattenileum durch das ätherische Öl von Ingwer, Fraktion 1 und Fraktion 4

Gemessen wurde die maximale Kontraktion nach Zugabe von 10 µM Serotonin am isolierten Rattenileum. Die Kontraktion ohne vorherige Zugabe einer Testsubstanz dient als Vergleichswert (100 %).

Betrachtet man die getesteten Substanzen  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Copaen,  $\beta$ -Pinen und Terpinolen (Abb. 5.15), so zeigt sich, daß bis auf  $\alpha$ -Copaen alle Substanzen in einer Konzentration von 1 mM die Peak-Kontraktion nach Serotonin-Zugabe signifikant vermindern können.

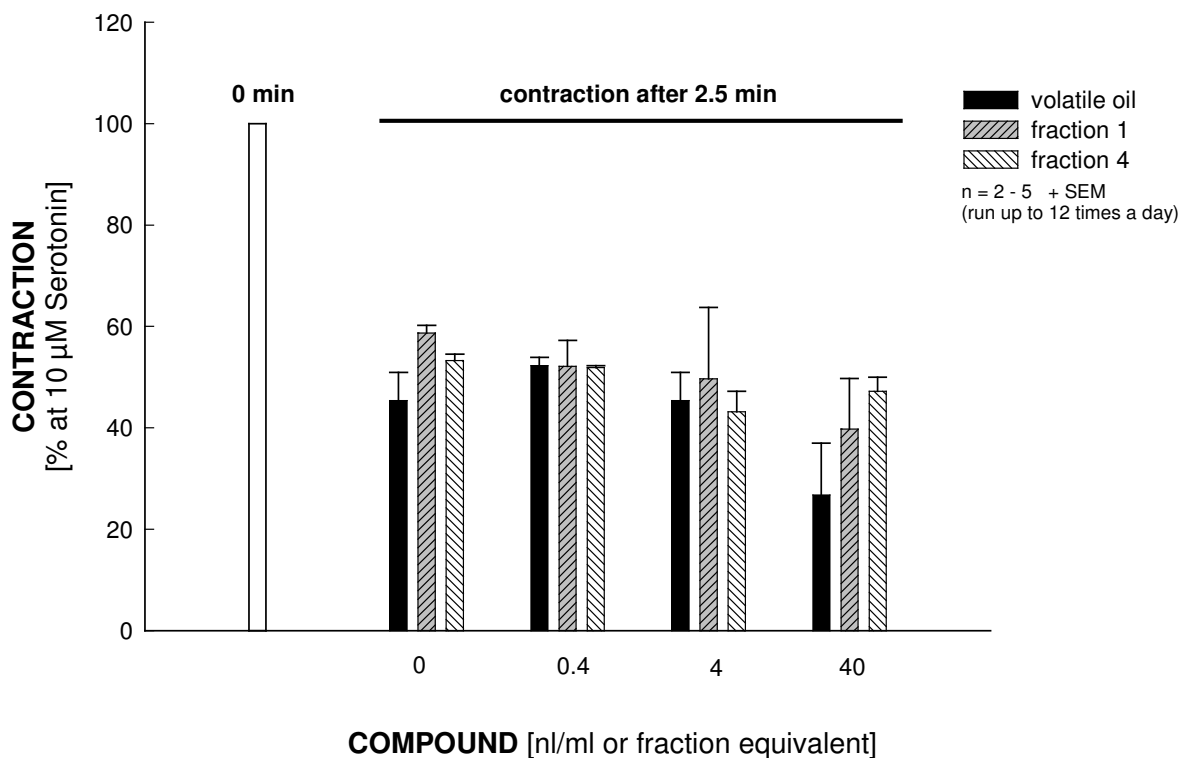




**Abb. 5.15** Beeinflussung der maximalen Serotonin-ausgelösten Kontraktion am isolierten Rattenileum durch Komponenten aus Fraktion 1

Gemessen wurde die maximale Kontraktion nach Zugabe von 10 µM Serotonin am isolierten Rattenileum. Die Kontraktion ohne vorherige Zugabe einer Testsubstanz dient als Vergleichswert (100 %). <sup>+</sup>p < 0,01

Da die durch Serotonin ausgelöste Maximalkontraktion über die Zeit nachläßt und nach einigen Minuten eine Restkontraktion von etwa 40 - 60 % der Maximalkontraktion verbleibt, sollte noch der Einfluß des ätherischen Öls, der Fraktionen und der Reinsubstanzen auf diese Restkontraktion untersucht werden als Maß für eine mögliche Relaxation. In der graphischen Darstellung ist der Wert der Maximalkontraktion (100 %) zum Zeitpunkt direkt nach der Serotoninzugabe gezeigt. Die gemusterten Säulen entsprechen der Restkontraktion zweieinhalb Minuten nach Serotoninzugabe. Serotonin wird in dieser Zeit nicht ausgewaschen. Signifikante Veränderungen der Restkontraktion wurden im Vergleich zum Zweieinhalb-Minuten-Wert ohne Testsubstanz bestimmt.



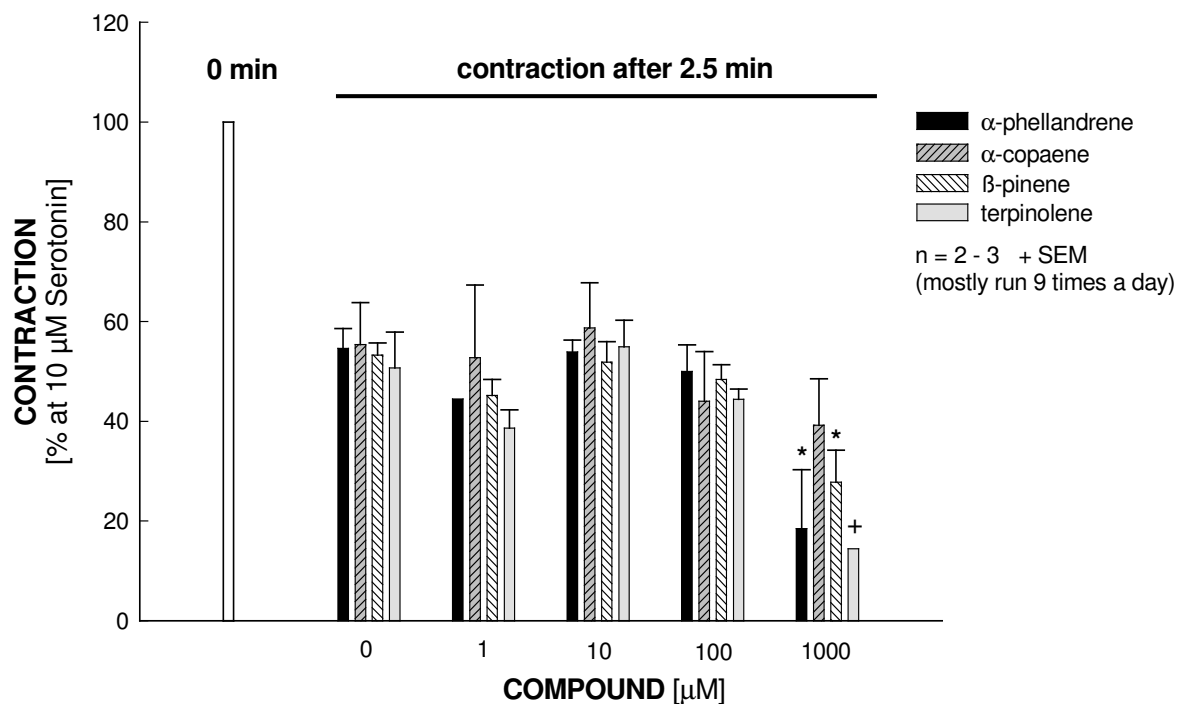
**Abb. 5.16** Beeinflussung der nach 2,5 Minuten noch vorhandenen Kontraktion am isolierten Rattenileum durch das ätherische Öl von Ingwer, Fraktion 1 und Fraktion 4

Gemessen wurde die Restkontraktion 2,5 min nach Zugabe von 10 µM Serotonin am isolierten Rattenileum. Die Kontraktion ohne vorherige Zugabe einer Testsubstanz zum Zeitpunkt 0 min dient als Vergleichswert (100 %).

Das ätherische Öl und die Fraktionen können die Restkontraktion nicht signifikant vermindern (Abb. 5.16).

Bei den Reinsubstanzen zeigt sich auch bei der Restkontraktion, daß die Komponenten nur in der höchsten Konzentration (1 mM) den Darm signifikant stärker relaxieren können als unter alleiniger Serotoningabe. Es ergibt sich folgende Rangfolge für die Wirksamkeit am Rattenileum:

Terpinolen > β-Pinen > α-Phellandren >> α-Copaen.



**Abb. 5.17** Beeinflussung der nach 2,5 Minuten noch vorhandenen Kontraktion am isolierten Rattenileum durch Komponenten aus Fraktion 1

Gemessen wurde die Restkontraktion 2,5 min nach Zugabe von 10 µM Serotonin am isolierten Rattenileum. Die Kontraktion ohne vorherige Zugabe einer Testsubstanz zum Zeitpunkt 0 min dient als Vergleichswert (100 %). \*p < 0,05; +p < 0,01

Neben den beobachteten Effekten nach Serotonin-Stimulation hatten einige Komponenten auch die Fähigkeit, das isolierte Rattenileum aus dem Basistonus heraus zu relaxieren. Dieser Effekt ist in Abb. 4.2 (s. Seite 52) dargestellt. Man erkennt deutlich, daß nach Zugabe des ätherischen Öls die Spannung am Darm nachläßt, was sich in der erwähnten Darstellung als Bewegung des Schreibers nach unten zeigt. Zu diesem Zeitpunkt ist noch kein Spasmogen zugegeben worden.

Der Effekt, der hier beispielhaft für das ätherische Öl gezeigt wird, konnte auch bei Fraktion 1 und 4 beobachtet werden, allerdings in geringerem Maße. Die Reinsubstanzen zeigen gegensätzliche Effekte, wenn man ihren alleinigen Einfluß auf die Darmkontraktion betrachtet. α-Phellandren und Terpinolen kontrahieren das Ileum in der höchsten Testkonzentration (1 mM), α-Copaen zeigte sowohl

relaxierende, als auch kontrahierende Eigenschaften. Hier konnte aber mit Vehikel gezeigt werden, daß die Kontraktion alleine durch das dem Organbad zugegebene Volumen von 100 µl ausgelöst wurde. β-Pinen hat initial einen kontrahierenden Effekt, vermag aber innerhalb von einer Minute das Ileum deutlich zu relaxieren.

Interessant ist auch, den Einfluß eines reinen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten und -antagonisten zu untersuchen. Im Rahmen eines Vorversuchs wurden 2-Methyl-5-Hydroxytryptamin (2-Me-5-HT) als Agonist und Ondansetron als Antagonist am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor am isolierten Rattenileum getestet. 2-Me-5-HT (10 µM) vermag das Organ alleine leicht zu relaxieren und beeinflusst die serotonin-induzierte Maximalkontraktion nicht. 100 µM Ondansetron relaxieren das isolierte Ileum und eine ohne Auswaschen des Antagonisten vorgenommene Maximalkontraktion des Ileums mit Serotonin fällt deutlich schwächer aus als die Kontrollkontraktion. Beide Testsubstanzen können die Restkontraktion nach zweieinhalb Minuten nicht beeinflussen.

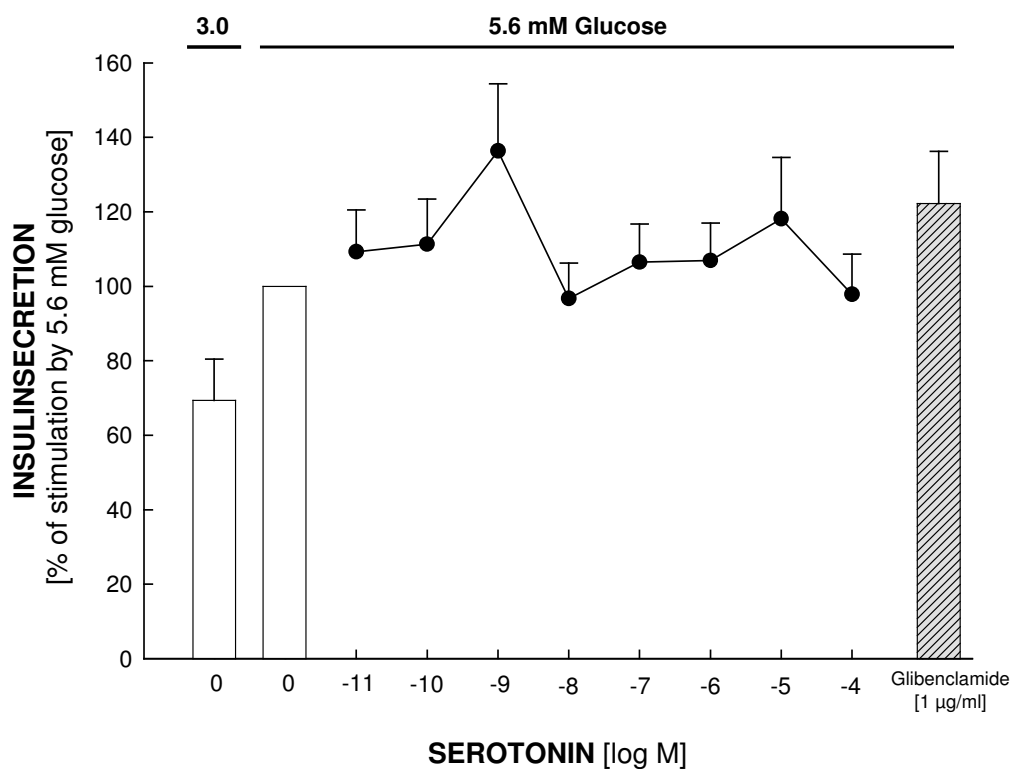
### 5.2.3 Insulinsekretion

Untersucht wurde der Einfluss von Serotonin und von einem Ingwer-Hexan-Extrakt auf die Insulinsekretion von murinen INS-1-Zellen. Laut Literaturangaben<sup>83</sup> soll Serotonin in einer Konzentration von 500 µM die glucoseabhängige Insulinsekretion vermindern. Ein serotonin-antagonistisch wirksamer Ingwerextrakt würde diese Insulinsekretionshemmung aufheben.

Getestet wurde Serotonin in einem Konzentrationsbereich von 10 fM bis 100 µM. Der Ingwer-Hexan-Extrakt wurde in einer Konzentration von 0,4 nl/ml bis 0,4 µl/ml untersucht. Diese Konzentrationen wurden bereits in anderen Zell- und Organversuchen eingesetzt<sup>13</sup>. Wie die Graphiken (Abb. 5.18 und Abb. 5.19) zeigen, wird über den gesamten Konzentrationsbereich die Insulinsekretion nicht beeinflusst. Serotonin vermag keine Sekretionshemmung zu bewirken. Der Hexan-Extrakt von Ingwer kann die Insulinsekretion nicht konzentrationsabhängig steigern. Bei einer Konzentration des Extraktes von 0,4 µl/ml ist eine deutliche

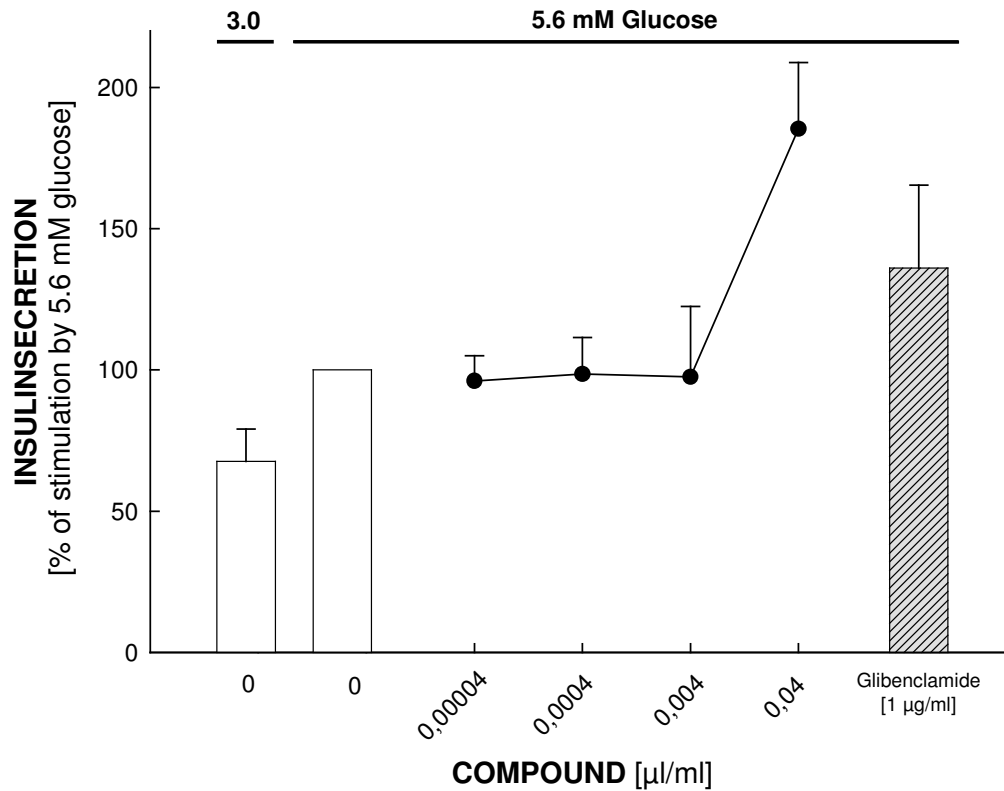
Sekretionssteigerung zu beobachten, eine Testung in höheren Konzentrationen war aber nicht möglich, da es zu einer Zellablösung von den Multiwellplatten kam. Es war daher nicht sinnvoll, diesen Effekt genauer auf eine Konzentrationsabhängigkeit hin zu untersuchen.

In beiden Ansätzen ist eine glucoseabhängige Stimulierbarkeit der Insulinsekretion gewährleistet, die sogar durch Glibenclamid (1  $\mu\text{g/ml}$ ) noch auf  $122 \pm 14 \%$  bzw.  $136 \pm 29 \%$  erhöht werden kann.



**Abb. 5.18** Effekt von Serotonin auf die glucosestimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen

Die INS-1 Zellen wurden über 90 Minuten mit steigenden Konzentrationen an Serotonin bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Insulinmenge erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays. Um die Stimulation der Insulinsekretion zu kontrollieren wurden die Zellen mit Glibenclamid (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Glucose 3,0 mM inkubiert.  $n = 2 - 9 + \text{SEM}$



**Abb. 5.19 Effekt eines Hexan-Extraktes von Ingwer auf die glucosestimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen**

Die INS-1 Zellen wurden über 90 Minuten mit steigenden Konzentrationen an Serotonin bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Insulinmenge erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays. Um die Stimulation der Insulinsekretion zu kontrollieren wurden die Zellen mit Glibenclamid (1 µg/ml) und Glucose 3,0 mM inkubiert. n = 5 – 8 + SEM

## 6 DISKUSSION

Das Ingwerrhizom ist eine vielseitige Arznei- und Gewürzdroge und wird schon seit Jahrtausenden als Heilpflanze bei verschiedenen Leiden angewendet. Als zugelassene Indikation findet man unter anderem gemäß Kommission E<sup>16</sup> die Anwendung bei Übelkeit und Erbrechen, speziell bei Chemotherapie oder Bestrahlung. Die ESCOP gibt in ihrer Ingwer-Monographie<sup>84</sup> die Anwendung zur Prophylaxe bei Reise-Übelkeit und –Erbrechen sowie einen therapeutischen Nutzen als postoperatives Antiemetikum bei kleinen chirurgischen Eingriffen an. Klinische Studien hierzu belegen die Wirksamkeit, leider gibt es noch nicht viele Untersuchungen, die sich mit dem Wirkungsmechanismus befassen. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Untersuchung des möglichen Wirkungsmechanismus von Ingwer, speziell des ätherischen Öls, bei Übelkeit und Erbrechen darstellen.

Das ätherische Öl ist besonders interessant, da es in fast allen Ingwerzubereitungen vorkommt. Als Bestandteil der meist lipophilen Extrakte kann es zu der antiemetischen Wirkung beitragen. Abdel-Aziz *et al.* (2004)<sup>13</sup> stellten bereits eine Wirksamkeit des Öls am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor der N1E-115-Zelllinie fest, so daß es Ziel dieser Arbeit war, die wirksamen Fraktionen und Bestandteile zu identifizieren.

## 6.1 Gewinnung, Auftrennung und Analytik des ätherischen Öls

### 6.1.1.1 Gewinnung und Fraktionierung

Die Gewinnung des ätherischen Öls per Wasserdampfdestillation ist eine gut beschriebene Methode<sup>10</sup> und wird auch zur Gewinnung der ätherischen Öle vieler anderer Pflanzen angewendet. Die erzielte Ausbeute entspricht den in der Literatur<sup>1,3,5,11</sup> beschriebenen Mengenbereichen für ätherisches Öl von Ingwer, ebenso sind die Färbung und der Geruch übereinstimmend beschrieben.

Eine höhere Ausbeute wäre zu erzielen gewesen, wenn man statt der Ganzdroge *Zingiberis rhizoma* einen Extrakt, zum Beispiel mit CO<sub>2</sub> oder Hexan als Auszugsmittel, als Ausgangsstoff der Destillation verwendet hätte. Da aber das Risiko einer Artefaktbildung durch eine Vorbehandlung der Droge vergrößert wird, in dieser Arbeit aber ein möglichst genuines Öl getestet werden sollte, wurde bewußt auf eine Vorextraktion des Drogenmaterials verzichtet. Ein vorhergehendes Extraktionsverfahren hätte auch nicht unbedingt eine Arbeitserleichterung oder Zeitersparnis bedeutet. Die Lagerung des ätherischen Öls über einen längeren Zeitraum ist problemlos, wie Germer *et al.* (1996)<sup>2</sup> zeigen konnten. Es ist ebenfalls unproblematisch, daß für die Gewinnung des Öls der getrocknete Wurzelstock *Zingiberis rhizoma* verwendet wurde. Gong *et al.* (2004)<sup>85</sup> konnten zeigen, daß sich die Zusammensetzung des ätherischen Öls von frischem und getrocknetem Ingwer nicht unterscheidet. Die schonende Trocknung und anschließende Lagerung hat keinen qualitativen Einfluß auf die Inhaltsstoffe des Öls. In dieser Arbeit wird darauf hingewiesen, daß eine Auftrennung aller Komponenten aus dem ätherischen Öl per GC-MS-Untersuchung praktisch unmöglich ist, da es sich um ein sehr komplexes analytisches Stoffgemisch handelt. Eine Aufteilung der Komponenten in Untergruppen zur Vereinfachung der Analytik ist daher unabdingbar.



Bei der weiteren Fraktionierung des gewonnenen Öls nach Kubeczka (1973)<sup>77</sup> mittels einer Kieselgelsäule ist es gelungen, die Bestandteile des ätherischen Öls nach ihren physikalischen Eigenschaften aufzutrennen und Untergruppen zuzuordnen. Das angewendete Verfahren stellt eine schnelle und einfache Methode dar, um ein komplexes Stoffgemisch in Fraktionen mit unterschiedlicher Polarität aufzuteilen. Eine Auftrennung der Komponenten mit Hilfe der präparativen HPLC oder GC war in diesem Fall quantitativ nicht ausreichen, da für die nachfolgenden pharmakologischen Untersuchungen eine größere Menge der Fraktionen (mindestens 10 mg) benötigt wurden.

Wie gut die Fraktionen sich voneinander unterscheiden, zeigen der dünnschicht- und gaschromatographische Vergleich mit dem Öl. Besonders wirksame Fraktionen (in diesem Fall Fraktion 1 und 4) wurden weitergehend analysiert, um eine eventuelle Isolierung und Identifizierung von Einzelkomponenten zu erreichen. Dies entspricht dem Vorgehen einer „*bio-guided fractionation*“, also einer Auftrennung der Komponenten unter Berücksichtigung ihrer biologischen und pharmakologischen Wirksamkeit. Man vermeidet damit unnötige Isolierungsschritte und kann durch erneutes Vermischen der getrennten Komponenten additive und potenzierende Effekte schneller erkennen, aber auch hemmende oder durch Verarbeitung verloren gegangene Bestandteile aufzeigen.

Zum Ende dieser Arbeit wurde neues Drogenmaterial aus Vietnam als Ausgangsstoff für die Destillation von ätherischem Öl verwendet. Der Großteil der Testungen fand aber mit nigerianischem Ingwer als Ausgangsdroge statt. Beide Öle weisen qualitativ kaum Unterschiede auf. Die Untersuchungen, die mit dem Öl des vietnamesischen Ingwers vorgenommen wurden, sollten die gewonnenen Ergebnisse nur ergänzen und haben keinen gegensätzlichen Einfluß auf die Resultate ausgeübt. Dies war aber auf Grund der Übereinstimmung der qualitativen Zusammensetzung zu erwarten. Dennoch soll darauf hingewiesen werden, daß eine Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf das ätherische Öl von Ingwer im Allgemeinen nicht möglich ist. Die Zusammensetzung hängt stark von der Herkunft des Ingwers ab<sup>11</sup> und muß im Einzelfall genau bestimmt werden. Auch wird aus der quantitativen Bestimmung der Inhaltsstoffe (Tabelle 5.2 und

Tabelle 5.3) klar, daß die einzelnen Komponenten durchaus in unterschiedlichen Mengen, je nach Anbaugbiet des Ingwers, vorkommen können.

#### 6.1.1.2 Identifizierung der Komponenten und Zusammensetzung der Analyten

Die Identifizierung der Komponenten des Gesamtöls wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, da es in der Literatur erschöpfende Übersichten<sup>11,12,85</sup> zum Inhaltsstoffspektrum des ätherischen Öls von Ingwer gibt. Dies verhält sich anders bei den Fraktionen. Da in dieser Arbeit zum ersten Mal die Methode der Fraktionierung des ätherischen Öls angewendet wurde, mußten die Komponenten der fünf Fraktionen identifiziert werden. Hier wurde besonders viel Wert auf die Identifizierung der Komponenten von Fraktion 1 und 4 gelegt, da Fraktion 1 mit fast 50 % den größten Anteil im ätherischen Öl hat und Fraktion 4 in der parallel verlaufenden pharmakologischen Testung in der Zellkultur (5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren an N1E-115 Zellen) die größte Wirksamkeit aufwies. Dennoch gelang es, auch den Fraktionen 2, 3 und 5 Inhaltsstoffe zuzuordnen. Interessanterweise bestehen diese, in der Testung an N1E-115 Zellen eher unwirksamen Fraktionen, nur aus wenigen Komponenten, wohingegen Fraktion 1 und 4 über 20 Inhaltsstoffe aufweisen.

Neben dem Vergleich der Retentionszeiten von bekannten und vorhandenen Reinsubstanzen mit den erhaltenen Peaks im Gaschromatogramm waren die massenspektrometrischen Daten essentiell. Durch den Vergleich mit einer Datenbank, mit der Literatur<sup>81</sup> sowie manuellem Vergleich mit Daten von selber aufgenommenen Massenspektren, ließen sich fast alle Substanzen in Fraktion 1 identifizieren. Bei Fraktion 4 war eine eindeutige Identifizierung der meisten Komponenten nicht möglich. Es handelt sich vermutlich auf Grund des polaren Charakters der Verbindungen um Stoffe, die üblicherweise nicht gaschromatographisch untersucht werden und daher in den Datenbanken nicht zu finden sind. Mit der hier verwendeten Methode ist eine genaue Strukturaufklärung und Identifizierung von Stereoisomeren der Substanzen ebenfalls nicht möglich. Dies muß zusätzlichen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Handhabung von flüchtigen Stoffen birgt immer die Gefahr, daß Anteile verdampfen. Die Berechnung der Ausbeute der verschiedenen Fraktionen zeigt aber, daß nur etwa 13 % des ätherischen Öls fehlen. Dies ist eine akzeptable Menge und resultiert vermutlich aus unspezifischer Adsorption der Bestandteile an das verwendete Kieselgel.

Die Fraktionierung des Öls mit Hilfe einer Kieselgelsäule erlaubt es demnach, dieses komplexe Stoffgemisch ohne große Verluste aufzutrennen. Die Zusammenmischung der einzelnen Fraktionen entsprechend ihrem Anteil am ätherischen Öl und anschließende Testung im [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Assay zeigte, daß durch die Fraktionierung kaum wirksame Bestandteile verloren gegangen sind. Die Mischung ist besser wirksam als jede einzelne Fraktion, aber etwas weniger wirksam als das Gesamtöl. Eine Fraktionierung in der Form, wie sie hier gewählt wurde, stellt also ein geeignetes Verfahren zur schonenden Auftrennung der Bestandteile des ätherischen Ingweröls dar.

Es ist nicht davon auszugehen, daß in dem ätherischen Öl Gingerole oder Shogaole zu finden sind, deren antiserotoninerges Effekt bereits gezeigt werden konnte<sup>13-15,39</sup>. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß diese Inhaltsstoffe des Ingwers, wie zu erwarten, nicht wasserdampfdestillierbar sind und die pharmakologischen Ergebnisse nicht beeinflusst haben.

## 6.2 Pharmakologische Testungen

### 6.2.1 Ätherisches Öl, Fraktionen und Reinsubstanzen

#### 6.2.1.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messung

Wie die Untersuchungen des [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influxes an N1E-115 Zellen verdeutlichen, kann das ätherische Öl von Ingwer die Serotonin-Wirkung am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor antagonisieren. Die Einzeleffekte der fünf Fraktionen tragen zu

dem Gesamteffekt des Öls bei, da alle den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Einstrom konzentrationsabhängig vermindern können. Dieser Effekt ist bei Fraktion 4 am stärksten ausgeprägt, so daß in den folgenden pharmakologischen Testungen diese Fraktion weiter untersucht wurde. Da Fraktion 1 den größten Anteil am ätherischen Öl hat, wurde auch hier die Untersuchung vertieft.

Bei den untersuchten Reinsubstanzen zeigen sich Unterschiede in den Wirkqualitäten. Die Terpene stammen, wie eingangs erwähnt (s. Kapitel 1.1.4.1), aus dem gleichen Biogeneseweg. Sie zeigen allerdings keinen gruppenspezifischen Effekt auf die Durchlässigkeit des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-gekoppelten Ionenkanals. Man könnte vermuten, daß die Komponenten als lipophile Substanzen sogar einen unspezifischen Effekt durch Einlagerung in die Zellmembran zeigen würden. Durch Testung am spannungsabhängigen Ionenkanal der N1E-115 Zellen (Veratridin-Versuche), welcher durch die bei der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messung aktiven Substanzen nicht beeinflusst wurde, konnte ein solcher unspezifischer Wirkmechanismus jedoch ausgeschlossen werden. Ebenfalls können toxische Effekte der Testkomponenten somit ausgeschlossen werden.

Interessant ist, daß die vier wirksamsten Komponenten  $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Phellandren, Terpinolen und  $\alpha$ -Coopen nur in geringen Mengen in Fraktion 1 vorkommen. Eine Substanz wie Camphen zum Beispiel (Fraktion 1,  $R_t = 8,3$  min), die einen größeren Mengenanteil hat, war deutlich weniger wirksam am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Komplex. Auch dies unterstützt die These, daß keine Substanz alleine für den antiserotoninergen Effekt der Fraktionen und des Öls verantwortlich ist.

Die hier untersuchten Konzentrationen der Reinsubstanzen entsprachen nicht der Menge, die man etwa in 20 nl Fraktion 1 finden würde. Eine genaue Aussage über die Mengenanteile kann nicht gemacht werden, da keine quantitative Bestimmung des ätherischen Öls oder der Fraktionen vorgenommen wurde. Bei der Testung der Komponenten war es das Ziel, einen Vergleich der Wirksamkeit durchführen zu können und die pharmakologische Aktivität auf eine Konzentrationsabhängigkeit hin zu untersuchen. Daraus läßt sich schließen, daß die Wirksamkeit

der Fraktion 1 eine Summe der Wirkqualitäten aller ihrer Einzelbestandteile ist. Kein Inhaltsstoff alleine kann in der Menge, die man in der Fraktion annehmen kann, für den Effekt verantwortlich gemacht werden.

Diese Aussage gilt auch für Fraktion 4. Borneol war als einziger Reinstoff aus dieser Fraktion einer Testung zugänglich, zeigte allerdings keinen herausragenden Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-System. Da die Identifizierung der Komponenten in Fraktion 4 nicht im ausreichenden Maße vorgenommen werden konnte, ließen sich keine weiteren Stoffe aus diesem Teil des ätherischen Öls untersuchen. Es bleibt also unklar, woher die gute Wirksamkeit dieser Fraktion im Vergleich zu den anderen Fraktionen bei der Testung an den N1E-115 Zellen herrührt. Weitergehende Untersuchungen dieser Fraktion mit eventueller Aufreinigung und Strukturaufklärung der Bestandteile müssen unternommen werden.

Der Einstrom von [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Ionen in N1E-115 Zellen kann zum Teil mit hohen Konzentrationen der Testkomponenten auf einen Wert unterhalb von Null Prozent gebracht werden. Man kann von einer Beeinflussung des Blankwertes des Assays sprechen. Der Blankwert wird als [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx ohne Serotoninstimulation bestimmt. Wodurch dieser Wert entsteht, ist unklar. Es könnten 5-HT<sub>3</sub>-gekoppelte Ionenkanäle beteiligt sein, die durch Modulation anderer endogener Liganden geöffnet sind oder per Influx durch andere, eventuell spannungsabhängige, Ionenkanäle.

#### 6.2.1.2 Testung am isolierten Rattenileum

Der zweite Teil der pharmakologischen Untersuchungen bediente sich eines weitaus schwierigeren Testsystems, nämlich dem isolierten Ileum der Ratte. Dies System ist komplex, da eine Vielzahl von Rezeptoren vorliegen. Ziel war es hierbei, die im Zellversuch erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zu bestätigen.

Am Rattenileum wurde eine Kontraktion durch 10  $\mu$ M Serotonin ausgelöst. Es zeigte sich, daß diese Kontraktion in zwei Phasen einteilbar ist. Sie beginnt mit einer starken, sofort auftretenden Maximalkontraktion, die aber, nachdem sie den Maximalwert erreicht hat, schnell wieder nachläßt, bis eine Restkontraktion von etwa 40 – 60 % der Maximalkontraktion verbleibt. Aus dieser Restkontraktion findet nur noch eine langsame Fortsetzung der Abnahme der Kontraktion statt. Es bleibt unklar, welcher Mechanismus zu der starken Kontraktion direkt nach Serotoninzugabe führt. Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor scheint daran nicht beteiligt zu sein, da ein reiner Agonist an diesem Rezeptor keine schnelle Aufstrichphase der Kontraktion des Rattenileums auslösen kann, ein 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist kann eine serotonin-ausgelöste Maximalkontraktion nur wenig vermindern. Es ist durchaus möglich, daß dieser Rezeptortyp in geringerem Maße an der Maximalkontraktion beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des ätherischen Öls, der Fraktionen 1 und 4 und einiger Reinsubstanzen auf die Maximalkontraktion und die anschließend verbleibende Restkontraktion untersucht. Das Ausmaß der verbliebenen Restkontraktion wurde zum festgelegten Zeitpunkt zweieinhalb Minuten nach Serotoninzugabe bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da er der Inkubationszeit der N1E-115-Zellen mit Serotonin während der [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messung entspricht. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den beiden *in vitro* Testungen sollte damit erleichtert werden.

Das ätherische Öl und die beiden Fraktionen 1 und 4 können weder die Maximalkontraktion noch die Restkontraktion beeinflussen. Bei den Reinsubstanzen ist ein Effekt nur in der sehr hohen Konzentration 1 mM zu beobachten.  $\alpha$ -Coopen verbleibt dabei ohne signifikant relaxierende Wirksamkeit am Rattenileum. Die Rangfolge der drei anderen Reinsubstanzen ( $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Phellandren und Terpinolen) ist unterschiedlich, je nachdem, ob man die maximale Serotoninkontraktion betrachtet oder den Einfluß auf die anschließende Restkontraktion.

Keine der getesteten Komponenten zeigt einen herausragenden Effekt am Rattenileum. Dieses Testsystem ist vermutlich zu komplex, da neben dem serotoninergen System auch alle weiteren Bestandteile des ENS erhalten sind und somit eine Interaktion der Komponenten neben den verschiedenen Serotoninrezeptoren auch mit den Rezeptoren weiterer Neurotransmitter wie Acetylcholin, Substanz P, VIP oder Histamin nicht auszuschließen ist. Eine direkte Wirkung auf die glatte Darmmuskulatur ist ebenfalls denkbar. Diese möglichen Interaktionen des ätherischen Öls von Ingwer und seiner Komponenten mit anderen Neurotransmittern müssen in weiteren Untersuchungen näher beschrieben werden.

Bemerkenswert ist die relaxierende Wirkung des ätherischen Öls, wenn es alleine auf das Ileum gegeben wird. Da im Zusammenhang mit Übelkeit und Erbrechen eine Verkrampfung der Darmmuskulatur beobachtet wird, zeigt sich hier eine antispasmodische Komponente in den Wirkqualitäten des Öls, die sogar schon den Grundtonus des Organpräparates herabsetzen kann. Dieser Effekt, der beim Gesamtöl, den Fraktionen 1 und 4 und  $\beta$ -Pinen auftritt, ist auch bei dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron in einer Konzentration von 100  $\mu$ M zu beobachten. Eine Wirksamkeit dieser Komponenten an diesem Serotoninrezeptorsubtyp ist damit annehmbar und unterstützt die Ergebnisse aus den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messungen. Ob es sich jedoch um einen echten Antagonismus oder nur eine Modulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-gekoppelten Ionenkanals handelt, können nur Bindungsstudien zeigen.

Der Eigeneffekt der Substanzen kann die Aussagen verfälschen, die sich aus der alleinigen Betrachtung des Effektes auf die maximale Serotoninkontraktion und die anschließende Restkontraktion ergeben. Die Testkomponenten, die einen relaxierenden Eigeneffekt zeigen (ätherisches Öl, Fraktion 1 und 4,  $\beta$ -Pinen), können die Serotonin-Maximalkontraktion nicht mehr stark beeinflussen, obwohl sie den Grundtonus in der zweiminütigen Vorinkubation, bevor Serotonin zugegeben wird, bereits deutlich herabgesetzt haben (vgl. Abb. 4.2). Die beiden Testsubstanzen  $\alpha$ -Phellandren und Terpinolen zeigen einen leicht

kontrahierenden Eigeneffekt und können die initiale, Serotonin-ausgelöste Kontraktion vermindern. Dies stellt keinen Widerspruch dar, wenn man davon ausgeht, daß die Wirkungsmechanismen nicht gleicher Natur sind: Der relaxierende Eigeneffekt wird nicht durch das gleiche System ausgelöst wie der kontrahierende, so daß zum einen keine Überschneidung mit dem Signalweg auftritt, der die Maximalkontraktion unmittelbar nach Serotoninzugabe zum Organbad auslöst, in dem anderen Fall jedoch schon.

### 6.2.1.3 Biologische Relevanz der eingesetzten Konzentrationen

Die Testmengen des ätherischen Öls und der Fraktionen entsprechen Mengen, die auch physiologisch erreicht werden können. Geht man von einem 70 kg schweren Menschen aus, dessen Verteilungsvolumen vereinfacht 70 l entspricht, und von einer 100 %igen Resorption des lipophilen Öls im Darm dieser Person, so ist bei einer Einnahme von 2 g Ingwer (Empfehlung der Kommission E) mit einem Gehalt des ätherischen Öls von 0,9 % (eigene Bestimmung) bis 2,5 % (Angabe des Lieferanten) eine Konzentration des Öls von 0,13 bis 0,36 nl pro ml Körpervolumen zu erwarten. Dies liegt in dem Bereich der eingesetzten Testmengen (niedrigste Testkonzentration: 0,4 nl/ml). Diese Konzentrationen sind zum Beispiel relevant für die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Medulla oblongata. Lokale Effekte im Darm durch größere Mengen des ätherischen Öls, als durch Verteilung im Körper zu erwarten sind, sind ebenfalls sehr wahrscheinlich. Die höheren Testkonzentrationen in den hier dargestellten Assays sollen diese Situation widerspiegeln

Daß die Wirksamkeit der Reinsubstanzen nur in einer hohen Konzentration deutlich wird, bestätigt die Aussage, daß keine Einzelsubstanz durch eine besonders gute Wirksamkeit in den Testsystemen hervorsticht, aber alle eine Wirksamkeit zeigen. Es ist also davon auszugehen, daß jede Komponente zu der Wirksamkeit des ätherischen Öls oder einer Fraktion beiträgt. Man kann nicht von einem reinen Wirkungsmechanismus über den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor sprechen, da die Versuche an dem isolierten Rattenileum gezeigt haben, daß das ätherische Ingweröl und seine Komponenten verschiedene Wirkungen an diesem Organ



haben können. Eine genaue Beschreibung des Wirkungsmechanismus bedarf weiterer Untersuchungen und sollte andere Neurotransmitter des ENS mit einbeziehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ätherisches Ingweröl einen Beitrag zu der antiemetischen Wirksamkeit des Ingwers leistet. Es sollte darauf geachtet werden, daß für eine arzneiliche Anwendung, speziell bei der Behandlung und Prävention von Übelkeit und Erbrechen, nur Ausgangsdroge verwendet wird, die einen möglichst hohen Gehalt an ätherischem Öl aufweist.

## **6.2.2 Zusätzliche Untersuchungen einiger Extrakte**

### 6.2.2.1 [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx-Messung

Von der Firma Finzelberg, Andernach, wurden ein ethanolischer Spissum-Extrakt (UB 2005-141) und ein daraus mit Hilfe von PVP hergestellter Siccum-Extrakt (UB 2005-193) auf eine Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor untersucht.

Beide Extrakte zeigen eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit an diesem rezeptorgekoppelten Ionenkanal. Dies spricht für eine echte pharmakologische Wirkung an diesem System. Da der Siccum-Extrakt den [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx an den N1E-115 Zellen nur marginal schwächer hemmen kann als der Spissum-Extrakt, läßt sich sagen, daß der Herstellungsprozess des Siccum-Extraktes nicht zu einem Wirksamkeitsverlust am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor führt. Der Trägerstoff PVP zeigt keinen rezeptorantagonistischen Effekt, so daß die gemessenen Werte reinen Eigeneffekten der Extrakte zuzuschreiben sind.

Die Verarbeitung des Spissum-Extraktes mit PVP bietet zwei Vorteile: Zum einen wird der zähflüssige Extrakt in eine Pulverform überführt und damit rieselfähig gemacht. Er läßt sich so besser verarbeiten. Zum anderen wird praktisch eine Wasserlöslichkeit erreicht, die bei oraler Anwendung der Zubereitung eine bessere

Verteilung im GIT verspricht. Der ethanolische Spissum-Extrakt ist auf Grund seiner Lipophilie sehr schwer in Wasser suspendierbar.

Diese Untersuchungen verdeutlichen die Relevanz dieser Arbeit bezüglich des ätherischen Öls. In dem ethanolischen Extrakt sind Bestandteile des Oleoresins und damit des ätherischen Öls von Ingwer zu erwarten. Die wirksamen Komponenten des Öls tragen zu einer Wirksamkeit des Extraktes am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor bei und sollten in entsprechenden Zubereitungen enthalten sein.

#### 6.2.2.2 Insulinsekretion

Ingwer wird eine blutzuckersenkende Wirkung zugeschrieben. Mascolo *et al.* (1989)<sup>17</sup> untersuchten an Kaninchen den Einfluß eines ethanolischen Ingwerextraktes auf die Blutglucosewerte und konnten zeigen, daß der Extrakt einen hypoglykämischen Effekt hat. Akhani *et al.* (2004)<sup>86</sup> nahmen eine ähnliche Untersuchung an Ratten mit dem frischen Saft von Ingwerknollen vor. Zusätzlich wurde noch der Einfluß einer Serotonin-Gabe (1 mg/kg KG, i.p.) auf die Blutzuckerwerte und die Insulinspiegel im Blut untersucht. Serotonin wirkte hyperglykämisch und insulinsekretionshemmend, wohingegen der Ingwersaft diese Effekte aufzuheben vermochte, allerdings keine Eigeneffekte zeigte. Bei beiden Untersuchungen handelt es sich um Untersuchungen an Tiermodellen, eine Beeinflussung der Blutzuckerwerte oder der Insulinsekretion bei Menschen wurde bisher nicht beschrieben.

Mit Hilfe der Zellkultur lassen sich die Einflüsse von Serotonin und Ingwerextrakten auf die Insulinsekretion ebenfalls gut untersuchen. Zawalich *et al.* (2001)<sup>83</sup> konnten an beta-Zellen, die mit 500 µM Serotonin vorinkubiert wurden, eine Insulinsekretionshemmung feststellen. Diese Serotonin-Konzentration ist sehr hoch gewählt, daher sollte in dieser Arbeit der beschriebene Effekt an insulinsekretierenden INS-1 Zellen mit Konzentrationen von 10 fM bis 100 µM Serotonin untersucht werden. Die gewählten Konzentrationen decken einen breiten Bereich ab und sind eher als physiologisch anzusehen als die von Zawalich *et al.* gewählten 500 µM Serotonin.

Serotonin zeigt in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen. Es ist möglich, daß der beschriebene Effekt nur in der hohen Konzentration von 500 µM auftritt. Dann ist eine biologische Relevanz allerdings fraglich, denn so hohe Serumserotoninspiegel treten unter anderem nur bei dem Serotonin-Syndrom auf, welches als gefährliche Komplikation bei der Interaktion von Arzneistoffen auftritt, die den Serotonin-Haushalt oder die Wirkungsdauer dieses Neurotransmitters beeinflussen. 500 µM Serotonin als Serum-Konzentration sind also als pathologisch anzusehen und würden zu deutlich mehr unerwünschten Wirkungen speziell am Herz-Kreislaufsystem führen. Allerdings ist es schwierig vorherzusagen oder zu bestimmen, welche Serotoninkonzentration lokal an einem Organ vorliegt. Dies muß nicht immer mit den Serumspiegeln übereinstimmen.

Es ist ebenfalls denkbar, daß die hier verwendete Zelllinie durch Serotonin nicht in ihrer Insulinsekretion beeinflussbar ist. Dann wären INS-1 Zellen als Testmodell nicht geeignet.

Der parallel gestestete Hexan-Extrakt von Ingwer zeigt keinen Eigeneffekt auf die Insulinsekretion der INS-1 Zellen. Dies entspricht den Beobachtungen von Akhani *et al.* (2004)<sup>86</sup>. Der Anstieg der Insulinsekretion bei einer Extraktkonzentration von 0,04 µl/ml (s. Abb. 5.19) könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Zellen diese Extraktmenge nicht mehr gut vertragen. Es könnte zu einer Ablösung einiger Zellen gekommen sein, die mit bloßem Auge noch nicht zu erkennen war. Abgelöste Zellen würden die Insulinmenge in dem anschließenden RIA stark erhöhen, da intrazelluläre Insulinspeicher komplett bei der Lyse der Zellen freigesetzt werden.

Da Serotonin an den INS-1 Zellen nicht die beschriebene Insulinsekretionshemmung zeigte, war eine Testung in Kombination mit dem Ingwer-Hexan-Extrakt als nicht sinnvoll anzusehen. Es konnte leider kein Beitrag zu der Wirkung von Ingwer auf die Insulinsekretion hinzugefügt werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Das ätherische Öl von Ingwer (*Zingiber officinale* ROSCOE) ist bisher pharmakologisch nur sehr wenig untersucht worden. Speziell ein möglicher Beitrag zu der antiemetischen Wirksamkeit von Ingwer fand bisher noch keinen Eingang in die Literatur. In der vorliegenden Arbeit sollten pharmakologische Untersuchungen des ätherischen Ingweröls in verschiedenen Testsystemen eine potentielle Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor und dem serotoninergen System des Darmnervensystems aufzeigen.

Die Gewinnung des Öls erfolgte mit Hilfe der Wasserdampfdestillation. Die Komplexität dieses Stoffgemisches machte eine Fraktionierung der Komponenten notwendig. Mit Hilfe einer Kieselgelsäulenchromatographie wurde eine schonende und schnelle Methode gefunden, die Inhaltsstoffe des ätherischen Öls nach ihrer Polarität aufzutrennen. Mit Hilfe der GC-MS gelang es, Reinsubstanzen aus den Fraktionen 1 und 4 zu identifizieren.

Das Gesamtöl, Fraktionen und die Reinsubstanzen wurden in einem Zellkultur-basierten Assay auf eine antagonistische Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Ionenkanalsystem untersucht. Besonders stark war die hemmende Wirkung auf den serotonininduzierten [<sup>14</sup>C]Guanidinium-Influx an N1E-115 Zellen bei dem ätherischen Öl, Fraktion 4 und den Reinsubstanzen β-Pinen, α-Phellandren, Terpinolen und α-Copaen. Der Influx wird über den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor gekoppelten Ionenkanal vermittelt.

Bei der Testung am isolierten Rattenileum konnten das ätherische Öl und die Fraktionen 1 und 4 weder die serotoninausgelöste Maximalkontraktion noch die Restkontraktion nach zweieinhalb Minuten signifikant beeinflussen. Demgegenüber konnten die Einzelsubstanzen β-Pinen, α-Phellandren und Terpinolen konnten sowohl die Maximalkontraktion als auch die Restkontraktion

signifikant vermindern. Das ätherische Öl, die Fraktionen 1 und 4 und  $\beta$ -Pinen zeigten einen relaxierenden Eigeneffekt am Rattenileum,  $\alpha$ -Phellandren und Terpinolen wirkten kontrahierend.

Aus den gewonnenen Ergebnissen läßt sich schließen, daß Ingweröl und seine Komponenten eine Wirksamkeit am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor zeigen und Serotonin dort konzentrationsabhängig antagonisieren können. Keine der getesteten Substanzen erreicht die Wirksamkeit eines chemischen Antagonisten, alle tragen aber zu dem antagonistischen Effekt des Gesamtöls bei. Das Rattenileum erweist sich als sehr komplexes Testsystem und erlaubt keine eindeutigen Aussagen bezüglich des Wirkungsmechanismus des ätherischen Öls oder seiner Komponenten am serotoninergen System des Darms.

Daß das ätherische Öl zu der antiemetischen Wirksamkeit von Ingwer beiträgt ist auf Grund der hier gezeigten Ergebnisse anzunehmen. Es ist daher wichtig, bei Extrakten und Zubereitungen auf den Erhalt der Öl-Fraktion zu achten. Als Ausgangsdroge für die arzneiliche Verwendung von Ingwer können oder sollten Arten mit hohem Gehalt an ätherischem Öl verwendet werden.

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1.1</b> Abbildung aus Köhler's Medizinal-Pflanzen	2
<b>Abb. 1.2</b> Ingwerwurzelstock ( <i>Zingiberis officinalis rhizoma</i> )	5
<b>Abb. 1.3</b> Mikroskopischer Querschnitt des Ingwerwurzelstocks	5
<b>Abb. 1.4</b> Strukturformeln von wichtigen Mono- und Sesquiterpenen aus dem ätherischen Öl von Ingwer	7
<b>Abb. 1.5</b> Schema zur Biogenese von Mono- und Sesquiterpenen	9
<b>Abb. 1.6</b> Hypothese zur Biogenese von cyclischen Terpenen am Beispiel ( <i>R+S</i> )-Limonen	10
<b>Abb. 1.7</b> Allgemeine Strukturformel der Gingerole	11
<b>Abb. 1.8</b> Strukturformel von Zingeron	11
<b>Abb. 1.9</b> Allgemeine Strukturformel der Shogaole	12
<b>Abb. 1.10</b> Biosynthese und Metabolismus von Serotonin	27
<b>Abb. 1.11</b> Übersicht der Serotonin-Rezeptoren, ihrer <i>second messenger</i> und der Subtypen	28
<b>Abb. 1.12</b> Schematische Darstellung eines Teils des serotoninergen Systems des ENS. Nach Cash et al. (2005)	31
<b>Abb. 4.1</b> Wasserdampfdestillationsanlage	43
<b>Abb. 4.2</b> Originalversuchsaufzeichnung der Testung am isolierten Rattenileum	52
<b>Abb. 5.1</b> DC der Fraktionen 1 bis 5 und des ätherischen Öls	57
<b>Abb. 5.2</b> Gaschromatogramm des ätherischen Öls von Ingwerrhizom (Herkunft: Nigeria)	58
<b>Abb. 5.3</b> Gaschromatogramm des ätherischen Öls von Ingwerrhizom (Herkunft: Vietnam)	59
<b>Abb. 5.4</b> Gaschromatogramm Fraktion 1 (TIC-Modus)	62
<b>Abb. 5.5</b> Graphische Überlagerung der Gaschromatogramme von Fraktion 1 bis 5	62
<b>Abb. 5.6</b> DC der Testung auf Wasserdampflichkeit von [6]-Gingerol (Nachzeichnung)	67
<b>Abb. 5.7</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch ätherisches Öl von Ingwer und seine Fraktionen	69
<b>Abb. 5.8</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch Komponenten des ätherischen Öls von Ingwer (Teil 1)	70
<b>Abb. 5.9</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch Komponenten des ätherischen Öls von Ingwer (Teil 2)	71
<b>Abb. 5.10</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch $\alpha$ -Phellandren, $\beta$ -Pinen, Terpinolen und $\alpha$ -Copaen	72
<b>Abb. 5.11</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch einen ethanolischen Spissum-Extrakt von Ingwer	73
<b>Abb. 5.12</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch einen ethanolischen Siccum-Extrakt von Ingwer	74
<b>Abb. 5.13</b> Beeinflussung des Serotonin-induzierten [ <sup>14</sup> C]Guanidinium-Einstroms in N1E-Zellen durch PVP	74

---

<b>Abb. 5.14</b> Beeinflussung der maximalen Serotonin-ausgelösten Kontraktion am isolierten Rattenileum durch das ätherische Öl von Ingwer, Fraktion 1 und Fraktion 4	76
<b>Abb. 5.15</b> Beeinflussung der maximalen Serotonin-ausgelösten Kontraktion am isolierten Rattenileum durch Komponenten aus Fraktion 1	77
<b>Abb. 5.16</b> Beeinflussung der nach 2,5 Minuten noch vorhandenen Kontraktion am isolierten Rattenileum durch das ätherische Öl von Ingwer, Fraktion 1 und Fraktion 4	78
<b>Abb. 5.17</b> Beeinflussung der nach 2,5 Minuten noch vorhandenen Kontraktion am isolierten Rattenileum durch Komponenten aus Fraktion 1	79
<b>Abb. 5.18</b> Effekt von Serotonin auf die glucosestimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen	81
<b>Abb. 5.19</b> Effekt eines Hexan-Extraktes von Ingwer auf die glucosestimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen	82

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Germer S, Franz G. Ginger: manifold medicinal crude drug. Uses and thin layer chromatographic (TLC) assay according to the German Pharmacopoeia 1997. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1997;137:40-46.
2. Germer S. Untersuchungen zu Qualitätskriterien und zum antiemetischen Wirkmechanismus von Ingwer. In: *Chemie und Pharmazie*. Regensburg: Universität Regensburg; 1996.
3. Teuscher E, Bauermann U, Werner M. *Gewürzdrogen : ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer Ätherischen Öle / Eberhard Teuscher ; mit Beiträgen von Ulrike Bauermann, Monika Werner*; 2003.
4. WHO. Rhizoma zingiberis. In: *WHO monographs on selected medicinal plants*; 1999:277-287.
5. Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis - Folgeband 3*. Schneider, G. ed; 1998.
6. Krützfeldt K. Wissenswertes über ein altes Gewürz. *Dtsch. Apothek. Ztg.* 2003;143:83-91.
7. Falch B, Reichling J, Saller R. Ginger: not only a spice. Investigation of effects and effectivity. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1997;137:47-60.
8. Langner EG, S.; Grünwald, J. Ingwer. *Balance*. 1997;1:5-16.
9. United States Pharmacopoeia 25 (*USP 25*), 2002.
10. *Pharmacopoeia Europaea 5.00*; 2005.
11. Govindarajan VS. Ginger--chemistry, technology, and quality evaluation: part 1. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1982;17:1-96.
12. Govindarajan VS. Ginger-chemistry, technology, and quality evaluation: part 2. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1982;17:189-258.
13. Abdel-Aziz H. Isolation of some Active Constituents of *Zingiber officinale* and Characterization of their Effect on 5-HT<sub>3</sub> Receptors. Doktorarbeit an der Universität Münster, Pharmakologie; 2004.



14. Abdel-Aziz H, Nahrstedt A, Petereit F, Windeck T, Ploch M, Verspohl EJ. 5-HT<sub>3</sub> Receptor Blocking Activity of Arylalkanes Isolated from the Rhizome of *Zingiber officinale*. *Planta Med.* 2005;71:609-16.
15. Abdel-Aziz H, Windeck T, Ploch M, Verspohl EJ. Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT<sub>3</sub> receptors: binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol.* 2006;530:136-43. Epub 2005 Dec 20.
16. Kommission E, Monographie: Ingwerwurzel, am (ehemaligen) Bundesgesundheitsamt, BRD
17. Mascolo N, Jain R, Jain SC, Capasso F. Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). *J Ethnopharmacol.* 1989;27:129-40.
18. Wang H, Ng TB. An antifungal protein from ginger rhizomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:100-4.
19. Ficker C, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durst T, Assabgui R, Arnason JT. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother Res.* 2003;17:897-902.
20. Adewunmi CO, Oguntimein BO, Furu P. Molluscicidal and antischistosomal activities of *Zingiber officinale*. *Planta Med.* 1990;56:374-6.
21. Goto C, Kasuya S, Koga K, Ohtomo H, Kagei N. Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitol Res.* 1990;76:653-6.
22. Srinivasan K, Sambaiah K. The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Int J Vitam Nutr Res.* 1991;61:364-9.
23. Ahmed RS, Sharma SB, Srinivasan K, Sambaiah K. Biochemical studies on combined effects of garlic (*Allium sativum* Linn) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc) in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 1997;35:841-3.
24. Tanabe M, Chen YD, Saito K, Kano Y, Srinivasan K, Sambaiah K. Cholesterol biosynthesis inhibitory component from *Zingiber officinale* Roscoe. The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1993;41:710-3.
25. Bhandari U, Kanojia R, Pillai KK. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on dyslipidaemia in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:227-30.
26. Verma SK, Singh M, Jain P, Bordia A. Protective effect of ginger, *Zingiber officinale* Rosc on experimental atherosclerosis in rabbits. *Indian J Exp Biol.* 2004;42:736-8.

27. Shoji N, Iwasa A, Takemoto T, Ishida Y, Ohizumi Y. Cardiotoxic principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J Pharm Sci.* 1982;71:1174-5.
28. Kobayashi M, Shoji N, Ohizumi Y. Gingerol, a novel cardiotoxic agent, activates the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1987;903:96-102.
29. Lumb AB. Effect of dried ginger on human platelet function. *Thromb Haemost.* 1994;71:110-1.
30. Jiang X, Williams KM, Liauw WS, Ammit AJ, Roufogalis BD, Duke CC, Day RO, McLachlan AJ. Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;59:425-32.
31. Nurtjahja-Tjendraputra E, Ammit AJ, Roufogalis BD, Tran VH, Duke CC. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thromb Res.* 2003;111:259-65.
32. Koo KL, Ammit AJ, Tran VH, Duke CC, Roufogalis BD. Gingerols and related analogues inhibit arachidonic acid-induced human platelet serotonin release and aggregation. *Thromb Res.* 2001;103:387-97.
33. Srivastava KC, Mustafa T. Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Med Hypotheses.* 1992;39:342-8.
34. Srivastava KC, Mustafa T. Ginger (*Zingiber officinale*) and rheumatic disorders. *Med Hypotheses.* 1989;29:25-8.
35. Srivastava KC, Mustafa T. Spices: antiplatelet activity and prostanoid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1989;38:255-66.
36. Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM, Alnaqeeb MA, Khan I, Ali M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;67:475-8.
37. Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine.* 2005;12:684-701.
38. Kemper K. Ginger (*Zingiber officinale*). *Longwood Herbal Task Force.* 1999:1-18.
39. Yamahara J, Huang QR, Li YH, Xu L, Fujimura H. Gastrointestinal motility enhancing effect of ginger and its active constituents. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1990;38:430-1.

40. Schmid R, Schick T, Steffen R, Tschopp A, Wilk T. Comparison of Seven Commonly Used Agents for Prophylaxis of Seasickness. *J Travel Med.* 1994;1:203-206.
41. Grontved A, Brask T, Kambskard J, Hentzer E. Ginger root against seasickness. A controlled trial on the open sea. *Acta Otolaryngol.* 1988;105:45-9.
42. Mowrey DB, Clayson DE. Motion sickness, ginger, and psychophysics. *Lancet.* 1982;1:655-7.
43. Holtmann S, Clarke AH, Scherer H, Hohn M. The anti-motion sickness mechanism of ginger. A comparative study with placebo and dimenhydrinate. *Acta Otolaryngol.* 1989;108:168-74.
44. Wood CD, Manno JE, Wood MJ, Manno BR, Mims ME. Comparison of efficacy of ginger with various antimotion sickness drugs. *Clin Res Pr Drug Regul Aff.* 1988;6:129-36.
45. Fischer-Rasmussen W, Kjaer SK, Dahl C, Asping U. Ginger treatment of hyperemesis gravidarum. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1991;38:19-24.
46. Bone ME, Wilkinson DJ, Young JR, McNeil J, Charlton S. Ginger root--a new antiemetic. The effect of ginger root on postoperative nausea and vomiting after major gynaecological surgery. *Anaesthesia.* 1990;45:669-71.
47. Phillips S, Ruggier R, Hutchinson SE. Zingiber officinale (ginger)--an antiemetic for day case surgery. *Anaesthesia.* 1993;48:715-7.
48. Arfeen Z, Owen H, Plummer JL, Ilsley AH, Sorby-Adams RA, Doecke CJ. A double-blind randomized controlled trial of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *Anaesth Intensive Care.* 1995;23:449-52.
49. Chaiyakunapruk N, Kitikannakorn N, Nathisuwan S, Leeprakobboon K, Leelasettagool C. The efficacy of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:95-9.
50. Phillips S, Hutchinson S, Ruggier R. Zingiber officinale does not affect gastric emptying rate. A randomised, placebo-controlled, crossover trial. *Anaesthesia.* 1993;48:393-5.
51. Ernst E, Pittler MH. Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials. *Br J Anaesth.* 2000;84:367-71.
52. Schwörer H, Ramadori G. [Nausea and vomiting. Pathophysiology and new therapeutic methods]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1997;122:1014-9.

53. Parvez SH, Minami M, Caudy P, Endo T, Parvez S, Hirafuji M, Hamaue N, Akita K, Saito H, Yoshioka M, Qureshi G. Neurochemical markers of emesis induced by anti-cancer drugs: role of central mechanism. *Neuroendocrinology letters*. 1997;18:85-102.
54. Gregory RE, Ettinger DS. 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. A comparison of their pharmacology and clinical efficacy. *Drugs*. 1998;55:173-89.
55. Navari RM, Reinhardt RR, Gralla RJ, Kris MG, Hesketh PJ, Khojasteh A, Kindler H, Grote TH, Pendergrass K, Grunberg SM, Carides AD, Gertz BJ. Reduction of cisplatin-induced emesis by a selective neurokinin-1-receptor antagonist. L-754,030 Antiemetic Trials Group. *N Engl J Med*. 1999;340:190-5.
56. Tebbe JJ, Arnold R. Serotonin und Serotoninrezeptoren. *Deutsches Ärzteblatt*. 2004;101:A 936 - 42.
57. Endo T, Minami M, Hirafuji M, Ogawa T, Akita K, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M, Parvez SH. Neurochemistry and neuropharmacology of emesis - the role of serotonin. *Toxicology*. 2000;153:189-201.
58. Gralla RJ, Osoba D, Kris MG, Kirkbride P, Hesketh PJ, Chinnery LW, Clark-Snow R, Gill DP, Groshen S, Grunberg S, Koeller JM, Morrow GR, Perez EA, Silber JH, Pfister DG. Recommendations for the use of antiemetics: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 1999;17:2971-94.
59. Sakata E, Ohtsu K, Sakata H. Motion sickness: its pathophysiology and treatment. *Int Tinnitus J*. 2004;10:132-6.
60. Golding JF, Gresty MA. Motion sickness. *Curr Opin Neurol*. 2005;18:29-34.
61. Sherman CR. Motion sickness: review of causes and preventive strategies. *J Travel Med*. 2002;9:251-6.
62. Lien HC, Sun WM, Chen YH, Kim H, Hasler W, Owyang C. Effects of ginger on motion sickness and gastric slow-wave dysrhythmias induced by circularvection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:G481-9.
63. Lipka F, Wappler F, Leuwer R, Schulte Am Esch J. [Postoperative nausea and vomiting--pathophysiology, prophylaxis and treatment]. *Laryngorhinootologie*. 2002;81:725-31.
64. Sinclair DR, Chung F, Mezei G. Can postoperative nausea and vomiting be predicted? *Anesthesiology*. 1999;91:109-18.
65. Schröder O. [Nausea and vomiting in pregnancy]. *Med Monatsschr Pharm*. 2004;27:304-8; quiz 309-10.

66. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and chracterization. *Journal of Biological Chemistry*. 1948;176:1243-1251.
67. Naughton M, Mulrooney JB, Leonard BE. A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol*. 2000;15:397-415.
68. Wappler F, Fiege M, Schulte am Esch J. Pathophysiological role of the serotonin system in malignant hyperthermia. *Br J Anaesth*. 2001;87:794-8.
69. Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:2698-709.
70. Hüther G, Rüter R. *Das serotonnerge System*. Bremen: UNI-MED Verlag; 2000.
71. Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*. 1998;12:249-71.
72. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994;46:157-203.
73. Branchek TA, Mawe GM, Gershon MD. Characterization and localization of a peripheral neural 5-hydroxytryptamine receptor subtype (5-HT<sub>1P</sub>) with a selective agonist, 3H-5-hydroxyindalpine. *J Neurosci*. 1988;8:2582-95.
74. Cremonini F, Delgado-Aros S, Talley NJ. Functional dyspepsia: drugs for new (and old) therapeutic targets. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:717-33.
75. Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:3-14.
76. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. 1992;130:167-78.
77. Kubezcka K-H. Vortrennung ätherischer Öle und ähnlich komplexer Stoffgemische für die GC-Analyse durch modifizierte Trockensäulen-Chromatographie. *Chromatographia*. 1973;6:106-8.
78. Kovats E. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv.Chim.Acta*. 1958;41:1915-32.

79. van den Dool H, Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr.* 1963;11:463-471.
80. Schomburg G. *Gaschromatographie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1987.
81. Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy*. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation; 1995.
82. Engel R. Zusammensetzung und Ontogenese der ätherischen Öle von *Cedronella canariensis* (L.) Webb & Berth. ssp. *canariensis* und ssp. *anisata*. 1994.
83. Zawalich WS, Tesz GJ, Zawalich KC. Are 5-hydroxytryptamine-preloaded beta-cells an appropriate physiologic model system for establishing that insulin stimulates insulin secretion? *J Biol Chem.* 2001;276:37120-3. Epub 2001 Jul 30.
84. ESCOP. *Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs, Fasc. 1-6*. Exeter; 1996-1999.
85. Gong F, Fung YS, Liang YZ. Determination of volatile components in ginger using gas chromatography-mass spectrometry with resolution improved by data processing techniques. *J Agric Food Chem.* 2004;52:6378-83.
86. Akhani SP, Vishwakarma SL, Goyal RK. Anti-diabetic activity of *Zingiber officinale* in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56:101-5.
87. Köhler H. *Medizinalpflanzen in naturgetreuen Abbildungen*, Gera, 1887
88. Cash BD, Chey WD. Review article: The role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:1047-60.

# Danke!

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Mentor dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. Eugen J. Verspohl, ganz herzlich für die menschlich und fachlich hervorragende Betreuung während meiner Promotionszeit bedanken. Er stand jederzeit zu Diskussionen zur Verfügung und erlaubt es mir nun, die Zeit in seinem Arbeitskreis immer in sehr guter Erinnerung zu behalten.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Andreas Hensel, der als mein Tutor und zweiter Gutachter jederzeit für Fragen, die speziell den phytochemischen und analytischen Teil dieser Arbeit betrafen, zur Verfügung stand und mir damit immer ein großes Stück weiter geholfen hat.

Im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie und im Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie danke ich allen Mitarbeitern, die mich bei meinen Projekten unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe wäre ich nicht so weit gekommen und es ist sehr hilfreich auf so ein großes Wissen als Doktorand zurückgreifen zu können. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Petereit und Herrn Dr. Matthias Lechtenberg für die Geduld bei der Klärung von Fragen meinerseits und für die Unterstützung bei schwierigen Problemstellungen, sowie Frau Ursula Liefländer-Wulf, die mit mir geduldig an der GC-MS-Anlage gearbeitet hat, und Herrn Dr. Rolf Engelshowe für die Hilfe bei den mikroskopischen Schnitten.

Mein Arbeitskreis wird mir ganz besonders fehlen, denn wir hatten eine wirklich sehr schöne Zeit und haben uns gegenseitig immer viel Unterstützung gegeben. Ich danke euch für die Hilfe bei den Zellversuchen und anderen Problemstellungen. Es hat jeden Tag aufs Neue Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Wir sind halt doch die Besten!

Meine Wahlpflichtfachstudenten Andrea Schloots, Sebastian Schaaf, Nina Geißeler, Xenia Henkemeier und Tatjana Kowalski haben mich in den Semesterferien mit ihren kleinen Projekten tatkräftig unterstützt und ich danke ihnen für das Interesse und den Arbeitseifer, den sie dabei an den Tag gelegt haben.

Last, but not least gilt mein großer Dank auch meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und es mir ermöglicht haben, diesen Weg einzuschlagen. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Mama, Felix und Nina bedanken!

# **Lebenslauf**

## **Anja Riyazi**

Geburtsdatum: 01. Oktober 1977  
Geburtsort: Hameln  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Homayun Riyazi, Bauingenieur  
Regina Riyazi, geb. Jacobi, Apothekerin

## **Schulische Ausbildung und Studium**

1984 – 1988 Grundschule Sundern, Gütersloh  
1988 – 1997 Evangelisch Stiftisches Gymnasium, Gütersloh  
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife  
WS 1997 - WS 2001 Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster  
Oktober 1999 1. Staatsexamen  
Oktober 2001 2. Staatsexamen  
Nov. 2001 Pharmaziepraktikum im Chelsea and Westminster  
- Mai 2002 Hospital, London, Großbritannien  
Mai 2002 Pharmaziepraktikum in der Birken-Apotheke, Köln  
- Nov. 2002  
Dezember 2002 3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin

## **Berufliche Tätigkeiten**

Feb. 2003 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. E.J. Verspohl, Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster