

Karl Hartmut Schiller

**Wirkungen von Zubereitungen aus *Humulus lupulus* L.
in pharmakologischen Modellen**



Münster 2002

Pharmakologie und Toxikologie

**Wirkungen von Zubereitungen aus *Humulus lupulus* L.
in pharmakologischen Modellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Karl Hartmut Schiller
aus Höxter

Dekan:	Prof. Dr. V. Leute
Erster Gutachter:	Prof. Dr. E. J. Verspohl
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. H. Winterhoff
Tage der mündlichen Prüfungen:	- 06.11.2002 - 11.11.2002 - 13.11.2002
Tag der Promotion:	- 13.11.2002

Meinen Eltern

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde als Kooperation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Winterhoff und am Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter Leitung von Prof. Dr. E. J. Verspohl angefertigt.

Frau Prof. Dr. H. Winterhoff gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die intensive Betreuung, die wertvollen Diskussionen und den hohen persönlichen Einsatz, welcher sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. E. J. Verspohl danke ich sehr herzlich für seine wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie seine fachkundige und freundliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. W. Schmitz möchte ich für sein Interesse und die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie danken.

Herrn Dr. A. Forster (NATECO₂ GmbH & Co. KG, Wolnzach) sei herzlich gedankt für die fachkundige Beantwortung der vielen Fragen zum Thema Hopfen und die Zurverfügungstellung der zahlreichen Hopfen-Extrakte sowie die interessanten Diskussionen.

Herrn Dr. A. Biller (Dr. Loges & Co. GmbH, Winsen) möchte ich danken für zahlreiche Anregungen und Diskussionen sowie für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Dr. V. Butterweck für die freundschaftliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen.

Herrn Dr. J. Breitzkreuz danke ich für die fachkundige Hilfestellung bei der Entwicklung einer geeigneten Emulsion für die orale Anwendung.

Der Dr. Loges & Co. GmbH, Winsen, danke ich für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen.

Herrn Dr. G. F. Pauli möchte ich für die Überlassung der Hopfen-Extrakte Nugget´94 und Brewer´s Gold´94 danken.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn U. Breuer und Herrn D. Hübner für die technischen Hinweise und Anfertigung von Testmodellen.

Herrn B. Bußmann und Herrn C. Nissen danke ich für die gewissenhafte Aufzucht und Pflege der Versuchstiere.

Frau M. Hegger gilt mein besonderer Dank für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.

Abschließend gilt mein herzlichster Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises und Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, die mich in vielfältiger Hinsicht unterstützt und sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits als Tagungsbeitrag vorgestellt:

Registration of motility of experimental animals treated with central acting drugs.

Schiller, K. H., Verspohl, E. J., Winterhoff, H.

Postervortrag, International Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medical
Plant Research

3.-7. September 2000, Zürich



Humulus lupulus L.

Einleitung

1.1	Allgemeines	1
1.2	Geschichte	1
1.3	Botanische und systematische Beschreibung von <i>Humulus lupulus</i> L. ...	3
1.4	Charakterisierung der Inhaltsstoffe und Sorten	5
1.4.1	Hopfenbitterstoffe	5
1.4.2	Ätherisches Öl.....	7
1.4.3	Polyphenole.....	8
1.4.4	Weitere Inhaltsstoffe	9
1.4.5	Hopfensorten.....	10
1.5	Pharmakologische Untersuchungen	12
1.5.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen	12
1.5.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen im Tiermodell.....	14
1.5.3	Toxikologische Daten	16
1.5.4	Humanpharmakologische Untersuchungen.....	16
1.5.5	Klinik.....	17
1.6	Monographie der Kommission E	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20

Material

2.1	Extraktmaterial	21
2.2	Versuchstiere	26
2.3	Elektronik	27
2.4	Allgemeine Laborgeräte	28
2.5	Verbrauchsmaterialien	29
2.6	Reagenzien für pharmakologische Testmodelle	29

Methoden

3.1	Pharmakologische Untersuchungen	31
3.1.1	Allgemeines	31
3.1.2	Applikationstechniken	32
3.1.3	Herstellung der Prüflösungen	32
3.1.4	Pharmakologische Testmodelle	36
3.1.4.1	Open Field	36
3.1.4.2	Open Field nach M.-L. Weischer	37
3.1.4.3	Motilitätsmeßsystem	37
3.1.4.4	Testung auf eine Narkoseverlängerung	44
3.1.4.5	Testung auf anxiolytische Aktivität	46
3.1.4.6	Testung auf Muskelrelaxation und Muskelkoordination	47
3.1.4.7	Körper- und Organgewichtsbestimmung	47
3.1.4.8	Prüfung auf estrogene Wirkung	48
3.1.4.9	Beeinflussung der Körpertemperatur	48
3.2	Statistische Auswertung	49

Ergebnisse

4.1	Pharmakologische Untersuchungen	51
4.1.1	Testung auf Narkoseverlängerung	51
4.1.1.1	Ketaminnarkose	51
	Hopfen-Extrakte Nugget´94 und Brewer´s Gold´94	51
	Hopfen-Extrakte 97 031 CO ₂ , 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase	52
	Hopfen-Extrakte HPE´98 März´99, HPE´99 ölreich, HHE´99 ölreich	54
	Hopfen-Extrakte Öl 2, Lupulonextrakt entölt [Lup] und Humulonextrakt [Hum]	55
	Hopfen-Extrakte Hopfenöl rein [Ölrein], Weichharz-spezifisch [Weich] und Beta-spezifisch [Beta]	63

	Mischungen aus den Extrakten Hum, Lup, Öl 2 und Ölrein	64
	Untersuchung auf Interferenzen zwischen Hopfenextrakten und Dopamin-Rezeptorantagonisten	67
	Untersuchung auf Interferenzen zwischen Hopfenextrakten und Benzodiazepin-Rezeptorantagonisten	69
4.1.1.2	Ethernarkose	70
4.1.2	Testung auf Beeinflussung der Motilität	72
4.1.2.1	Motilitäts-Meßsystem	72
	Hopfen-Extrakte Nugget'94 und Nugget'98/Nov'98	72
	Hopfen-Extrakte der Ernten 1997 und 1998	74
	Hopfen-Extrakte 97 031 CO ₂ , 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase	78
	Hopfen-Extrakte der Ernte 1999	84
	Hopfen-Extrakt Öl 2	90
	Hopfen-Extrakt Hopfenöl rein [Ölrein]	91
	Hopfen-Extrakte Lupulonextrakt und Lupulonextrakt entölt [Lup]	92
	Hopfen-Extrakt Beta-spezifisch [Beta]	94
	Hopfen-Extrakt Weichharz-spezifisch	94
	Hopfen-Extrakt Humulonextrakt [Hum]	95
	Mischungen aus den Extrakten Lup und Ölrein	96
4.1.3	Versuche nach wiederholter Applikation der Prüflösungen	97
4.1.3.1	14-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal	98
4.1.3.2	4-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal	99
4.1.3.3	12-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal	99
4.1.3.4	12-tägige Applikation der Extrakte HHM'99 ölreich, HPE'99 normal und HPE'99 ölreich	101
4.1.3.5	17-tägige Applikation der Extrakte HPE'99 ölarm und 97 021 Bitterstoffphase	103
4.1.3.6	17-tägige Applikation der Extrakte Öl 1 und Öl 2	105
4.1.3.7	20-tägige Applikation der Extrakte Öl 2, Hum, Lup und HHM'99 normal .	107
4.1.3.8	15-tägige Applikation der Extrakte Öl 2 und HHM'99 normal	110

4.1.3.9	37-tägige Applikation des Extraktes Lup und einer Mischung aus Lup und Ölrein	112
4.1.4	Testung auf anxiolytische Aktivität	115
	Hopfen-Extrakt HPE´98 März´99	115
	Hopfen-Extrakt HPE´99 ölreich	117
	Hopfen-Extrakt Öl 2	118
	Mischung aus den Hopfenextrakten Lup und Ölrein.	119
4.1.5	Testung auf Beeinflussung der Spontanmotilität	121
	Hopfen-Extrakt Nugget´94	121
	Hopfen-Extrakt HPE´98 März´99	122
	Hopfen-Extrakt Öl 2	123
	Hopfen-Extrakte Lup und Ölrein.	124
4.1.6	Testung auf Beeinflussung der Körpertemperatur	125
	Hopfen-Extrakte 97 031 CO ₂ , 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase	125
	Hopfen-Extrakte Öl 2 und Lup	126
4.1.7	Testung auf Muskelrelaxation und Muskelkoordination	127

Diskussion

5	Diskussion	128
----------	-----------------------------	------------

Zusammenfassung

6	Zusammenfassung	142
----------	----------------------------------	------------

Literaturverzeichnis

7	Literaturverzeichnis.	145
----------	--------------------------------------	------------

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

In nahezu allen Ländern der Welt wird Hopfen angebaut. „*Hopfen und Malz, Gott erhalt´s!*“ Dieses Sprichwort weist schon auf die zentrale Rolle von *Humulus lupulus* L. für die Brauerei von Bier hin. Hopfen ist für den typisch herben Geschmack, das Aroma und die Stabilität verantwortlich. Über 99 % der Jahresproduktion von weltweit etwa 100 000 Tonnen (Hopsteiner, 2001) gehen in die Produktion von Bier. In Deutschland befindet sich mit der Hallertau bei München das größte zusammenhängende Anbaugebiet der Welt (ca. 15 000 ha). Der Nutzung von *Humulus lupulus* als Arzneimittel kommt nur eine untergeordnete Bedeutung zu. Die Hopfenzapfen oder Extrakte aus den Hopfenzapfen werden eingesetzt bei Unruhe, Angstzuständen oder Schlafstörungen, meist in Kombination mit anderen Sedativa. Die Inhaltsstoffe von *Humulus lupulus* sind relativ gut beschrieben. Welche der etwa 100 Bitterstoffe, 300 Aromakomponenten und 100 Polyphenole für die sedierende Wirkung verantwortlich sind ist, allerdings wenig bekannt oder widersprüchlich.

1.2 Geschichte

Die ursprüngliche Heimat des Hopfens ist unklar, da fossile Funde fehlen. Wildformen des Hopfens kommen heute noch in Flußniederungen und Auen vor (Hager, 2002). Durch den Anbau als Kulturpflanze wurde Hopfen auf der ganzen Welt verbreitet. Er wurde wahrscheinlich schon lange in Europa genutzt, die erste bekannte Erwähnung in der Literatur stammt von *Plinius d. Ä.* (23-79 n.Chr.) in seiner *Naturalis Historia*. Die Römer kannten den Hopfen, jedoch wurden Hopfensprossen als Delikatesse und nicht zur Bierherstellung verwendet. Bier- oder bierähnliche Getränke gibt es wahrscheinlich schon sehr lange, jedoch wurden diese nicht mit Hopfen, sondern mit Myrte, Honig, Zimt, Eichenlaub, Efeu, Wegewartenwurzel, Schafgarbe oder anderen Kräutern gewürzt. Einige Autoren gehen

davon aus, daß bereits in Babylon 7000 Jahre v. Chr. eine Art Bier gebraut wurde (Moir, 2000) und bei Ausgrabungen der alten ägyptischen Königsstadt Amarna fand man Überreste einer Brauerei (Czygan, 1992). Auch die Wikinger (8. bis 11. Jahrhundert) kannten bereits ein bierähnliches Getränk, Met, welches aus Wasser, Honig und Hefe gebraut wurde. Erste geschichtliche Hinweise auf den Anbau von Hopfen stammen aus dem 8. Jahrhundert n. Chr.. Wahrscheinlich waren es Mönche, die den Hopfen in Mitteleuropa kultivierten und als Bierzusatz entdeckten. Pipin, der Vater Karls des Großen, schenkte 768 der Abtei von St. Denis bei Paris *humlonariae* (Hopfengärten). Von den Freisinger Bischöfen Anno (854-875) und Arnold (875-883) wurden Hopfengärten urkundlich in der Region der Hallertau und anderen Orten in Oberbayern erwähnt (Bertsch, 1947). Über die Verwendung von Hopfen bei der Bierherstellung berichtete zuerst Hildegard von Bingen (1098-1175) in ihrer *Physica*. Sie beschreibt darin nicht nur die konservierende Wirkung des Hopfens, sondern weist auch darauf hin, daß der Hopfen die Melancholie des Menschen vergrößere (Müller, 1982). Auch Albertus Magnus erwähnt in seiner *de vegetabilibus* die Tatsache, daß Hopfen den Kopf beschwert. Der aus dem arabischen Raum stammende Ibn-Al-Baytar (um 1200) weist ebenfalls auf eine dämpfende Eigenschaft des Hopfens hin. Vielleicht sind dies frühe Hinweise auf eine sedative Wirkung.

Durch das Bekanntwerden der konservierenden und geschmacksverfeinernden Eigenschaften des Hopfens wurden andere Zusätze nach und nach verdrängt, bis 1516 das bayerische Reinheitsgebot erlassen wurde. Es schreibt für die Herstellung des Bieres die alleinige Verwendung von Wasser, Malz und Hopfen vor. Durch den steigenden Bierkonsum in den folgenden Jahrhunderten wurde Hopfen zu einem begehrten Handelsgut und bescherte Städten wie z.B. Nürnberg Reichtum. Um die Herkunft und Reinheit des Hopfens festzulegen, wurden zuerst in der Stadt Spalt (1538) und später in allen hopfenanbauenden Gebieten Hopfensiegel eingeführt. Hopfen wurde auch nach England exportiert, dort aber zunächst von Heinrich VIII. verboten. Wahrscheinlich weil alter, braun gefärbter Hopfen verwendet wurde, der mit Schwefeldioxid gebleicht worden war. Durch britische und holländische Siedler wurde der Hopfen im frühen 17. Jahrhundert in die USA gebracht, wo im Yakima Valley das größte Hopfenanbaugebiet entstand. Im 18. und 19. Jahrhundert erreichte der Hopfen schließlich Australien und Neuseeland (Moir, 2000).

Seinen botanischen Namen *Humulus lupulus* erhielt der Hopfen 1737 durch Carl von Linné. Zur Herkunft dieser Bezeichnung gibt es unterschiedliche Theorien. Das im späthochdeutschen nachweisbare *hopfo*, das sich im englischen als *hop* wiederfindet, soll aus dem aus germanisch-mittellateinischen *hupa* entstanden sein. Es weist vielleicht, wie das norwegisch-mundartliche *hupp* für Quaste, auf die zapfenartigen Fruchtstände hin (Kluge, 1989). Der Begriff *Humulus* kommt dagegen aus dem Lateinischen, es ist die Verkleinerungsform von vulgär Latein *humlo* für Hopfen (Duden, 2000). Man findet ihn auch in der französischen Bezeichnung *houblon* für Hopfen wieder. Der Zusatz *lupulus* ist die Verkleinerungsform von *Lupus* (lat. Wolf) und deutet auf die überwuchernden Eigenschaften des Hopfens hin. Der Begriff wurde schon von Plinius d. Ä. im Zusammenhang mit Hopfen gebraucht, er nannte ihn *Lupus salictarius*.

1.3 Botanische und systematische Beschreibung von *Humulus lupulus* L.

Humulus lupulus L. ist eine ausdauernde, meistens rechtswindende Pflanze, deren einjährige Triebe 6 m, in Kulturen 12 m Länge erreichen. Die Stengel sind grün und nicht verholzend. Die lang gestielten Blätter sind gegenständig, 10 bis 15 cm breit, oberseits rauhaarig und aus einem herzförmigen Grund heraus meist drei- bis siebenlappig. Der Blattrand ist gesägt. Von Juli bis August erscheinen die grünlich-weißen männlichen Blüten mit ca. 5 mm Durchmesser. Sie sind in lockeren Rispen angeordnet. Die weiblichen Blüten stehen in dichten, stark verzweigten Infloreszenzen. Der Fruchtknoten hat zwei Narben und ist am Grunde von einem häutigen, eng anliegenden Perigon umschlossen. Das Hüllblatt ist 5- bis 8nervig, sein oberes Ende abgerundet. Zur Zeit der Reife wachsen die Hüllblätter zu den eiförmigen Fruchtständen, den "Hopfendolden" heran. An ihnen stehen 1 bis 2 cm lange Deckblätter, die sich dachziegelartig decken und in ihrer Gesamtheit den 2 bis 5 cm langen und 1 bis 2 cm breiten Fruchtstand bilden. Die Innenseiten der Deckblätter sind übersät mit kleinen, glänzenden, hellgelben Drüsenschuppen. Am inneren Grund der Schuppen sitzen die an Harz, Hopfenbittersäuren und ätherischem Öl reichen *Glandulae lupuli* (Hopfendrüsen) (nach Hager, 2002 und Czygan, 1992).

Systematisch gehört *Humulus lupulus* in die Familie der Cannabaceen, die mit den Urticaceen zu den Urticales gehören. Der Hopfen steht also zwischen der Brennessel (*Urtica spec.*) und dem zur Haschisch oder Marihuana Gewinnung dienendem Hanf (*Cannabis sativa*).

Humulus lupulus L. besitzt zahlreiche Synonyme:

Humulus lupulus L. var. *cordifolius* (MIQ.) MAXIM IN FRANCH. ET SAV.; *Humulus cordifolius* MIQ.; *Humulus lupulus* L. var. *lupuloides* E. SMALL; *Humulus americanus* NUTT.; *Humulus lupulus* L. var. *lupulus*; *Cannabis lupulus* (L.) SCOPOLI; *Humulus lupulus* var. *brachystachyus* ZAPALOWICZ; *H. volubilis* SALISB.; *H. vulgaris* GILIB.; *Lupulus communis* GAERTN.; *L. humulus* MILL.; *L. scandens* LAM.; *Humulus lupulus* L. var. *neomexicanus* NELSON ET COCKERELL; *Humulus neomexicanus* (NELSON ET COCKERELL) RYDBERG

Unterschieden werden aufgrund geographischer Verbreitung 5 Varietäten: *Humulus lupulus* L. var. *cordifolius* (MIQ.) MAXIM. in FRANCH. et SAV. in Ostasien, vor allem in Japan, var. *lupuloides* E. SMALL im östlichen Nordamerika, var. *Lupulus* in Europa, var. *neomexicanus* NELSON et COCKERELL im Westen Nordamerikas und var. *pubescens* E. SMALL im amerikanischen Mittelwesten (Hager, 2002).

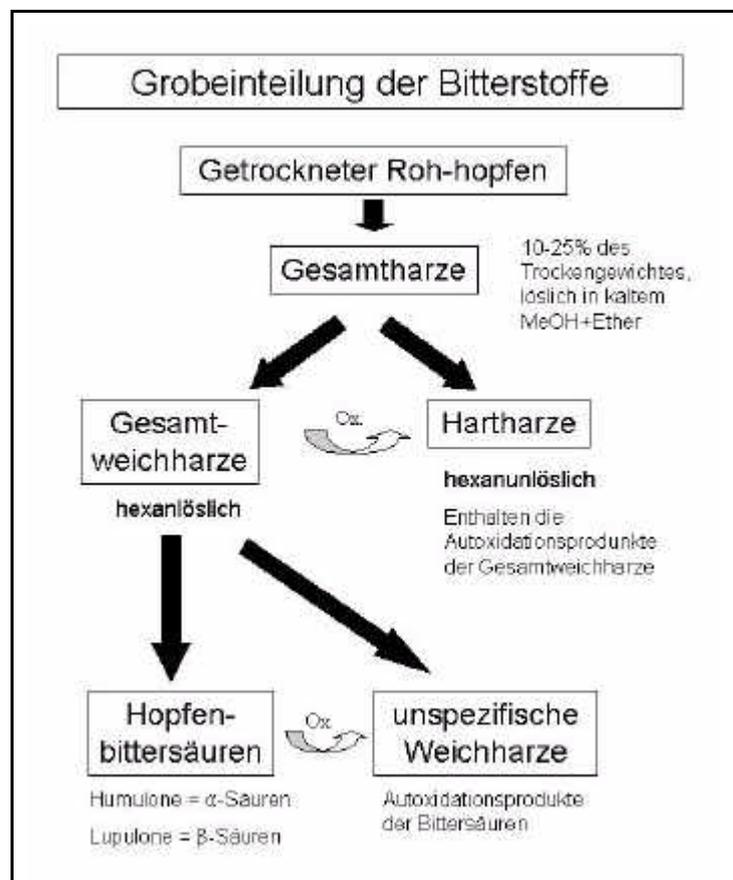
Das optimale Klima zum Anbau des Hopfens liegt zwischen Weinbau- und Weizenklima. Feuchte Sommer mit nicht zu hohen Temperaturen und normaler Sonnenscheindauer bringen sehr gute Erträge und hohe Bitterwerte in den Hopfendolden. Für den Hopfenanbau eignen sich Böden, die bis 2 m wurzeldurchlässig sind und keine Staunässen aufweisen, z.B. sandige Lehme oder lehmige Sande. Kultiviert werden nur die weiblichen Pflanzen, denn nur die Hopfendrüsen von unbefruchteten Zapfen enthalten das erwünschte Aroma. Die Hopfenanbauer sind gesetzlich dazu verpflichtet, männliche Pflanzen in der Nähe von Hopfenfeldern zu entfernen. Männliche Pflanzen sind nur zur Züchtung neuer Sorten von Bedeutung. Die neu gezüchtete Sorte wird dann ausschließlich vegetativ durch Fehser (=Rhizom-, Sproß-, Wurzelstücke) weiblicher Pflanzen vermehrt.

1.4 Charakterisierung der Inhaltsstoffe und Sorten

Die Angaben zu den Inhaltsstoffen beziehen sich alle auf die arzneilich und brautechnisch verwendeten Hopfenzapfen. Auf die verschiedenen Sorten, die sich qualitativ und quantitativ im Gehalt an Bitterstoffen und ätherischem Öl unterscheiden, wird am Ende des Kapitels eingegangen.

1.4.1 Hopfenbitterstoffe

Die Hopfenbitterstoffe, bestehend aus den Hopfenbittersäuren und ihren Autoxidationsprodukten machen 10 bis 25 % des Trockengewichtes von Hopfen aus. Nach Wöllmer wird eine grobe Einteilung aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln vorgenommen (s. Schema). Die "Gesamtharze" stellen eine harzige Masse dar, die nach einer Extraktion mit kaltem Methanol und Ether gewonnen wird. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit dieser "Gesamtharze" in Hexan, unterteilt man in



"Gesamtweichharze" (hexanollöslich) und "Hartharze" (hexanolunlöslich). Die Gesamtweichharze bestehen aus den "Hopfenbittersäuren" und den "unspezifischen Weichharzen". Die unspezifischen Weichharze stellen Autoxidationsprodukte der Hopfenbittersäuren dar.

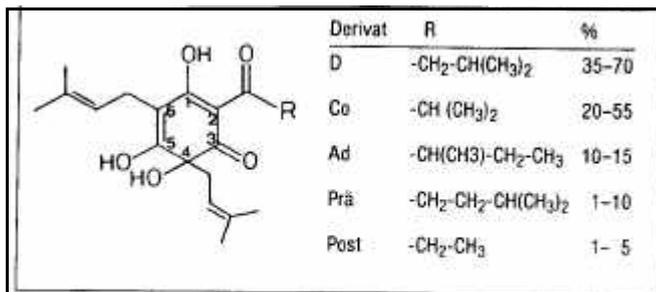


Abbildung 1: Die einzelnen Humulone und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfraktion der α-Säuren

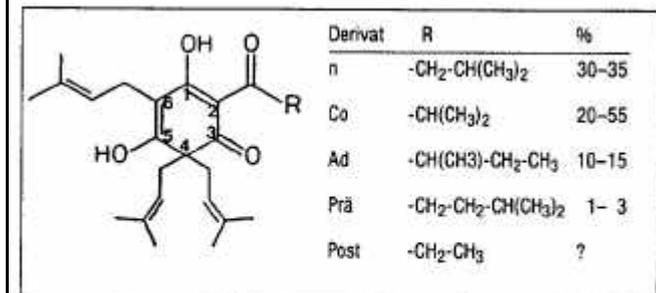


Abbildung 2: Die einzelnen Lupulone und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtfraktion der β-Säuren

Das Hartharz besteht aus den Autoxidationsprodukten der Gesamtweichharze. Bei der Lagerung des Hopfens nimmt der Hartharzanteil kontinuierlich zu, während sich der Weichharzanteil in gleichem Maße verringert. Die Bittersäuren sind Monoacylphloroglucide mit Dimethylallyl-Seitenketten. Nach der Anzahl der Dimethylallyl-Seitenketten unterscheidet man Humulone (= "alpha-Säuren") mit zwei und Lupulone (= "beta-Säuren") mit drei Dimethylallyl-Seitenketten. Die alpha-Säuren bzw. beta-

Säuren stellen jeweils Homologe dar, die sich in ihren Seitenketten am C-2-Atom unterscheiden (Hager, 2002).

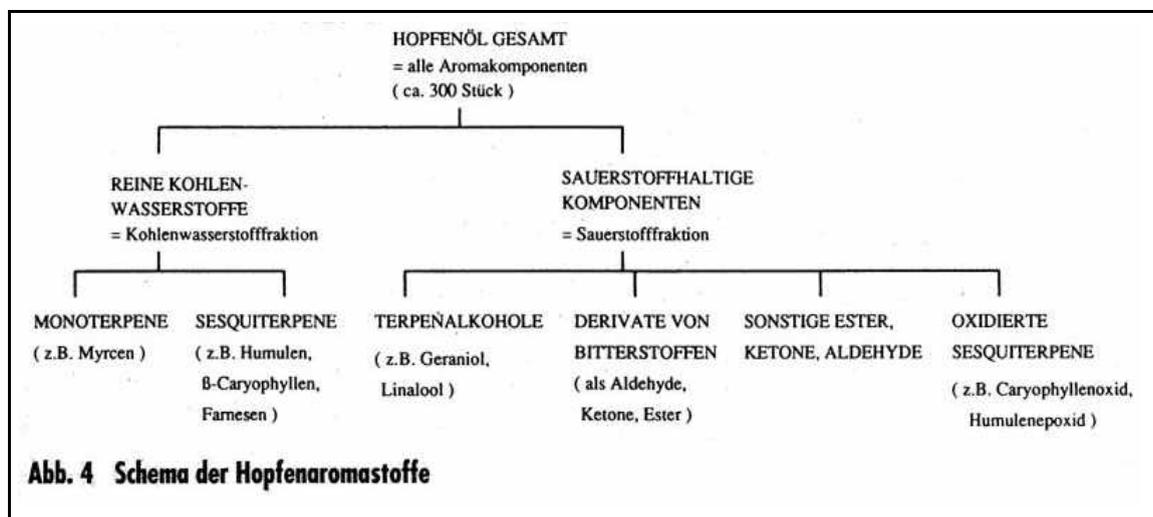
Für den Brauer sind die Bittersäuren, vor allem die alpha-Säuren, die wesentlichsten Inhaltsstoffe, da sie Hauptträger der "Bittere" sind. Ohne sie schmeckt ein Bier fad (Forster, 1993).

Hopfenbittersäuren sind sehr leicht autoxidabel und gehen bei der Lagerung in das äußerst komplexe Gemisch polarer Verbindungen über, das unter dem Namen "Hartharze" zusammengefaßt wird. Aus den alpha-Säuren entstehen dabei Cyclopentatrionderivate mit zahlreichen Glykol-, Keto- oder Epoxidgruppen. Beta-Säuren bilden dagegen vorwiegend Dihydrofuranerivate. Da der Gehalt an alpha- bzw. beta-Säuren bereits innerhalb einer Lagerdauer von 6 Monaten um ca. 30 % absinkt, werden Mindestgehalte für Hopfenzapfen für pharmazeutische Zwecke gefordert, um überlagerte Drogen auszuschließen (Hager, 2002).

1.4.2 Ätherisches Öl

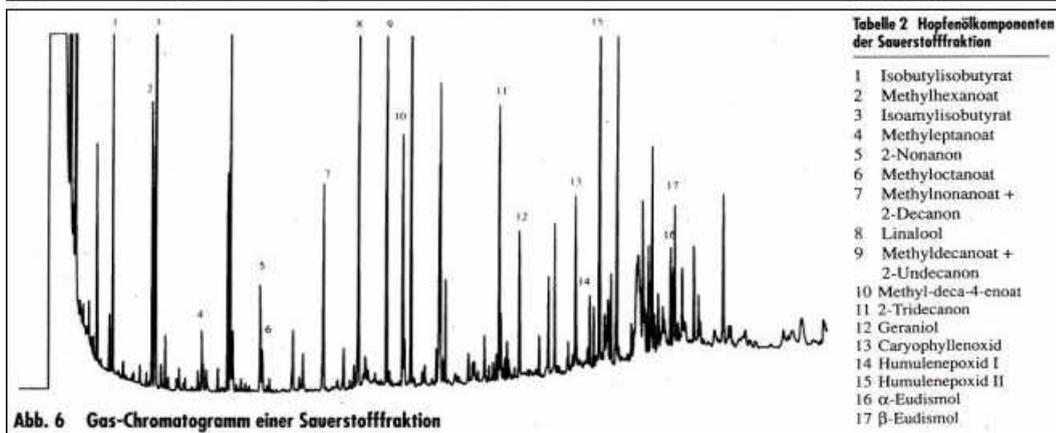
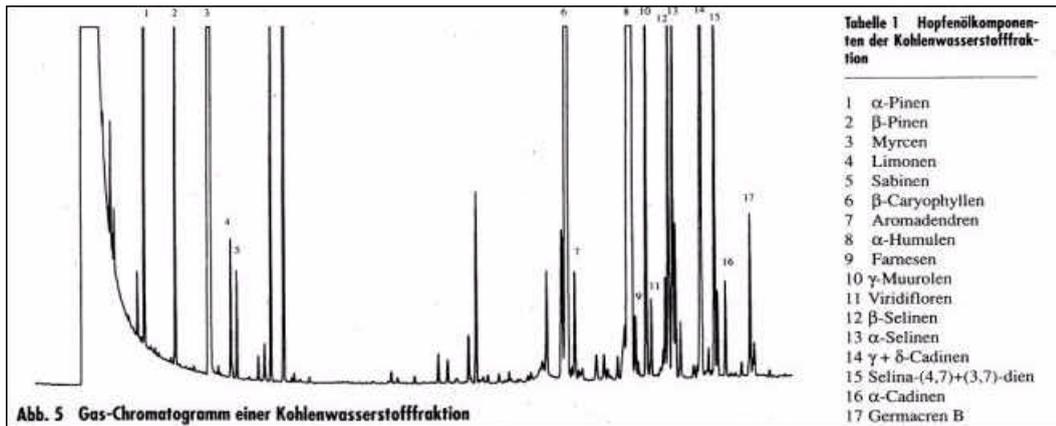
Hopfenöl setzt sich zu ca. 70 % aus Terpenkohlenwasserstoffen und zu etwa 30 % aus sauerstoffhaltigen Verbindungen zusammen. Der Gehalt beträgt je nach Sorte zwischen 0,5 und 3 % des Trockengewichtes. Hauptbestandteile sind Myrcen (27 bis 62 %), Humulen (3,5 bis 35 %), β -Caryophyllen (2,7 bis 17 %) und 2-Undecanon (2 bis 17 %) (Hager, 2002).

Eine grobe Einteilung zeigt das folgende Schema (Forster, 1993). Etwa 300 Bestandteile sind identifiziert.



Zur Analytik wird ein Wasserdampfdestillat zunächst säulenchromatografisch in eine Kohlenwasserstoff- und eine Sauerstofffraktion zerlegt. Die beiden Fraktionen werden dann getrennt in den Gaschromatographen injiziert. Beispiel-Chromatogramme sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt:

(aus Forster, 1993)



1.4.3 Polyphenole

Substanzgruppe	Gehalte (mg/100 g)
Hydroxybenzoesäuren	1 - 10
Hydroxyzimtsäuren	100 - 450
Proanthocyanidine	100 - 600
Flavanole	30 - 200
Flavonole	1 - 10
Quercetinflavonoide	50 - 250
Kämpferolflavonoide	50 - 300
Prenylflavonoide	100 - 1000

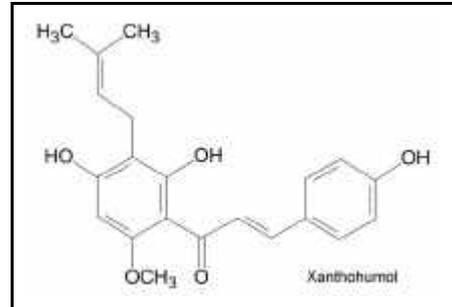
Gehalte an Polyphenolgruppen in Hopfen (nach Forster A. 1998)

Eine Übersicht über die verschiedenen Gehalte an Polyphenolgruppen im Hopfen gibt die nebenstehende Tabelle.

Im Einzelnen sind Ferulasäure, Gallussäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure, Neochlorogensäure, para-

Cumarsäure, para-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure und Vanillinsäure enthalten sowie Astragalin, Isoquercitrin, Rutin, Catechin, Epicatechin, Procyanidin, Prodelfphinidin, Propaeonidin und Propelargonidin. Darüber hinaus finden sich nicht näher definierte Triflavane, höher polymerisierte Polyphenole und Phlobaphene (Hager, 2002).

Eine Sonderstellung nimmt das unpolare Xanthohumol ein. Sein Gehalt nimmt während einer Lagerung von 6 Monaten um ca. 50 % ab, so daß ein Mindestgehalt von 0,2 % in Hopfenzapfen für pharmazeutische Zwecke gefordert wird, um überlagerte Droge auszuschließen. Bei der Einteilung der Inhaltsstoffe nach Wöllmer wird



es aber den Hartharzen, also den gealterten Substanzen zugeordnet, was streng genommen nicht korrekt ist.

Im Gegensatz zu den anderen Polyphenolen, die in Ethanol- bzw. überkritischem CO₂ nur wenig (< 5 %) bzw. nicht löslich sind, wird Xanthohumol mit Ethanol zu 90 % und mit CO₂ zu 5 % extrahiert (Forster, 1998).

Das Flavanon 8-Prenylnaringenin kommt in Mengen von etwa 25 bis 60 ppm im Hopfen vor. In üblichen CO₂-Extrakten wurden Konzentrationen von 1 bis 8 ppm festgestellt (Rong, 2000).

1.4.4 Weitere Inhaltsstoffe

Frischer Hopfen enthält in Spuren 2-Methyl-3-buten-2-ol, dessen Gehalt nach einer zweijährigen Lagerzeit auf Maximalwerte von 0,1 bis 0,15 % ansteigt, um danach wieder allmählich abzusinken. Lipophile Hopfenextrakte enthalten 2-Methyl-3-buten-2-ol, während mit polaren Lösungsmitteln bereitete Hopfenextrakte und die daraus hergestellten Fertigarzneimittel frei von 2-Methyl-3-buten-2-ol sind (Wohlfahrt et al., 1982).

Hopfen enthält ferner Stickstoffverbindungen, darunter Adenin, Betain, Cholin, Histamin, Hypoxanthin, Riboflavin sowie eine ganze Reihe von Aminosäuren.

1.4.5 Hopfensorten

Es gibt eine Vielzahl von Hopfensorten, die sich qualitativ und quantitativ im Gehalt an Bitterstoffen und ätherischem Öl unterscheiden. Noch in den 50er Jahren wurde meist nur eine Sorte pro Anbaugbiet verwendet. Inzwischen wurden aber z.B. vom Hans-Pfülf-Institut für Hopfenforschung neue Sorten gezüchtet, die eine bessere Resistenz gegen Krankheiten besitzen und eine stabile Ertragslage gewährleisten. Eine grobe Einteilung ist in Bitter- und Aromasorten möglich. Dabei bestimmt der Anteil an alpha-Säuren den Bitterstoffgehalt. Er liegt bei Aromasorten zwischen 3 und 6 %, bei deutschen Bittersorten zwischen 6 und 9 %. Typische in der Hallertau angebaute Aromasorten sind z.B. Perle und Hersbrucker Spät, typische Bittersorten stellen Magnum und Brewer's Gold dar (Forster, 1993).

Die Tabelle gibt einen Überblick einiger Hopfensorten, die angegebenen Analysewerte sind Durchschnittswerte, sie können nach Jahr, Witterung, Anbaugbiet, Pflanzter und Alterung des Hopfens variieren (aus CMA Bonn, 2002):

<p>Brewer's Gold</p> <p>Die Bittersortensorte "Brewer's Gold" ist eine wüchsige, ertragsreiche Sorte mit hoher Krankheitsanfälligkeit. In der Hallertau wird die Sorte hauptsächlich wegen ihrer späten Reifezeit angebaut.</p>  <table border="1"> <tr> <td>Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Baden-Biiburg-Pfalz</td> <td>Reife: spät</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Brauqualität: bewährter Bitterhopfen</td> </tr> <tr> <th colspan="4">Inhaltsstoffe</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Bitterstoffe</th> <th colspan="2">Aromastoffe</th> </tr> <tr> <td>alpha-Säuren</td> <td>6,4 %</td> <td>Gesamtöl in ml pro 100 g</td> <td>2,0</td> </tr> <tr> <td>beta-Säuren</td> <td>3,1 %</td> <td>alpha-Humulon</td> <td>30,0 %</td> </tr> <tr> <td>alpha/beta-Verhältnis</td> <td>2,1</td> <td>beta-Caryophyllen</td> <td>7,3 %</td> </tr> <tr> <td>Humulon : Cohumulon</td> <td>55 : 44</td> <td>Farnesen</td> <td>0</td> </tr> </table>	Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Baden-Biiburg-Pfalz	Reife: spät		Brauqualität: bewährter Bitterhopfen	Inhaltsstoffe				Bitterstoffe		Aromastoffe		alpha-Säuren	6,4 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	2,0	beta-Säuren	3,1 %	alpha-Humulon	30,0 %	alpha/beta-Verhältnis	2,1	beta-Caryophyllen	7,3 %	Humulon : Cohumulon	55 : 44	Farnesen	0	<p>Hersbrucker Spät</p> <p>Die Aromasorte "Hersbrucker Spät" hat sich mittlerweile vor allem in der Hallertau zu der Sorte mit der größten Anbaufläche entwickelt. Wegen ihrer größten Widerstandsfähigkeit gegen Welke hat sie den "Hallertauer" als Aromasorte abgelöst.</p>  <table border="1"> <tr> <td>Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck</td> <td>Reife: mittelspät bis spät</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Brauqualität: sehr guter Aromahopfen</td> </tr> <tr> <th colspan="4">Inhaltsstoffe</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Bitterstoffe</th> <th colspan="2">Aromastoffe</th> </tr> <tr> <td>alpha-Säuren</td> <td>3,5 %</td> <td>Gesamtöl in ml pro 100 g</td> <td>0,7</td> </tr> <tr> <td>beta-Säuren</td> <td>5,7 %</td> <td>alpha-Humulon</td> <td>32,4 %</td> </tr> <tr> <td>alpha/beta-Verhältnis</td> <td>0,6</td> <td>beta-Caryophyllen</td> <td>13,6 %</td> </tr> <tr> <td>Humulon : Cohumulon</td> <td>79 : 21</td> <td>Farnesen</td> <td>0</td> </tr> </table>	Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck	Reife: mittelspät bis spät		Brauqualität: sehr guter Aromahopfen	Inhaltsstoffe				Bitterstoffe		Aromastoffe		alpha-Säuren	3,5 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	0,7	beta-Säuren	5,7 %	alpha-Humulon	32,4 %	alpha/beta-Verhältnis	0,6	beta-Caryophyllen	13,6 %	Humulon : Cohumulon	79 : 21	Farnesen	0
Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Baden-Biiburg-Pfalz	Reife: spät																																																								
	Brauqualität: bewährter Bitterhopfen																																																								
Inhaltsstoffe																																																									
Bitterstoffe		Aromastoffe																																																							
alpha-Säuren	6,4 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	2,0																																																						
beta-Säuren	3,1 %	alpha-Humulon	30,0 %																																																						
alpha/beta-Verhältnis	2,1	beta-Caryophyllen	7,3 %																																																						
Humulon : Cohumulon	55 : 44	Farnesen	0																																																						
Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck	Reife: mittelspät bis spät																																																								
	Brauqualität: sehr guter Aromahopfen																																																								
Inhaltsstoffe																																																									
Bitterstoffe		Aromastoffe																																																							
alpha-Säuren	3,5 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	0,7																																																						
beta-Säuren	5,7 %	alpha-Humulon	32,4 %																																																						
alpha/beta-Verhältnis	0,6	beta-Caryophyllen	13,6 %																																																						
Humulon : Cohumulon	79 : 21	Farnesen	0																																																						
<p>Hallertauer Mittelfrüher</p> <p>Die Aromasorte "Hallertauer Mittelfrüher" ist die traditionelle Sorte der Hallertau. Ihre Fläche geht zurück. Bedingt durch die starke Welkeanfälligkeit ist der Ertrag in den letzten Jahren gesunken. Eine Neuanpflanzung in welkegeforderten Lagen ist deshalb nicht mehr wirtschaftlich. Alle Anlagen sind jedoch z. T. noch relativ gesund.</p>  <table border="1"> <tr> <td>Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Tettnang, Baden-Biiburg-Pfalz</td> <td>Reife: mittelfrüh</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Brauqualität: traditioneller, hochfeiner Aromahopfen</td> </tr> <tr> <th colspan="4">Inhaltsstoffe</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Bitterstoffe</th> <th colspan="2">Aromastoffe</th> </tr> <tr> <td>alpha-Säuren</td> <td>4,6 %</td> <td>Gesamtöl in ml pro 100 g</td> <td>1,0</td> </tr> <tr> <td>beta-Säuren</td> <td>4,7 %</td> <td>alpha-Humulon</td> <td>55,1 %</td> </tr> <tr> <td>alpha/beta-Verhältnis</td> <td>1,0</td> <td>beta-Caryophyllen</td> <td>14,6 %</td> </tr> <tr> <td>Humulon : Cohumulon</td> <td>75 : 24</td> <td>Farnesen</td> <td>unter 0,1 %</td> </tr> </table>	Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Tettnang, Baden-Biiburg-Pfalz	Reife: mittelfrüh		Brauqualität: traditioneller, hochfeiner Aromahopfen	Inhaltsstoffe				Bitterstoffe		Aromastoffe		alpha-Säuren	4,6 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	1,0	beta-Säuren	4,7 %	alpha-Humulon	55,1 %	alpha/beta-Verhältnis	1,0	beta-Caryophyllen	14,6 %	Humulon : Cohumulon	75 : 24	Farnesen	unter 0,1 %	<p>Hallertauer Magnum</p> <p>Die Hochalphasorte "Hallertauer Magnum" ist eine vielversprechende Neuzüchtung des Hopfenforschungsinstituts in Hüll mit guten Resistenzeigenschaften, hohem Ertrag und guter Wüchsigkeit.</p>  <table border="1"> <tr> <td>Anbaugebiet: Hallertau</td> <td>Reife: spät</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Brauqualität: Bitterhopfen mit sehr hohem Bitterwert und guter Bitterqualität</td> </tr> <tr> <th colspan="4">Inhaltsstoffe</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Bitterstoffe</th> <th colspan="2">Aromastoffe</th> </tr> <tr> <td>alpha-Säuren</td> <td>14,0 %</td> <td>Gesamtöl in ml pro 100 g</td> <td>2,1</td> </tr> <tr> <td>beta-Säuren</td> <td>4,3 %</td> <td>alpha-Humulon</td> <td>36,0 %</td> </tr> <tr> <td>alpha/beta-Verhältnis</td> <td>2,9</td> <td>beta-Caryophyllen</td> <td>10,4 %</td> </tr> <tr> <td>Humulon : Cohumulon</td> <td>76 : 24</td> <td>Farnesen</td> <td>0,1 %</td> </tr> </table>	Anbaugebiet: Hallertau	Reife: spät		Brauqualität: Bitterhopfen mit sehr hohem Bitterwert und guter Bitterqualität	Inhaltsstoffe				Bitterstoffe		Aromastoffe		alpha-Säuren	14,0 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	2,1	beta-Säuren	4,3 %	alpha-Humulon	36,0 %	alpha/beta-Verhältnis	2,9	beta-Caryophyllen	10,4 %	Humulon : Cohumulon	76 : 24	Farnesen	0,1 %
Anbaugebiete: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Tettnang, Baden-Biiburg-Pfalz	Reife: mittelfrüh																																																								
	Brauqualität: traditioneller, hochfeiner Aromahopfen																																																								
Inhaltsstoffe																																																									
Bitterstoffe		Aromastoffe																																																							
alpha-Säuren	4,6 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	1,0																																																						
beta-Säuren	4,7 %	alpha-Humulon	55,1 %																																																						
alpha/beta-Verhältnis	1,0	beta-Caryophyllen	14,6 %																																																						
Humulon : Cohumulon	75 : 24	Farnesen	unter 0,1 %																																																						
Anbaugebiet: Hallertau	Reife: spät																																																								
	Brauqualität: Bitterhopfen mit sehr hohem Bitterwert und guter Bitterqualität																																																								
Inhaltsstoffe																																																									
Bitterstoffe		Aromastoffe																																																							
alpha-Säuren	14,0 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	2,1																																																						
beta-Säuren	4,3 %	alpha-Humulon	36,0 %																																																						
alpha/beta-Verhältnis	2,9	beta-Caryophyllen	10,4 %																																																						
Humulon : Cohumulon	76 : 24	Farnesen	0,1 %																																																						

Northern Brewer

Die Bitterstoffsorte "Northern Brewer" hat in 30 Jahren vor allem in der Hallertau eine große Anbaufläche erreicht, weil sie eine sehr gute Resistenz gegen die Welkekrankheit besitzt. Die Erträge sind in den letzten Jahren allerdings zurückgegangen.



Anbaugelände: Hallertau, Elbe-Saale, Hersbruck		Reife: mittelfrüh	
		Brauqualität: bewährter Bitterhopfen mit guter Bitterqualität	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	7,7 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	1,3
beta-Säuren	3,4 %	alpha-Humulon	30,7 %
alpha/beta-Verhältnis	2,3	beta-Caryophyllen	12,4 %
Humulon : Cohumulon	70 : 30	Farnesen	unter 0,1 %

Nugget

Die Hochalphasorte "Nugget" ist eine Zuchtsorte aus den USA. Sie ist eine frühwüchsige, ertragsreiche Sorte mit mittel bis hoher Krankheitsanfälligkeit.



Anbaugelände: Hallertau		Reife: spät	
		Brauqualität: Bitterhopfen	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	11,3 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	0,9
beta-Säuren	4,1 %	alpha-Humulon	38,3 %
alpha/beta-Verhältnis	2,8	beta-Caryophyllen	17,8 %
Humulon : Cohumulon	72 : 28	Farnesen	0,2 %

Perle

Die Aromasorte "Perle" stammt aus der Züchtung des Hopfenforschungsinstitutes in Hüll. Ihre große Beliebtheit bei den Hopfenplantzern verdankt die gesunde Sorte ihren guten Resistenzeigenschaften sowie dem hohen Ertrag.



Anbaugelände: Hallertau, Spalt, Hersbruck, Baden-Birg-Pfalz		Reife: mittelfrüh	
		Brauqualität: hervorragender Aromahopfen mit verbessertem Bitterwert und Bitterqualität	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	6,6 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	1,1
beta-Säuren	3,2 %	alpha-Humulon	35,0 %
alpha/beta-Verhältnis	2,1	beta-Caryophyllen	9,1 %
Humulon : Cohumulon	70 : 30	Farnesen	0

Spalter select

Die Aromasorte "Spalter select" ist eine vielversprechende Neuzüchtung des Hopfenforschungsinstitutes in Hüll mit guten Resistenzeigenschaften und hohem Ertrag. Sie ist wüchsig und anspruchlos.



Anbaugelände: Hallertau, Spalt		Reife: mittelfrüh	
		Brauqualität: hochfeiner Aromahopfen vom Typ des Spalt	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	5,0 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	0,7
beta-Säuren	3,9 %	alpha-Humulon	19,8 %
alpha/beta-Verhältnis	1,3	beta-Caryophyllen	9,8 %
Humulon : Cohumulon	78 : 22	Farnesen	19,5 %

Tettnanger

Die Aromasorte "Tettnanger" wird fast ausschließlich in Tettnang angebaut. Sie besitzt eine gesunde Wuchskraft und bringt gute Erträge. Die Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten ist mittel.



Anbaugelände: Tettnang, Baden-Birg-Pfalz		Reife: mittelfrüh	
		Brauqualität: traditioneller, hochfeiner Aromahopfen	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	4,6 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	0,8
beta-Säuren	4,4 %	alpha-Humulon	26,4 %
alpha/beta-Verhältnis	1,0	beta-Caryophyllen	10,8 %
Humulon : Cohumulon	73 : 27	Farnesen	16,8 %

Hallertauer Tradition

Die Aromasorte "Hallertauer Tradition" ist eine vielversprechende Neuzüchtung des Hopfenforschungsinstitutes in Hüll mit guten Resistenzeigenschaften und hohem Ertrag.



Anbaugelände: Hallertau		Reife: mittelfrüh	
		Brauqualität: hochfeiner Aromahopfen vom Typ des Hallertauer Mittelfrüh	
Inhaltsstoffe			
Bitterstoffe		Aromastoffe	
alpha-Säuren	6,0 %	Gesamtöl in ml pro 100 g	1,2
beta-Säuren	4,5 %	alpha-Humulon	48,4 %
alpha/beta-Verhältnis	1,4	beta-Caryophyllen	13,4 %
Humulon : Cohumulon	72 : 28	Farnesen	unter 0,1 %

1.5 Pharmakologische Untersuchungen

Die ersten pharmakologischen Untersuchungen wurden in den 30er Jahren dieses Jahrhunderts durchgeführt. Folgende Wirkungen werden dem Hopfen zugeschrieben: Sedierend, antibakteriell, antimykotisch, estrogen und spasmolytisch. Die Ergebnisse der Überprüfung der unterschiedlichen Wirkqualitäten sind teilweise widersprüchlich. Das könnte z. T. daran liegen, daß viele Untersuchungen mit verschiedenen Hopfenextrakten durchgeführt wurden, deren Zusammensetzung nicht angegeben ist. Unterschiede wurden auch in der Applikationsart, der Dosierung u.a. gemacht.

1.5.1 *In vitro* Untersuchungen

In vitro Untersuchungen ergaben folgende Effekte:

- Estrogene Wirkung eines Hopfenextraktes durch Bindung an Estrogen-Rezeptoren (alpha / beta), der Induktion der estrogenabhängigen alkalischen Phosphatase und einer Up-Regulation des Progesteron-Rezeptoren (Burdette et al., 2001;Liu et al., 2001)

- Antimikrobielle Effekte von Hopfen-Extrakten und Hopfenöl gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes*, sowie gegen den Pilz *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*; keine Aktivität gegenüber *Escherischia coli* (Langezaal, Chandra, and Scheffer, 1992;Larson et al., 1996)

- Schwache Interaktion mit neuronalen Benzodiazepin Rezeptoren eines Hopfen-Extraktes (Blattler and Schoch, 1994)

- Polyphenole aus der Hopfenbracteole (Hopfenzapfen ohne Lupulindrüse) inhibieren die Zellanheftung von *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*, sowie die Synthese von wasserunlöslichen Glucanen der Bakterien (Tagashira, 1997)
 - Antioxidative Eigenschaften von Hopfenbittersäuren durch Radikalfänger-Aktivität im DPPH-assay (Tagashira, 1995)
 - Antimikrobielle Effekte einer Kombination von Hopfenbittersäuren mit N-hexametaphosphat gegen *Escherichia coli* (Fukao, Sawada, and Ohta, 2000)
 - Bindung an Estrogen-Rezeptoren (alpha / beta) in Ishikawa Zellen und mit menschlichen Estrogen-Rezeptoren transfizierter Hefe des Flavonoids 8-Prenylnaringenin (Milligan et al., 2002)
 - Estrogene Effekte von 8-prenylnaringenin und 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin an MVLN Zellen (eine von MCF-7 Zellen abgeleitete Zelllinie) in Konzentrationen von 10^{-6} M bzw. 5×10^{-6} M (Zierau et al., 2002)
 - verschiedene Effekte von Xanthohumol:
 - antioxidative (Abfang von peroxy- und hydroxyl-Radikalen), anti-inflammatorische (Hemmung der Cyclooxygenase-1 und -2), anti-estrogene (Ishikawa Zellen), anti-proliferative (Inhibierung der humanen DNA Polymerase alpha) und anti-cancerogene Wirkung (Gerhaeuser et al., 2001;Heiss et al., 2001)
 - Inhibierung der Diacylglycerolacyltransferase in der Rattenleber (Tabata et al., 1997) und der mikrosomalen Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 (EROD assay)(Henderson et al., 2000);
 - Inhibierung der Knochen-Resorption im „pit formation assay“ (Tobe et al., 1997b)
 - verschiedene Effekte von Humulon: Inhibierung der Knochen-Resorption „pit formation assay“ (Tobe et al., 1997b)
-

Inhibition des Wachstums von monoblastischen Leukämie U937 Zellen (Honma et al., 1998)

Apoptose in leukämischen HL-60 Zellen (Tobe et al., 1997a)

Verminderung der Cyclooxygenase-2 Transkription (Yamamoto et al., 2000)

1.5.2 *In vivo* Untersuchungen im Tiermodell

In vivo Untersuchungen ergaben folgende Effekte:

- Die orale Gabe verschiedener Hopfenextrakte oder Lupulon bewirkte bei Ratten und Mäusen keine Sedierung. Die Muskelkoordination (Rotarod) wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Dosierungen zwischen 100 und 1000 mg/kg KG waren toxisch (Hänsel and Wagener, 1967).
- Die i.p. Gabe eines Ether-Hopfenextraktes an Mäusen führte zu einer Motilitätsminderung von 60 % im Lichtschrankkäfig. Die applizierte Menge entsprach einer Dosis von 200 mg Hopfen/ 20 g Maus (Bravo et al., 1974).
- Ein nicht näher definierter Hopfenextrakt führte bei Mäusen nach i.p. Gabe zu einer dosisabhängigen Senkung der Spontanmotilität (>250 mg/kg KG), einer Muskelrelaxation (>250 mg/kg KG) und in einer Dosis von 500 mg/kg KG zu einer Verlängerung der Pentobarbital-induzierten Schlafzeit. Ferner wurden eine Senkung der Körpertemperatur, antikonvulsive und antinozizeptive Effekte bei einer Dosis von 500 mg/kg KG beschrieben (Lee et al., 1993).
- Für reines 3-Methylbutenol wurde bei Ratten nach i.p. Gabe einer Dosis von 200 mg eine Motilitätsminderung um 50 % beobachtet (Wohlfart, Hansel, and Schmidt, 1983).

- Verschiedene Hopfenextrakte, hergestellt mit Ether, Methanol, Ethanol, Methylenchlorid, Isopropanol oder Hexan, sowie verschiedene Fraktionen (Hopfenöl und alpha- bzw. beta-Säuren) wurden auf estrogene Aktivität am Modell des Uterusgewichtes bei der juvenilen Maus getestet. In Dosierungen zwischen 0,003 und 3 mg/Tier (entsprechend 0,15 bis 150 mg/kg KG) zeigte keine der Zubereitungen eine estrogene Aktivität (Feneselau and Talalay, 1973).

- 8-Prenylnaringenin wirkte estrogen, es verursachte in wesentlich höherer Dosierung als 17- β -Estradiol eine Zunahme der Gefäßpermeabilität im Uterus kastrierter Mäuse und eine Zellvermehrung im Vaginalepithel kastrierter Mäuse (Milligan et al., 2002).

- Juvenile Ratten wurden mit Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMS-G) vorbehandelt bzw. mit PMS-G und Fraktionen aus einem acetonischen Humulus-Extrakt. Die Fraktionen wurden aus einem wässrigen Auszug des Extraktes gewonnen. Die Fraktionen hemmten in einer Dosierung von 20 bzw. 50 mg/Tier nach s.c. Injektion die PMS-G induzierte Gewichtszunahme der Ovarien der juvenilen Ratten. Auf die Ovargewichte von nicht mit PMS-G behandelten Ratten hatten die Fraktionen keine Effekte. Das Uterusgewicht wurde weder bei den vorbehandelten, noch bei den nicht vorbehandelten Tieren beeinflusst (Kumai and Okamoto, 1984).

- In einer Dosierung von 5 mg/Tier der gleichen Fraktionen wurde bei Serumgonadotropin vorbehandelten Ratten eine Senkung der Serum LH Spiegel, der Estradiol Spiegel, der Progesteronspiegel, der Thymidinkinasen Aktivität im Uterus und eine verminderte Ovulationsrate beobachtet (Kumai and Okamoto, 1992).

- Am isolierten Kaninchen- und Meerschweinchen-Darm sollen alkoholische Hopfenextrakte stark spasmolytische Wirkungen (wirksame Dosierung am isolierten Kaninchendarm 0,001 mL/mL Organbad) zeigen (Caujolle et al., 1969).

1.5.3 Toxikologische Daten

- Behandlung von Beagle Hunden über 13 Wochen mit präisomerisierten alpha-Säuren ergaben eine geringe Toxizität. Die Tiere erhielten oral eine Dosis von 50 bzw. 100 mg/kg KG pro Tag, weicher Stuhl und gelegentlich Erbrechen wurden als einzige klinische Befunde beobachtet, aber weder eine Beeinträchtigung der Körpergewichtszunahme noch des Futter- oder Wasserverbrauchs traten auf (Chappel, Smith, and Chagnon, 1998).
- Untersuchungen mit Lupulon deuten auf eine speziesspezifische Toxizität hin: Nach subakuter Behandlung über 12 bis 14 Tagen wurden bei Kaninchen 300 mg/kg und bei Affen 200 mg/kg/d, oral appliziert, ohne klinische Befunde vertragen. Als wesentlich empfindlicher erwiesen sich Meerschweinchen, bei denen eine DL50 von 130 mg/kg ermittelt wurde. Bei Ratten bzw. Mäusen wurde nach oraler Gabe eine DL50 von 1800 bzw. 1500 mg/kg KG gefunden (Chin and Anderson, 1950).
Andere Autoren fanden für Lupulon nach oraler Gabe niedrigere DL50 Werte von 100 mg/kg KG bei der Ratte und 525 mg/kg KG bei der Maus (Hänsel and Wagener, 1967).
- Die DL50 eines ethanolischen Extraktes nach oraler Gabe wurde näherungsweise mit 3500 mg/kg KG bei der Maus und 2700 mg/kg KG bei der Ratte angegeben (Hänsel and Wagener, 1967).

1.5.4 Humanpharmakologische Untersuchungen

- Nach 5 Kapseln mit 250 mg eines lipophilen Hopfenextraktes, der 50 mg alpha-Säuren, 40 mg beta-Säuren und 8 mg Hopfenöl enthielt, wurde von einzelnen Testpersonen lediglich über "leichte Benommenheit" am nächsten Morgen geklagt (Stocker, 1967).

- 10 Menschen erhielten oral 5 g Lupulon/Tag über einen Zeitraum bis zu 12 Wochen. Ein Mann brach die Behandlung wegen epigastrischer Beschwerden ab, eine Frau wegen Übelkeit und Erbrechen. Als Nebenwirkung wurden bei den übrigen Probanden nur in der Initialphase Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall beschrieben (Chin and Anderson, 1950).
- Die isolierten Bitterstoffe des Bieres wurden in einer Einzeldosis von 60 mg an 15 Testpersonen verabreicht. Es konnten keinerlei unerwünschte Wirkungen festgestellt werden (Stocker, 1967).

In der Literatur sind einige Studien mit Kombinationen aus Hopfen und anderen Pflanzen wie *Valeriana* und *Passiflora* beschrieben. Auf diese Untersuchungen wird hier nicht eingegangen, da die Bedeutung der Hopfen-Komponente in einer Kombination unklar ist.

1.5.5 Klinik

In der Klinik wurden einzelne Fälle von allergischen Reaktionen auf Hopfen beschrieben:

- Bei einem 28-jährigen Brauereiangestellten wurde eine Überempfindlichkeit auf beta-Myrcene aus Hopfen beobachtet, die sich in Form von Asthma, Rhinitis und Juckreiz äußerte (Newmark, 1978).
- Es wurde über den Fall einer durch Hopfenstaub ausgelösten Kontaktallergie berichtet. Der Patient entwickelte eine Konjunktivitis, Rhinitis, Bronchitis und eine Dermatitis im Gesichtsbereich (Raith and Jager, 1984).
- Bei einem 29-jährigen Patienten wurde eine Kontakt-Urtikaria an beiden Händen nach Arbeiten mit getrocknetem Hopfen beschrieben. (Estrada, 2002).

Bei den beschriebenen Fällen handelt es sich wahrscheinlich um eine IgE-vermittelte allergische Reaktion. Ein Hauptallergen könnte ein 10-kDa Peptid sein, das aus Extrakten von *Humulus japonicus* isoliert wurde (Park et al., 1999). Andere Autoren gehen davon aus, daß Myrcen aus frischem Hopfenöl für die Kontakt-Allergien verantwortlich ist. Durch die harten Haare der Hopfenpflanze kann aber auch eine mechanische Dermatose hervorgerufen werden (Estrada, 2002).

1.6 Monographie der Kommission E

Monographie der Kommission E	
<i>Lupuli strobulus</i>, Hopfenzapfen	
Datum der Bekanntmachung	1.11.1984
Veröffentlicht im Bundesanzeiger	5.12.1984
Korrektur: Veröffentlicht im Bundesanzeiger:	13.3.1990
Bestandteile:	
Hopfenzapfen, bestehend aus den getrockneten Fruchtständen von <i>Humulus lupulus</i> LINNÉ sowie deren Zubereitungen in wirksamer Dosierung.	
Die Droge enthält mindestens 0,35 Prozent (V/G) ätherisches Öl.	
Weitere Bestandteile sind alpha- und beta-Bittersäuren, 2-Methyl-3-buten-ol.	
Anwendungsgebiete:	
Befindensstörungen wie Unruhe und Angstzustände, Schlafstörungen.	
Gegenanzeigen:	
Keine bekannt.	
Nebenwirkungen:	
Keine bekannt.	
Wechselwirkungen:	
Keine bekannt.	
Dosierung:	
Soweit nicht anders verordnet: Einzelgabe der Droge 0,5 g.	
Art der Anwendung:	
Geschnittene Drogen, Drogenpulver oder Trockenextraktpulver für Aufgüsse oder Abkochungen oder andere Zubereitungen. Flüssige und feste Darreichungsformen zur innerlichen Anwendung.	
Hinweis:	
Kombinationen mit anderen sedativ wirkenden Drogen können sinnvoll sein.	
Wirkungen:	
Beruhigend, schlaffördernd.	

Die Aufbereitungsmonographie „Lupuli strobulus“ der Kommission E wurde am 5.12.1984 im Bundesanzeiger veröffentlicht und am 13.3.1990 berichtigt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Hopfen und Hopfenzubereitungen werden bei Befindlichkeitsstörungen wie Unruhe, Angstzuständen und Schlafstörungen eingesetzt. Die auf dem Markt erhältlichen Präparate sind bis auf 1 Präparat insgesamt Kombinationspräparate mit anderen Sedativa, in den meisten Fällen mit Extrakten aus *Valeriana*, gelegentlich auch mit *Passiflora* (Rote Liste, 2002). Als Hopfen-Komponente werden Hopfen-Extrakte verwendet. In Arzneimitteln werden meistens sogenannte „Heißwasser-Extrakte“ eingesetzt, die ein Abfallprodukt der Brauereiindustrie darstellen und keine Hopfen-Bittersäuren enthalten.

Klinische Untersuchungen zu den beanspruchten Indikationsgebieten liegen zu solchen Kombinationen vor, während die Wirkung von Hopfen oder Hopfen-Extrakten nur in geringem Umfang untersucht wurde. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der bisherigen tierexperimentellen Untersuchungen widersprüchlich, die Frage nach den wertbestimmenden Inhaltsstoffen ungeklärt. Daraus ergibt sich, daß der Wirkmechanismus nicht bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb verschiedene Zubereitungen aus *Humulus lupulus* im Tierexperiment vergleichend auf sedierende Effekte geprüft werden. Anhand verschiedener ethanolischer und CO₂-Extrakte sollen der Einfluß der Hopfensorte und des Extraktionsmittels auf die biologische Wirkung untersucht werden. Da wertbestimmende Inhaltsstoffe nicht bekannt sind, ist es erforderlich, auf sedierende Effekte im Tiermodell zu prüfen.

Durch die Verwendung von Rezeptor-Antagonisten in diesen Tiermodellen soll versucht werden, Hinweise auf den Wirkmechanismus von *Humulus lupulus* zu erhalten. Die Testung von Fraktionen soll Hinweise auf die wertbestimmenden Inhaltsstoffe oder -gruppen ergeben.

Da über toxische und estrogene Effekte von Hopfenextrakten im Tierexperiment berichtet wurde, soll die Verträglichkeit wirksamer Extrakte in subakuten Versuchen ermittelt werden, darüberhinaus soll auf estrogene Effekte untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Extraktmaterial

38 verschiedene Hopfenextrakte standen für die pharmakologischen Untersuchungen zur Verfügung:

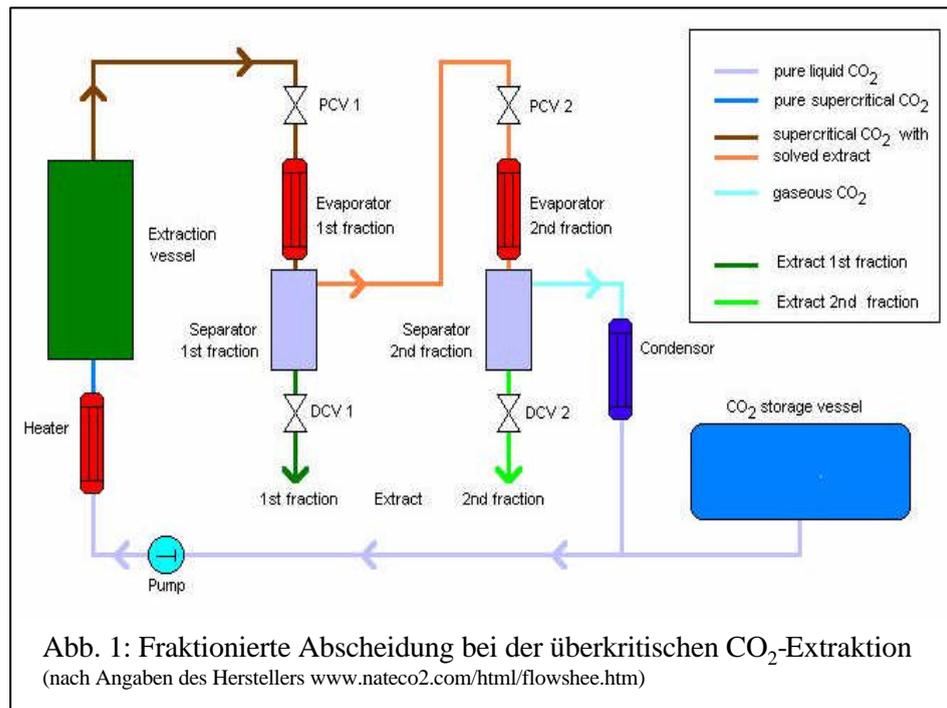
Erntejahr	Sorte	Name	Art
1994	Nugget	Nugget´94	CO ₂
1994	Brewer´s Gold	Brewer´s Gold´94	CO ₂
1997	SpalterSelect	Spalter Select´97 Apr´98	CO ₂
1997	Hersbrucker Spät	HHE´97 Juni´98	CO ₂
1997	Perle	HPE´97 Juni´98	CO ₂
1997	Perle	HPE´97 Juni´98 ölarm	CO ₂
1997	Perle	HPE´97 Juni´98 ölreich	CO ₂
1998	17 % Northern Brewer 58 % Magnum 25 % Brewer´s Gold	97 031 CO ₂	CO ₂
1998		97 021 Bitterstoffphase	EtOH
1998		97 021 Gerbstoffextrakt	EtOH
1998	Nugget	Nugget´98 Nov´98	CO ₂
1998	Magnum	HHM´98 Okt´98	CO ₂
1998	Northern Brewer	Northern Brewer´98 Nov´98	CO ₂
1998	Northern Brewer	Northern Brewer´98 Dez´98	CO ₂
1998	Hersbrucker Spät	HHE´98 Dez´98	CO ₂
1998	Perle	HPE´98 März´99	CO ₂
1998	Perle	HPE´98 März´99/2	CO ₂
1998	Perle	HPE´98 März´99 ölarm	CO ₂
1998	Perle	HPE´98 März´99 ölreich	CO ₂
1998	Magnum	HHM´98 März´99	CO ₂
1998	Nugget	Nugget´98 Dez´98	CO ₂
1999	Magnum	HHM´99 normal	CO ₂
1999	Magnum	HHM´99 ölarm	CO ₂
1999	Magnum	HHM´99 ölreich	CO ₂
1999	Perle	HPE´99 normal	CO ₂

1999	Perle	HPE '99 ölarm	CO ₂
1999	Perle	HPE '99 ölreich	CO ₂
1999	Hersbrucker Spät	HHE '99 normal	CO ₂
1999	Hersbrucker Spät	HHE '99 ölarm	CO ₂
1999	Hersbrucker Spät	HHE '99 ölreich	CO ₂
1999	Perle	Öl 1	CO ₂
1999	Perle	Öl 2	CO ₂
1999	Mix	Lupulonextrakt	CO ₂
1999	Mix	Lupulonextrakt entölt [LUP]	CO ₂
1999	Mix	Humulonextrakt [HUM]	CO ₂
2000	Mix	Hopfenöl rein [Ölrein]	CO ₂
2000	Mix	Weichharz-spezifisch [Weich]	CO ₂
2000	Mix	Beta-spezifisch [Beta]	CO ₂

Anbaugbiet war die Hallertau/München. Direkt nach der Ernte wurde das Rohmaterial auf Darren bei 65 °C Heißluft ca. fünf bis sechs Stunden getrocknet bis der Feuchtigkeitsgehalt von etwa 80 bis 85 % auf 12 % abgenommen hatte. Danach wurde das Material bis zur Extraktion kühl bei Temperaturen von 0 bis 5 °C gelagert. Alle Extrakte wurden von der Firma NATECO₂ GmbH & Co. KG, Wolnzach hergestellt. Als Extraktionsmittel diente Ethanol 90 % oder überkritisches CO₂.

Der mit 90 %-igem Ethanol hergestellte Extrakt wurde eingeengt und dann erneut mit Wasser extrahiert. Der in Wasser lösliche, hydrophile Teil ist der „Extr.Humuli lupuli 97 021 Gerbstoffextrakt“, den lipophilen, nicht in Wasser löslichen Anteil enthält der Extrakt „Extr.Humuli lupuli 97 021 Bitterstoffphase“. Der Gerbstoffextrakt, ein sog. „Heißwasserextrakt“, enthält alle polaren Substanzen, so z.B. die Polyphenole. Eine Ausnahme stellt das unpolare Xanthohumol dar, daß in Wasser nicht löslich ist und im unlöslichen Rest, der Bitterstoffphase, verbleibt. Die Bitterstoffphase enthält die gesamten Bittersäuren und deren Oxidationsprodukte.

Die CO₂-Extrakte wurden nach folgendem Schema hergestellt (Abb. 1). Das Verfahren ist nach DIN EN ISO 9001/14001 zertifiziert. Reines Kohlendioxid wird durch eine Pumpe hochverdichtet. Danach wird es erhitzt und geht dadurch in den überkritischen Zustand



über. Der Extraktionskessel (extraction vessel) wird mit Hopfen-Rohmaterial gefüllt. Das Kohlendioxid löst nun die Inhaltsstoffe aus dem Rohmaterial heraus. Überkritisches CO₂ besitzt lipophile Eigenschaften, so daß hydrophile Bestandteile nicht oder nur in Spuren aus dem Rohmaterial herausgelöst werden. Wie Abb. 2 zeigt, besitzt Hopfenöl und -harz unterschiedliche Löslichkeiten in flüssigem CO₂. Das Öl löst sich schon bei einem Druck von

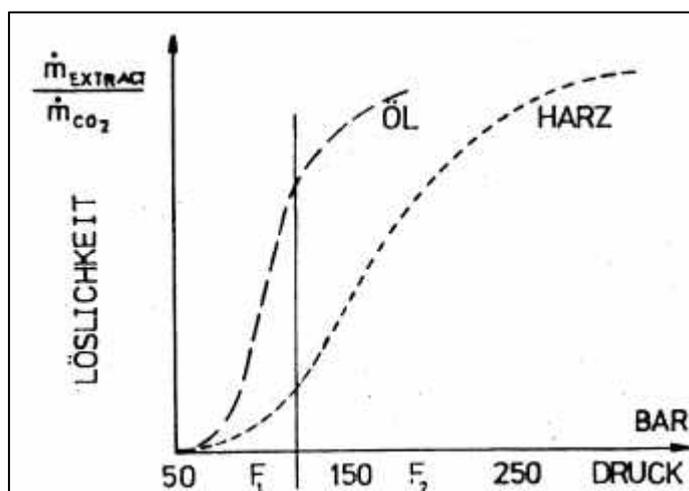


Abb. 2: Löslichkeit von Hopfenöl und -harz als Funktion vom Druck des CO₂: $\frac{m_{\text{Extrakt}}}{m_{\text{CO}_2}}$ ist das Massenverhältnis des gewonnenen Öl und Harz, bezogen auf die Lösemittelmenge (nach Forster et al. Versuche zur Hopfung von Bieren mit Bitterstoff- und Aromafraction, die bei der CO₂-Hopfenextraktion anfallen, Brauwissenschaft 9/1989, S.356)

etwa 100 bar, der für das Harz optimale Druck liegt bei 200 bis 250 bar. Durch diese Eigenschaft ist eine Fraktionierung möglich. Zunächst wird der Druck durch das Ventil PCV 1 (pressure control valve) auf etwa 100 bis 120 bar gesenkt und die Temperatur im Verdampfer (evaporator 1st fraction) reguliert. Dadurch fällt das Harz aus und wird von dem noch gelösten Öl getrennt (Separator 1st fraction). In einem nach-

geschaltetem Ventil und Verdampfer (PCV 2/evaporator 2) wird der Druck auf 60 bis 70 bar abgesenkt, bei dem das Öl ausfällt und als zweite Fraktion gewonnen wird. Wie in Abb. 2 zu erkennen ist, überschneiden sich die beiden Löslichkeitskurven, deshalb ist eine totale Trennung in ausschließlich Öl bzw. Harz nicht möglich. Am Ende wird das gasförmige CO₂ gereinigt, in einem Kondensator verflüssigt und kann erneut für die Extraktion verwendet werden. Die Fraktionen können durch die Auslaßventile (DCV 1/2) entnommen werden.

Die drei Extrakte aus der Mischung 17 % Northern Brewer / 58 % Magnum / 25 % Brewer's Gold sind von der Firma Finzelberg mit folgendem Befund untersucht worden (siehe Tab. 2):

Analyse	Ethanolextrakt 97021 (Bitterstoffphase)	Gerbstoffextrakt 97021 (Gerbstoffphase)	CO ₂ -Extrakt 97031
Droge	Strobuli Humuli lupuli	Strobuli Humuli lupuli	Strobuli Humuli lupuli
Auszugsmittel	Ethanol 90% (m/m)	Ethanol 90% (m/m)	überkritisches CO ₂
DEVnativ	3,8:1	9,1:1	4,5:1
Aussehen	Intensiv grünfarbener, homogener Spissumextrakt	Rotbrauner, homogener Spissumextrakt	Gelbbrauner, leicht grisseliger Spissumextrakt
Trockenrückstand (% m/m) (2h 100-105°C)	94	75	91
Cu-Gehalt (ppm) mittels AAS	354	40	40
Xanthohumol (%) (HPLC)	2,26	0,06	0,05
Flavonoidgehalt (%)	0,7 *)	0,76	0,65
Gehalt (%) Humulon/ Lupulon gemäß DAC	ca. 67	nicht nachweisbar	78,5
Tab. 2	*) Wert unzuverlässig aufgrund der giftgrünen Färbung der Meßlösung		

Die übrigen Extrakte wurden von der Firma NATECO₂ analysiert:

Tab. 3 Analysen	Humulon Gew.-[%]	Lupulon Gew.-[%]	Hopfenöl [ml/100g]	Weichharz [%] "geschätzt"
Spalter Select '97 Apr '98	41,8	29,4	-/-	-/-
HHE '97 Juni '98	30,9	38,6	-/-	-/-
HPE '97 Juni '98	48,9	23,3	-/-	-/-
HPE '97 Juni '98 ölarm	49,6	23,3	-/-	-/-
HPE '97 Juni '98 ölreich	30,1	18,8	-/-	-/-
Nugget '98 Nov '98	55,1	21,4	-/-	-/-
HHM '98 Okt '98	52,1	23,4	-/-	-/-
Northern Brewer '98 Nov '98	46,2	27,3	-/-	-/-
Northern Brewer '98 Dez '98	45,5	26,9	-/-	-/-
HHE '98 Dez '98	22,8	40	-/-	-/-
HPE '98 März '99	42,1	25,1	-/-	-/-
HPE '98 März '99/2	43,2	24,5	-/-	-/-
HPE '98 März '99 ölarm	44,5	25	-/-	-/-
HPE '98 März '99 ölreich	33,1	28,1	-/-	-/-
HHM '98 März '99	50,7	22	-/-	-/-
Nugget '98 Dez '98	52,6	21,2	-/-	-/-

HHM '99 normal	46,3	27,2	7,0	-/-
HHM '99 ölarm	48,5	28,1	4,3	-/-
HHM '99 ölreich	29,9	21,1	38,0	-/-
HPE '99 normal	36,0	30,2	10,0	-/-
HPE '99 ölarm	39,2	31,8	5,5	-/-
HPE '99 ölreich	22,1	21,3	48,0	-/-
HHE '99 normal	15,7	49,7	5,0	-/-
HHE '99 ölarm	15,2	54,8	3,0	-/-
HHE '99 ölreich	10,8	41,2	23,0	-/-
Ö1	17,0	12,0	62,0	-/-
Ö2	9,0	6,2	83,0	-/-
Lupulonextrakt	0,0	59,7	4,5	-/-
Lupulonextrakt entölt [LUP]	0,0	66,5	0,9	-/-
Humulonextrakt [HUM]	84,4	1,6	0,3	-/-
Hopfenöl rein [Ölrein]	0,1	0,6	99,0	0
Weichharz-spezifisch [Weich]	0,4	9,3	8,7	80
Beta-spezifisch [Beta]	0,3	63,0	0,6	35

In Tabelle 4 sind die Anteile der einzelnen Humulone und Lupulone am Gesamtextrakt dargestellt:

Tab. 4 Analysen	Humulone [Gew.-%]		Lupulone [Gew.-%]	
	Co-Humulon	n- + Ad-Humulon	Co-Lupulon	n- + Ad-Lupulon
HHM '99 normal	12,4	33,9	12,1	15,1
HHM '99 ölarm	12,9	35,6	12,5	15,6
HHM '99 ölreich	8,9	21,0	9,9	11,2
HPE '99 normal	11,7	24,3	16,2	14,0
HPE '99 ölarm	12,6	26,6	16,9	14,9
HPE '99 ölreich	7,9	14,2	12,0	9,3
HHE '99 normal	3,2	12,5	18,1	31,6
HHE '99 ölarm	3,1	12,1	20,2	34,6
HHE '99 ölreich	2,3	8,5	16,3	24,9
Öl 1	5,8	11,2	6,5	5,5
Öl 2	3,4	5,6	3,5	2,7
Lupulonextrakt	0,0	0,0	45,0	14,7
Lupulonextrakt entölt [LUP]	0,0	0,0	50,0	16,5
Humulonextrakt [HUM]	26,2	58,2	1,1	0,5
Hopfenöl rein [Ölrein]	0,0	0,1	0,3	0,3
Weichharz-spezifisch [Weich]	0,2	0,2	3,7	5,6
Beta-spezifisch [Beta]	0,0	0,3	35,8	27,2

2.2 Versuchstiere

Die pharmakologischen Untersuchungen wurden mit Ratten und Mäusen unterschiedlicher Zuchtlinien und Züchter durchgeführt:

- weibliche NMRI Mäuse, Charles River, Sulzfeld
- männliche BL/6 Mäuse, Firma Harlan Winkelmann, Borcheln
- männliche Sprague Dawley „SD“ Ratten, Firma Harlan Winkelmann, Borcheln
- weibliche Sprague Dawley „SD“ Ratten, Janvier, Frankreich

Nach Ankunft wurden die Tiere in klimatisierten Räumen mit einer Durchschnittstemperatur von $24\pm 1^\circ\text{C}$ bei einem 12 Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die weiblichen Mäuse wurden in 5er oder 6er Gruppen aufgeteilt und in Makrolonkäfigen der Größe III untergebracht. Ratten und männliche Mäuse wurden einzeln gehalten in einem Käfig der Größe III bzw. I. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser (Haltungsdiät Altromin 1324, Firma Altromin, Lage-Lippe oder estrogenfreie Haltungsdiät, Firma Ssniff, Soest). Die Durchführung der Versuche wurde genehmigt durch den Regierungspräsidenten von Münster (A10/2002).

2.3 Elektronik

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Gerät zur Messung der Bewegungsaktivität entwickelt. Die Entwicklung und alle anfallenden Lötarbeiten wurden selbst durchgeführt.

- Infrarot-Lichtschranken, Bausatz Nr. 191710-88, Conrad Electronic Hirschau
- Sammellinsen mit IR-Filter, Nr. 146439-88, Conrad Electronic Hirschau
- LED-Fassung mit Optik, Nr.185310-88, Conrad Electronic Hirschau
- Pulldown-Widerstände $100\text{k}\Omega$, Nr.404160-88, Conrad Electronic Hirschau
- PC mit 486er Prozessor
- MS-DOS und Quickbasic, Microsoft
- Digitale I/O-Karte PIO24 II, Conrad Electronic, BMC-Messsysteme
- Netzgerät FPS 2/4 A, Nr. 510459-88, Conrad Electronic Hirschau
- Aufputz Kabelleisten zur Konstruktion der Halterung für die Sende-/Empfangsdioden,
Werkstatt Institut für Pharmakologie
- Feinlötkolben „Multitip“ 25W/230V, ERSA
- Elektronik-Lötdraht Typ L-Sn 60 PBCu2 (DIN EN 29454-1)

2.4 Allgemeine Laborgeräte

Waagen:	Mettler AE 160 (Mettler-Waagen GmbH, Gießen) Mettler PM 4600 (Mettler-Waagen GmbH, Gießen) Kern 440-47 (Kern & Sohn GmbH, Balingen)
Pipetten:	Eppendorf-Reference 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 500 μ l-2500 μ l, 500 μ l-5000 μ l Eppendorf-Multipette (Eppendorf AG, Hamburg)
Ultraturrax:	Ultra Turrax TP 18/10 (Jahne & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen)
Ultraschall:	Sonicator celldisruptor Modell W 375 (Heat Systems Ultrasonics, Inc. Plainville, NY, USA)
Magnetrührer:	Ikamag RCT basic, Ika Color SQUID (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen)
pH-Meter:	Microprozessor pH-Meter pH 530 (Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim)
Zentrifuge:	Labofuge GL, Heraeus, Osterode Centrifuge 5415 C (Eppendorf AG, Hamburg)
γ -Zähler:	Cobra II auto-gamma counter, Canbarra Packard, Dreieich
Thermometer:	DIGImed H22S (TSE GmbH, Bad Homburg)
Uhren:	Tisch-Stoppuhr 312/4810 (Junghans Uhren GmbH, Schramberg)
Videokamera:	Panasonic S-VHS NV-S 99E (Matsushita Electric Industrial Co, Ltd., Japan)
Videorekorder:	JVC Timelaps BR-S 920 Panasonic S-VHS NV-HS900
Monitor:	Panasonic TX-14 S1 TC (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Japan)

2.5 Verbrauchsmaterialien

Schlundsonden:	Spülkanüle Gr.1, Olive C (MEDCO, Coesfeld)
Spritzen:	Omnifix-F 1ml SOLO (B. Braun, Melsungen) 5 ml, Luer (AMEFA, Limburg)
Kanülen:	Neolus Hub Color 27Gx $\frac{3}{4}$, 20-4, Nr.20, 0,4x20mm (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien)
Reagiergefäße:	Sarstedt, Nümbrecht
Blutentnahme:	S-Monovette [®] 9ml KE, (Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen:	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen:	30ml Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht
Urinbecher:	Urinbecher SV 125 m.Deckel steril, Böttger, Bodenmais

2.6 Reagenzien für pharmakologische Testmodelle

Albumin, bovine	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Chlorpromazin HCl	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Coffein	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Diethylether >99%	Roth, Karlsruhe
Diazepam (Valium [®])	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
17a-Ethinylestradiol-3-methylether (Mestranol)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Haloperidol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Ketamin HCl 10%	SANOFI-CEVA, Düsseldorf
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Sulpirid (Dogmatil [®])	Synthelabo, Berlin
Tween 80 p.a.	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

PEG 400 p.a.

Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

NAT 8539 (Lecithin)

Nattermann Phospholipid GmbH, Köln

Reines Pflanzenöl

Goldhand Vertriebsgesellschaft mbH, Düsseldorf

3 METHODEN

3.1 Pharmakologische Untersuchungen

3.1.1 Allgemeines

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens 5 Tage an die Haltungsbedingungen adaptiert. Um externe Einflüsse auf das Versuchsergebnis zu minimieren, wurden die Versuchsbedingungen so konstant wie möglich gehalten. Darüberhinaus unterliegen viele Verhaltensparameter wie die Aktivität der Tiere oder ihr Explorationsverhalten zirkadianen Schwankungen, deshalb wurden vergleichende Untersuchungen zwischen den Extrakten zur gleichen Tageszeit durchgeführt.

Die Versuche mit dem Motilitätsmeßsystem wurden im normalen Haltungsraum der Tiere durchgeführt, alle anderen Versuche fanden in einem weitgehend schallisolierten Raum mit künstlicher Beleuchtung statt. Falls eine andere Beleuchtung, wie z.B. Rotlicht gewählt wurde, ist es beim Versuch direkt vermerkt. Die Tiere wurden in ihrem normalen Käfig transportiert und konnten sich vor Beginn der Experimente mindestens 1 Stunde akklimatisieren.

Zu jedem Experiment wurde ein Versuchsprotokoll mit der Tiernummer, dem Gewicht, der Versuchsgruppe und den Meßparametern aufgestellt. Vor Beginn wurden die Tiernummern randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt. Mäuse aus Gruppentierhaltung erhielten zur Identifikation Farb-Markierungen am Schwanz.

Bei Verhaltensmodellen wurde der Versuch per Videokamera in Abwesenheit des Experimentators aufgezeichnet und erst später ausgewertet. Dadurch wurden Störeinflüsse auf das Verhalten durch den Beobachter ausgeschlossen und es lassen sich pro Versuch wesentlich mehr Meßparameter auswerten.

Alle Apparaturen wurden nach jedem Tier mit einem feuchten Lappen gründlich gereinigt um eine Beeinflussung durch Geruchsspuren zu verhindern.

3.1.2 Applikationstechniken

orale Applikation (p.o.)

Die Maus bzw. Ratte wurde auf ein Käfiggitter oder eine Tischplatte gesetzt. Dann wurde zwischen Daumen und Zeigefinger eine Hautfalte am Nacken gebildet und das Tier umgedreht. Bei Mäusen wurde zusätzlich der Schwanz mit dem kleinen Finger fixiert. Dann wurde die Schlundsonde vorsichtig in den Ösophagus eingeführt, die entsprechende Menge appliziert und die Sonde anschließend schnell wieder herausgezogen. Bei Mäusen wurde die Sonde ca. 1 cm tief eingeführt, bei Ratten ca. 2 cm. Die Mäusesonden waren gerade, die Rattensonden im untersten Teil um ca. 45° abgewinkelt.

Intraperitoneale Injektion (i.p.)

Die Maus wurde wie bei der oralen Applikation in die Hand genommen und so gehalten, daß der Kopf leicht nach unten zeigte, damit bei der folgenden Injektion keine Organe getroffen wurden. Dann wurde die Kanüle im 45° Winkel durch die Bauchdecke geschoben und die erforderliche Menge in den Bauchraum appliziert.

3.1.3 Herstellung der Prüflösungen

Um Extrakte oral applizieren zu können, mußten sie möglichst in einer wäßrigen Lösung vorliegen. Da es sich bei den hier verwendeten Extrakten fast ausschließlich um feste oder halb feste, lipophile CO₂ Extrakte handelte, wurde versucht, Öl in Wasser Emulsionen herzustellen. Dazu wurden im Laufe der Arbeit verschiedene Emulgatoren und Herstellungsarten getestet und das Verfahren optimiert. Die verwendete Herstellungsart ist beim Versuch vermerkt. Die Prüflösungen wurden in einem Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht (KG) verabreicht. Alle Lösungen wurden erst unmittelbar vor der Applikation hergestellt.

Lösung in Milch unter Erwärmen

Der Extrakt wurde eingewogen, auf der Wärmeplatte bei ca. 45°C geschmolzen und mit angewärmter Milch auf das Endvolumen aufgefüllt. Dabei bildete sich eine gelb-grün gefärbte Emulsion, die auch nach dem Abkühlen stabil blieb. Nachteil ist, daß man den Extrakt erwärmen muß.

Lösung in Milch mit Ultraschall

Der Extrakt wurde eingewogen und 10 ml Milch dazu pipettiert. Danach wurde das Gemisch ca. 30 s mit dem Sonicator behandelt. Diese Methode funktioniert nur bei flüssigen, ölreichen Extrakten.

Suspension in Wasser mit Ultraschall

Der Extrakt wurde eingewogen und 10 ml Wasser dazu pipettiert. Danach wurde das Gemisch ca. 30 s mit dem Sonicator behandelt. Diese Methode wurde nur bei dem ethanoli-schen Extrakt 97021 angewendet. Vorteil ist, daß kein Emulgator benötigt wird. Nachteil ist, daß sich keine echte Lösung, sondern nur eine Suspension ergibt.

Lösung mit PEG 400 und Ultraschall

Der Extrakt wurde eingewogen, dazu wurden 1,5 ml PEG 400 pipettiert und mit Leitungswasser auf 10 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde mit dem Sonicator ca. 30 s behandelt, wobei sich eine homogene Emulsion ergab.

Lösung in Leitungswasser

Der Extrakt wurde eingewogen, mit 10 ml Wasser versetzt und so lange geschüttelt, bis sich der Extrakt gelöst hatte. Die Methode funktioniert nur bei dem Extrakt Humuli lupuli 97 021 Gerbstoffextrakt.

Lösung mit Tween 80 und Ultraschall

Der Extrakt wurde eingewogen, dazu wurden 250 µl Tween 80 pipettiert und mit Leitungswasser auf 10 ml aufgefüllt. Das entspricht einer Tween 80 End-Konzentration von 2,5 %. Das Gemisch wurde mit dem Sonicator ca. 30 s behandelt, so daß sich eine homogene Emulsion ergab. Normalerweise wurden wie oben angegeben 2,5 % Tween verwendet, bei

manchen Versuchen wurde die Tween 80 Menge auf 2,0 % oder 0,5 % reduziert. Wieviel Emulgator verwendet wurde, ist bei dem jeweiligen Versuch vermerkt.

Lösung mit Lecithin und Ultraschall

Der Extrakt wurde eingewogen, dazu wurden 150µl Lecithin pipettiert und mit Leitungswasser auf 10 ml aufgefüllt. Das entspricht einer Lecithin Konzentration von 1,5%. Das Gemisch wurde mit dem Sonicator ca. 30 s behandelt, bis sich eine homogene Emulsion ergab. In einigen Versuchen mußte der Lecithinanteil auf 2% erhöht werden, um eine stabile Emulsion zu erhalten. Die Methode eignet sich nur für flüssige, ölige Extrakte.

Lösung mit BSA und Ultraschall

Die Extrakt Dosis und 100 mg bovines Serumalbumin (BSA) wurden eingewogen, 10 ml Leitungswasser dazugegeben, um eine 1% BSA End-Konzentration zu erreichen. Das Gemisch wurde mit dem Sonicator ca. 30 s behandelt, bis sich eine homogene Emulsion ergab.

Lösung mit Lecithin, BSA und Ultraschall

Der Extrakt und 100 mg bovines Serumalbumin (BSA) wurden eingewogen, 300µl Lecithin dazu pipettiert und mit Leitungswasser auf 10 ml aufgefüllt. Das entspricht einer End-Konzentration von 1% BSA und 3% Lecithin. Das Gemisch wurde mit dem Sonicator ca. 30 s behandelt, bis sich eine homogene Emulsion ergab.

Lösung mit Tween 80 und UltraTurrax

Der Extrakt wurde eingewogen und mit 250 µl Tween 80 versetzt. Das Gemisch wurde mit dem Ultraturax ca. 15 s lang zu einer homogenen Masse vermengt und nach und nach Leitungswasser zu einem ein Endvolumen von 10 ml eingearbeitet. Das entspricht einer Tween 80 End-Konzentration von 2,5 %. Je nach Extrakt konnte die Emulgatormenge auf 0,5 % End-Konzentration gesenkt werden. Falls nicht anders angegeben, betrug die Endverdünnung 2,5 %.

Lösung mit Öl, Lecithin und UltraTurrax

Der Extrakt wurde eingewogen und mit 1000 µl Öl und 100 µl Lecithin versetzt. Das Gemisch wurde mit dem Ultraturax ca. 15 s lang zu einer homogenen Masse vermengt und nach und nach Leitungswasser bis auf ein Endvolumen von 10 ml eingearbeitet. Das entspricht einer End-Konzentration von 10% Öl bzw. 1% Lecithin. Dabei ergibt sich je nach Extrakt eine milchig-gelbe oder grünliche Emulsion.

Folgende Substanzen wurden zur intraperitonealen Injektion in physiologischer (0,9%) Kochsalzlösung gelöst bzw. bei Ampullen aus Fertigarzneimitteln verdünnt. Die Dosierung bezieht sich auf mg/kg Körpergewicht/10 ml.

Chlorpromazin HCl, Coffein p.a., Diazepam (Valium®) Amp., Haloperidol, Ketamin HCl 10% Stechamp., Sulpirid (Dogmatil®) Amp.

Falls nicht anders vermerkt, wurden sonstige Testsubstanzen bei der p.o. Applikation auf die gleiche Art und Weise wie die Extrakte gelöst.

Bei jedem Versuch wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt. Sie erhielt das reine Lösungsmittel.

3.1.4 Pharmakologische Testmodelle

3.1.4.1 Open Field



In vielen Abwandlungen des Open Field Tests wird die Spontanmotilität von Mäusen und Ratten gemessen, um zentral stimulierende oder sedierende Eigenschaften von Substanzen zu bewerten. Allerdings hängt die Grundaktivität von einer Vielzahl von Umgebungsfaktoren ab, z.B. der Tageszeit, der Anzahl der Tiere pro

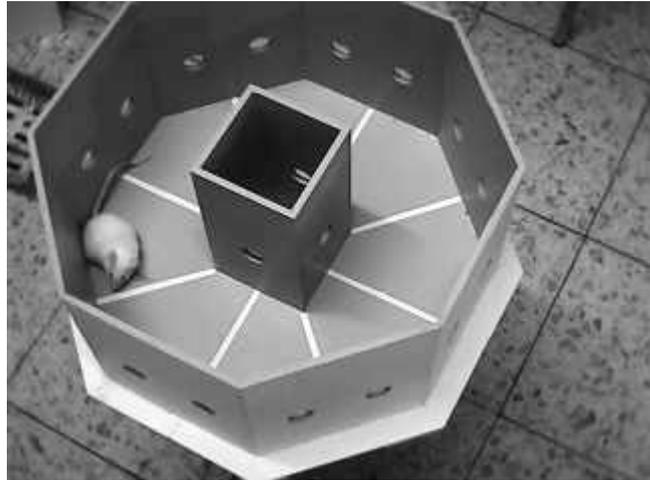
Käfig, der Vertrautheit mit dem Test sowie dem Geräuschpegel, der Lichtintensität und der Umgebungs-Temperatur. Die Testapparatur für Ratten bestand aus einer kreisrunden Fläche mit einem Durchmesser von 100 cm, umgeben von einer 50 cm hohen Wand. Die graue Bodenfläche war durch Linien in 19 Areale aufgeteilt.

Im Versuch wurde den Ratten die Testsubstanz oral appliziert. Nach 1 h (eine davon abweichende Zeit ist beim Versuch vermerkt) wurde das Tier in die Mitte des Open Fields gesetzt und mit einer Videokamera 5 min lang gefilmt.

Als Maß für die Spontanmotilität wurde danach die Anzahl der Linien gezählt, die mit allen 4 Pfoten übertreten wurden. Darüberhinaus wurde die Häufigkeit des "rearings" (Aufrichten auf die Hinterpfoten) und in einigen Versuchen die Anzahl der Boli (Defäkation) erfaßt.

3.1.4.2 Open Field nach M.-L. Weischer

Für Mäuse wurde das abgewandelte Open Field nach M.-L. Weischer verwendet. Es ähnelt dem oben beschriebenen Open Field, jedoch besitzt es einen achteckigen Grundriß mit einem Durchmesser von 28 cm und einem zusätzlichen Pfeiler in der Mitte von 8 x 8 cm. Der Boden ist durch Linien in 8 gleichgroße Segmente aufgeteilt. Die



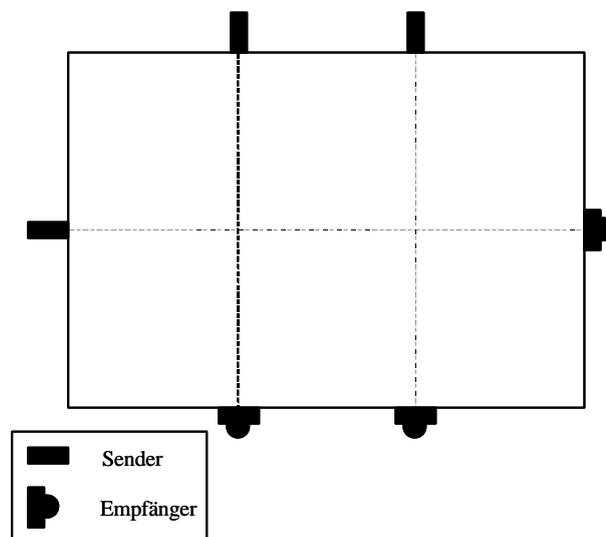
Außenwand ist 17 cm hoch und besitzt 16 Löcher mit 2 cm Durchmesser. Der innere Pfeiler besitzt 4 Löcher. Den Mäusen wurde die Testsubstanz oral appliziert und 1 h später wurden sie in das Open Field gesetzt. Der Versuch wurde mit der Videokamera 5 min lang aufgezeichnet.

Danach wurde die Anzahl der Linien gezählt, die mit allen 4 Pfoten übertreten wurden, die Anzahl der “rearings” und die Anzahl der Durchblicke durch die inneren und äußeren Löcher. Die Anzahl der Linienübertritte wird dabei als Maß für die Spontanmotilität und die Anzahl der Durchblicke als Maß für das Neugierde- oder Erkundungsverhalten gewertet.

3.1.4.3 Motilitätsmeßsystem

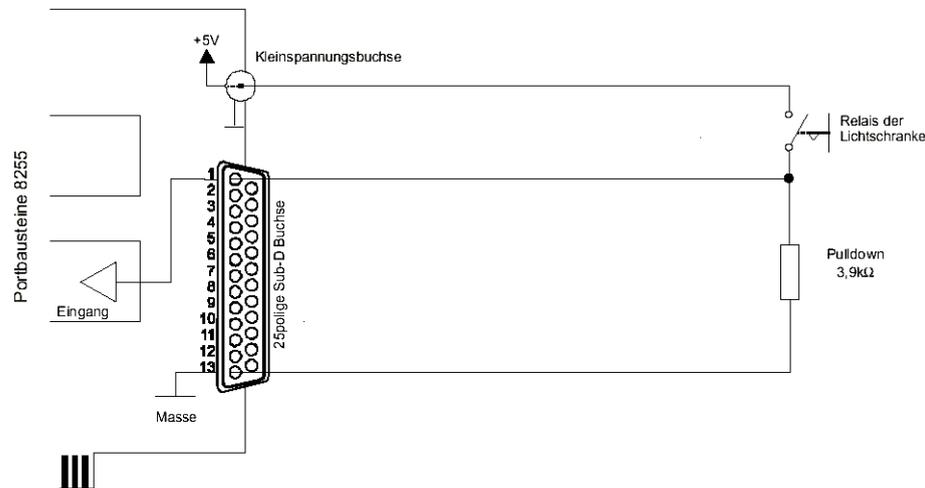
Die im Open Field gemessene Aktivität bezieht sich nur auf eine kurze Zeitdauer von 5 Minuten und ist, da der Effekt in einer neuen Umgebung gemessen wird, von anxio-genen oder anxiolytischen Effekten überlagert. Wenn darüber hinaus der Beginn und die Dauer einer zentralen Aktivität unbekannt sind, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen, wenn man zum falschen Zeitpunkt mißt. Um diese Fehler zu vermeiden, wurde ein Computer gestütztes System entwickelt, das die Aktivität von Ratten und Mäusen kontinuierlich und automatisch in ihren normalen Haltungskäfigen messen kann. Die Aktivitätsmessung beruht auf Lichtschranken, die im Infrarotbereich arbeiten. Die typische Wellenlänge der

Sendediode beträgt 950 nm und ist damit für die Tiere unsichtbar. Unterbricht nun die Maus oder Ratte den zwischen Sender und Empfänger gespannten Strahl wird am Empfänger ein Kontakt geschlossen. Um die Lichtschranke störungssicher gegenüber künstlicher Beleuchtung, Menschen oder anderen Körpern, die wärmebedingt Infrarotstrahlung abgeben, zu machen, strahlt die Sendediode nicht im Dauerbetrieb sondern pulsmoduliert. Der Empfänger ist so eingestellt, daß er nur auf diese Pulsfrequenz reagiert. Da die normalen Haltungskäfige aus Makrolon für IR-Strahlung durchlässig sind, wurden nach folgendem Schema je 3 Lichtschranken pro Käfig der Größe III angeordnet.



Um die Schaltzustände der Lichtschranken per Computer erfassen zu können, wurden die Ausgänge der Empfänger mit den Eingängen einer Schnittstellenkarte nach dem folgenden Schaltbild verbunden. Es ist exemplarisch für eine Lichtschranke dargestellt:

Anschluß einer Lichtschranke an die digitale I/O-Karte



Da prinzipiell nur 2 Schaltzustände möglich sind, nämlich “Ein” wenn der Strahl nicht unterbrochen ist, oder “Aus” wenn der Strahl unterbrochen ist, reicht eine digitale I/O (input/output) Karte zur Messung aus. Die verwendete PIO-II Karte besitzt 24 Kanäle zur Erfassung von TTL-Signalen, d.h. liegt am Eingang eine Spannung von 5 V an, gibt sie bei der Abfrage eine digitale 1 zurück, liegt die Spannung darunter, eine digitale 0. Die benötigte Spannung von 5 V wird einer Kleinspannungsbuchse entnommen, die in die Karte integriert ist. Der Plus-Pol der Kleinspannungsbuchse ist mit den Eingängen der Empfänger-Relais verbunden. Die Ausgänge der Relais sind auf jeweils einen Eingang der PIO-II Karte geschaltet (25polige Sub-D Buchse). Da die Kartenelektronik aus empfindlichen CMOS-Bausteinen aufgebaut ist, sind die Eingänge sehr hochohmig. Das hat zur Folge, daß selbst bei geöffnetem Relais (digital 0) die Eingänge zwischen 0 und 1 wechseln können, da sich im Kupferkabel zwischen Relais und Karte noch Restladung befindet. Deshalb sind an die Eingänge zusätzlich 3,9 k Ω Pulldown-Widerstände angeschlossen, die überschüssige Ladung nach Masse abführen.

Um die Zustände an allen Eingängen gleichzeitig erfassen und speichern zu können, wurde ein Programm in Quickbasic entwickelt. Die Karte besitzt drei mit A, B und C bezeichnete 8Bit-Ports, die als Ein- oder Ausgänge programmiert werden können. Hier werden sie als Eingänge genutzt und die Werte nacheinander ausgelesen. Aus der 8Bit Information werden die einzelnen Bits durch eine logische “AND” Operation extrahiert. Eine 1 Bit Information

entspricht dem Zustand einer Lichtschranke. Der Wert wird in den Speicher geschrieben. Danach werden erneut die Werte der 3 Ports ausgelesen und mit den Werten im Speicher verglichen. Beträgt der Wert im Speicher 0 und der aktuelle Wert 1, wird der Zähler der entsprechenden Lichtschranke um 1 erhöht. Ein Übergang von 0 nach 1 entspricht dem Vorgang "Maus betritt die Lichtschranke". Übergänge von 0 nach 0 "Maus befindet sich außerhalb der Lichtschranke", 1 nach 1 "Maus befindet sich in der Lichtschranke" und 1 nach 0 "Maus verläßt die Lichtschranke" werden deshalb nicht gezählt. Danach wird der Wert im Speicher mit dem aktuellen Wert überschrieben. In 5 min Intervallen werden die Zählerstände für die jeweiligen Käfige addiert, am Bildschirm angezeigt und in eine Datei gespeichert. Alle Zähler werden auf Null zurückgesetzt und der nächste 5 min Zyklus beginnt.

CLS	"Bildschirm löschen"
TIMER ON: PRINT TIMES\$	"Startzeit anzeigen"
OPEN "c:\dos\export.dat" FOR OUTPUT AS #1	"Exportdatei festlegen"
OUT &H217, 155	"Initialisierung: Alle Ports Eingang"
20 d% = INP(&H210)	"Einlesen Port A"
IF (d% AND 1) > 0 THEN k1% = 1	"Zustand Lichtschranke 1"
IF (k1% = 1 AND t1% = 0) THEN a1 = a1 + 1	"Vergleich mit Speicherwert"
t1% = k1%	"Speicherwert aktualisieren"
k1% = 0	"Rücksetzen des aktuellen Wertes"
IF (d% AND 2) > 0 THEN k2% = 1	"Lichtschranke 2..."
IF (k2% = 1 AND t2% = 0) THEN a2 = a2 + 1	
t2% = k2%	
k2% = 0	
IF (d% AND 4) > 0 THEN k3% = 1	
IF (k3% = 1 AND t3% = 0) THEN a3 = a3 + 1	
t3% = k3%	
k3% = 0	
IF (d% AND 8) > 0 THEN k4% = 1	
IF (k4% = 1 AND t4% = 0) THEN a4 = a4 + 1	
t4% = k4%	
k4% = 0	
IF (d% AND 16) > 0 THEN k5% = 1	
IF (k5% = 1 AND t5% = 0) THEN a5 = a5 + 1	
t5% = k5%	
k5% = 0	
IF (d% AND 32) > 0 THEN k6% = 1	
IF (k6% = 1 AND t6% = 0) THEN a6 = a6 + 1	
t6% = k6%	
k6% = 0	

```

IF (d% AND 64) > 0 THEN k7% = 1
IF (k7% = 1 AND t7% = 0) THEN a7 = a7 + 1
t7% = k7%
k7% = 0
IF (d% AND 128) > 0 THEN k8% = 1
IF (k8% = 1 AND t8% = 0) THEN a8 = a8 + 1
t8% = k8%
k8% = 0

```

```

d% = INP(&H211)                                "Einlesen Port B"
IF (d% AND 1) > 0 THEN k9% = 1
IF (k9% = 1 AND t9% = 0) THEN b1 = b1 + 1
t9% = k9%
k9% = 0
IF (d% AND 2) > 0 THEN k10% = 1
IF (k10% = 1 AND t10% = 0) THEN b2 = b2 + 1
t10% = k10%
k10% = 0
IF (d% AND 4) > 0 THEN k11% = 1
IF (k11% = 1 AND t11% = 0) THEN b3 = b3 + 1
t11% = k11%
k11% = 0
IF (d% AND 8) > 0 THEN k12% = 1
IF (k12% = 1 AND t12% = 0) THEN b4 = b4 + 1
t12% = k12%
k12% = 0
IF (d% AND 16) > 0 THEN k13% = 1
IF (k13% = 1 AND t13% = 0) THEN b5 = b5 + 1
t13% = k13%
k13% = 0
IF (d% AND 32) > 0 THEN k14% = 1
IF (k14% = 1 AND t14% = 0) THEN b6 = b6 + 1
t14% = k14%
k14% = 0
IF (d% AND 64) > 0 THEN k15% = 1
IF (k15% = 1 AND t15% = 0) THEN b7 = b7 + 1
t15% = k15%
k15% = 0
IF (d% AND 128) > 0 THEN k16% = 1
IF (k16% = 1 AND t16% = 0) THEN b8 = b8 + 1
t16% = k16%
k16% = 0

```

```

d% = INP(&H212)                                "Einlesen Port C"
IF (d% AND 1) > 0 THEN k17% = 1
IF (k17% = 1 AND t17% = 0) THEN c1 = c1 + 1

```

```
t17% = k17%
k17% = 0
IF (d% AND 2) > 0 THEN k18% = 1
IF (k18% = 1 AND t18% = 0) THEN c2 = c2 + 1
t18% = k18%
k18% = 0
IF (d% AND 4) > 0 THEN k19% = 1
IF (k19% = 1 AND t19% = 0) THEN c3 = c3 + 1
t19% = k19%
k19% = 0
IF (d% AND 8) > 0 THEN k20% = 1
IF (k20% = 1 AND t20% = 0) THEN c4 = c4 + 1
t20% = k20%
k20% = 0
IF (d% AND 16) > 0 THEN k21% = 1
IF (k21% = 1 AND t21% = 0) THEN c5 = c5 + 1
t21% = k21%
k21% = 0
IF (d% AND 32) > 0 THEN k22% = 1
IF (k22% = 1 AND t22% = 0) THEN c6 = c6 + 1
t22% = k22%
k22% = 0
IF (d% AND 64) > 0 THEN k23% = 1
IF (k23% = 1 AND t23% = 0) THEN c7 = c7 + 1
t23% = k23%
k23% = 0
IF (d% AND 128) > 0 THEN k24% = 1
IF (k24% = 1 AND t24% = 0) THEN c8 = c8 + 1
t24% = k24%
k24% = 0
n = n + 1

FOR w = 1 TO 350                                "Warteschleife"
NEXT w

IF n = 86570 GOTO 1000                            "5 min Intervall"
IF INKEY$ = CHR$(27) THEN GOTO 2000 ELSE GOTO 20 "Abbruch"

1000 z1 = b2 + b3 + b4                            "Addition Käfigweise"
z2 = a7 + a8 + b1
z3 = a4 + a5 + a6
z4 = a1 + a2 + a3
z5 = b5 + b6 + b7
z6 = b8 + c1 + c2
z7 = c6 + c7 + c8
z8 = c5 + c4 + c3

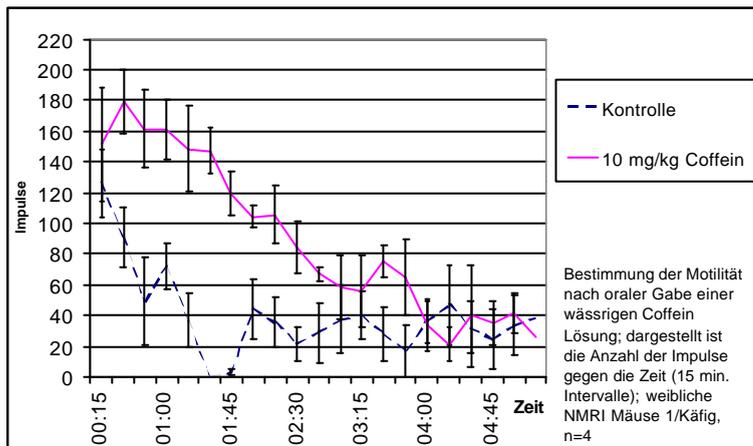
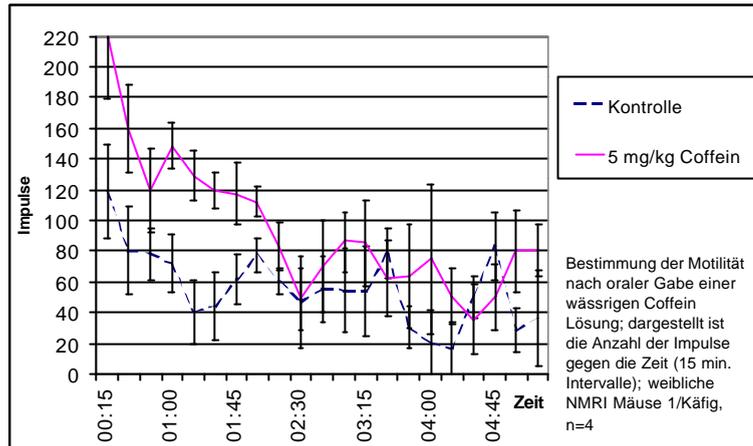
PRINT TIME$; z1; z2; z3; z4; z5; z6; z7; z8      "Druck auf Bildschirm"
```

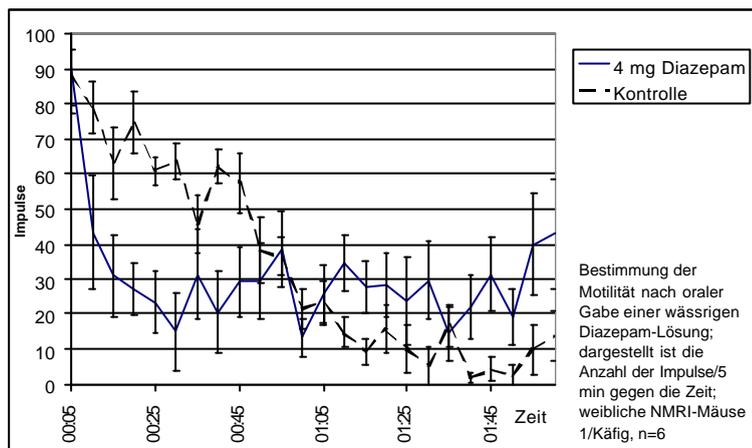
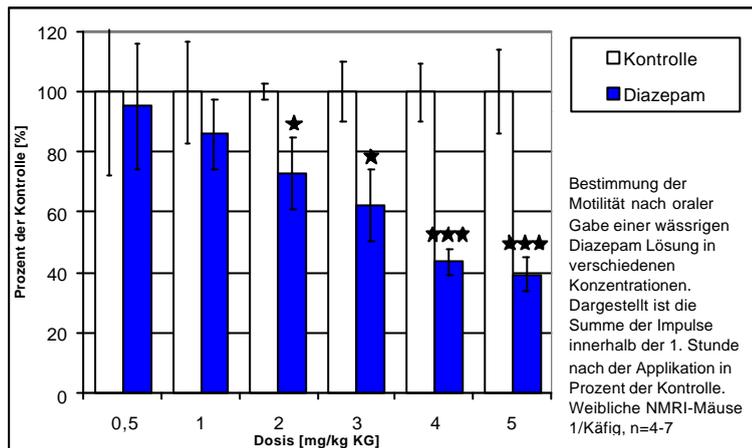
PRINT #1, TIMES\$, z1; z2; z3; z4; z5; z6; z7; z8 "Druck in Datei"

a1 = 0: a2 = 0: a3 = 0: a4 = 0: a5 = 0: a6 = 0: a7 = 0: a8 = 0: b1 = 0: b2 = 0: b3 = 0: b4 = 0:
b5 = 0: b6 = 0: b7 = 0: b8 = 0: c1 = 0: c2 = 0: c3 = 0: c4 = 0: c5 = 0: c6 = 0: c7 = 0: c8 = 0:
n = 0 "Rücksetzen der Zähler"

GOTO 20
2000 END

Um die so erhaltenen Ergebnisse interpretieren zu können, wurden zuerst Standardsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Coffein wurde als Beispiel für eine Substanz mit stimulierenden Eigenschaften verwendet. Es wurde in einer wässrigen Lösung in Konzentrationen von 5 und 10 mg/kg KG oral appliziert. Dargestellt ist die Anzahl der gemessenen Impulse in 15 Minuten Intervallen. Die stimulierende Wirkung war nach Gabe von 10 mg/kg KG länger und ausgeprägter als nach Gabe der niedrigeren Dosis.





Diazepam wurde oral in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mg/kg KG gegeben, um zu prüfen, wie eine sedierend wirkende Substanz die Aktivität der Mäuse in den Lichtschrankenkäfigen beeinflusst und um Vergleichswerte für die eigenen Untersuchungen mit Hopfenzubereitungen zu erhalten. In der oberen Abb. sind die relativen Abnahmen der Motilität nach den unterschiedlichen Diazepam-Dosierungen dargestellt, in der unteren Abbildung ist exemplarisch

der Verlauf der Motilität nach einer Dosis von 4 mg/kg KG in 5 Minuten Intervallen dargestellt.

Ein Tier reagierte nach der Gabe von 1 mg/kg KG mit einer Motilitätssteigerung und wurde deshalb aus der Mittelwertsberechnung ausgeschlossen.

3.1.4.4 Testung auf eine Narkoseverlängerung

Der Test wird verwendet, um Hinweise auf die ZNS-Aktivität von Substanzen zu erhalten. Hypnotika, Sedativa und Tranquillantien, aber auch Antidepressiva verlängern die Narkotika induzierte Schlafzeit (Vogel, 2002). Bestimmt wird die Schlafzeit als Differenz zwischen dem Erlöschen und dem Wiedererlangen des Aufstellreflexes. Für den Test wurden weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht zwischen 22 und 35 g verwendet. Falls Tiere

zweimal verwendet wurden, lag zwischen den Versuchen eine Zeitspanne von mindestens 14 Tagen. Die Prüflösungen wurden eine halbe oder eine Stunde vor der Narkose oral appliziert. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurden sie vorsichtig auf den Rücken gedreht. Die Zeitdauer bis zum Wiederaufwachen (Berühren des Bodens mit allen 4 Pfoten) wurde als Schlafzeit gewertet. Um die Verlängerung der Schlafzeit durch metabolische Interaktionen auszuschließen, wurden zwei verschiedene Narkotika verwendet:

1) Ketamin

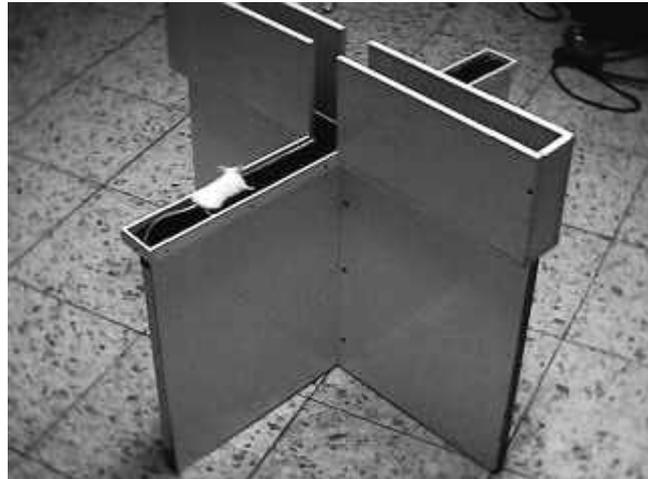
Ketamin-HCl zeichnet sich durch einen schnellen Wirkungseintritt und eine kurze Halbwertszeit von $t_{1/2} = 10-15$ min beim Mensch aus (Martindale, 1999). Es wird über die Leber metabolisiert und nach i.p. Applikation bei der Maus erhält man eine gute Reproduzierbarkeit der Schlafzeit. Die Dosis betrug 150 mg/kg KG gelöst in 10 ml NaCl. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 1,30 ml Ketamin 10% mit 8,70 ml NaCl 0,9% verdünnt.

2) Diethylether

Ether löst sich hauptsächlich physikalisch im Blut und wird danach pulmonal eliminiert. Für den Versuch wurden in ein 5 l Gefäß mit Deckel und einem Durchmesser von 20 cm 3,5 ml Ether pipettiert und 1 min lang verdampfen lassen. Dann wurden 6 Mäuse in das Gefäß gesetzt und darauf geachtet, daß alle in einer Ebene liegen. Nach 2 min wurde das Gefäß geleert, die Mäuse auf einzelne Käfige verteilt und auf den Rücken gedreht. Die Zeit bis zum Wiederaufwachen (Berühren des Bodens mit allen 4 Pfoten) wurde als Schlafzeit gewertet. Die Methode besitzt eine geringe Reproduzierbarkeit und gestattet deshalb nur qualitative Aussagen.

3.1.4.5 Testung auf anxiolytische Aktivität (Elevated Plus-Maze)

Der Test wurde zur Erfassung von anxiolytischen und anxiogenen Substanzen vorgestellt (Pellow et al., 1985). Das Elevated Plus-Maze besteht aus zwei offenen und zwei durch Wände geschützten Armen, die durch ihre Anordnung ein "Plus" ergeben. Es wurden weibliche Wistar-Ratten und weibliche NMRI-Mäuse verwendet. Die

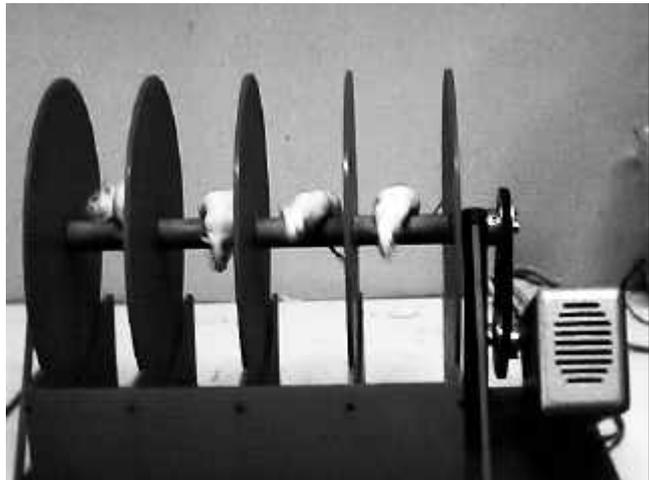


Versuchstiere waren alle "naive to the test", da man die Ergebnisse nur bei identischer Erfahrung mit dem Modell untereinander vergleichen kann. Das Rattenmodell besaß eine Höhe von 50 cm, eine Armlänge von 40 cm und eine Breite von 10 cm. Die Höhe des Mäusemodells betrug 40 cm, die Armlänge 30 cm und die Breite 5 cm. Die offenen Arme besaßen zusätzlich einen 1 cm hohen Rand. Die Lauffläche der Arme beider Modelle wurde mit schwarzem Textilband geklebt.

30 Minuten bzw. 60 Minuten vor dem Test wurde den Tieren die Prüflösung oral appliziert. Als Positivkontrolle diente Diazepam in einer Konzentration von 1 oder 2 mg/kg KG. Dann wurden die Tiere in die Mitte des Modells mit Blick auf einen geschützten Arm gesetzt und 5 Minuten mit der Videokamera gefilmt. Danach wurde die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme mit allen vier Pfoten und die auf den offenen Armen verbrachte Zeit ermittelt. Anxiolytische Substanzen vermindern die Angst und erhöhen deshalb die Zeit auf den offenen Armen. Anxiogene Substanzen haben den umgekehrten Effekt.

3.1.4.6 Testung auf Muskelrelaxation und Muskelkoordination

Der Rotarod Test dient der Untersuchung von Substanzen mit Einfluß auf die Muskelkoordination [Vogel HG, 1997]. Es werden jedoch auch muskelrelaxierende Effekte mit erfaßt. Die Testapparatur besteht aus einem hölzernen Stab von 3 cm Durchmesser, der sich mit 3,5 U/min dreht. Der Stab befindet sich 20 cm über dem Boden



und ist durch 5 Scheiben in 4 Bereiche aufgeteilt, so daß an 4 Tieren gleichzeitig getestet werden kann. Verwendet wurden weibliche NMRI Mäuse mit einem Gewicht zwischen 20 und 30 g. Geprüft wurde, ob sich die behandelten Tiere 1 min lang auf dem rotierenden Stab halten konnten oder nicht. Nur Tiere, die sich in einem Vortest 1 min lang halten konnten, wurden verwendet. Die Prüfsubstanzen wurden den Tieren oral appliziert. Als Positivkontrolle wurde Diazepam in einer Dosierung von 1 mg/kg KG mitgeführt. Nach 1, 3 oder 6 h wurden die Tiere auf das Rota Rod gesetzt und der prozentuale Anteil der Tiere, die vom Rota Rod fielen, ermittelt.

3.1.4.7 Körper- und Organgewichtsbestimmung

Der Einfluß wiederholter, 1x täglicher Applikation einer Prüflösung auf die Körper- und Organgewichtsentwicklung wurde an weiblichen NMRI Mäusen, an männlichen SD- und an ovariectomierten Ratten untersucht (OECD Guideline 407). Die Versuchslänge betrug 14 oder 21 Tage. Nimmt das Körpergewicht der Versuchstiere im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv weniger stark zu oder sogar ab, deutet dies im allgemeinen auf einen toxischen Effekt der Testsubstanz hin. Sind die Organgewichte im Vergleich zur Kontrolle verändert, kann das ebenfalls auf toxische Effekte hindeuten. Die Lösungen wurden morgens oral appliziert, mit einer Ausnahme. Das abweichende Vorgehen ist beim Versuch vermerkt. Die

Kontrollgruppe erhielt die gleichen Lösungsvermittler wie die Verumgruppe ohne die Prüfsubstanz, um eventuelle Einflüsse des Lösungsvermittlers zu minimieren. Die Tiere wurden täglich auf Verhaltensanomalien untersucht, gewogen und das Gewicht protokolliert. Gestorbene Tiere wurden in das Versuchsprotokoll eingetragen. Bei der Versuchsauflösung wurden Hypophyse, Leber, Niere, Milz, Nebennieren, Thymus, Schilddrüse und je nach Geschlecht und soweit vorhanden Uterus, Ovarien, Hoden, Samenblase und Prostata freipräpariert, von Bindegewebe befreit und gewogen.

3.1.4.8 Prüfung auf estrogene Wirkung

Um zu überprüfen, ob ein Testextrakt eine estrogene Wirkung besitzt, wurde weiblichen, kastrierten Ratten der Extrakt 14 oder 21 Tage lang, 1x täglich morgens oral appliziert. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe mit 5 µg/kg KG Mestranol behandelt. Die Ratten wurden entweder selbst ovariectomiert oder vom Züchter kastriert bestellt. Im ersten Fall besaßen die Tiere zum Zeitpunkt der Kastration ein Gewicht zwischen 160 und 170 g. 10 Tage später wurde mit der Behandlung begonnen. Nach einer erfolgreichen Ovariectomie nehmen die Tiere schnell zu, deshalb wurden alle Tiere, die zu diesem Zeitpunkt nicht mindestens 230 g wogen, nicht in die Behandlung einbezogen. Das Uterusgewicht kastrierter Tiere nimmt unter der Zufuhr estrogener Substanzen zu, während die Körpergewichtszunahme sinkt. Nach Tötung der Tiere wurde der Uterus freipräpariert und gewogen.

3.1.4.9 Beeinflussung der Körpertemperatur

Viele Substanzen mit Wirkung auf das ZNS verändern die Körpertemperatur durch Verstellen des Sollwertes im Hypothalamus. Wenn eine Substanz die Körpertemperatur verändert, ergeben sich aus Beginn und Dauer des Effektes Hinweise auf Eintritt und Dauer der Wirkung. Meßgröße war die rektale Körpertemperatur bei weiblichen NMRI Mäusen. Sie wurde basal, 1 und 2 h nach oraler Applikation der Prüfsubstanzen gemessen. Es wurde ein digitales Thermometer mit Rektalsonde verwendet, die 2,5 cm weit eingeführt wurde.

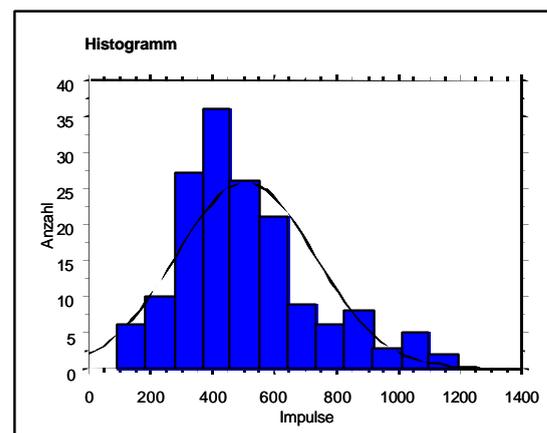
3.2 Statistische Auswertung

Für alle Versuche wurden aus den gewonnenen Meßdaten verschiedene Kenngrößen ermittelt. Die in den Abbildungen eingetragenen Werte stellen alle den arithmetischen Mittelwert dar, die Fehlerbalken den Standardfehler.

1) **Arithmetischer Mittelwert:** Wurde berechnet, indem die Summe aller Werte durch die Anzahl der Werte dividiert wurde. Dabei ist n die Anzahl der Meßwerte.

2) **Standardfehler (SE bzw SEM):** Wurde berechnet, indem die Standardabweichung durch die Wurzel der Anzahl der Werte geteilt wurde

Um festzustellen, ob sich die Mittelwerte zweier Gruppen, z.B. Kontroll- und Verumgruppe statistisch signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein ungepaarter, 2-seitiger T-Test durchgeführt. Der Test setzt voraus, daß die Stichproben aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen werden. Deshalb wurde für das Motilitätsmeßsystem aus mehreren Versuchen ein Histogramm aufgestellt.



Auf der Abzisse ist die Anzahl der Impulse innerhalb 1 h nach Versuchsbeginn von Kontrollmäusen dargestellt, auf der Ordinate die Häufigkeit im entsprechenden Intervall. Es wurden die Werte von $n=159$ Mäusen ausgewertet. Man sieht, daß die Motilität der Mäuse annähernd normalverteilt ist. Die aufgestellte Nullhypothese H_0 war, daß sich die Mittelwerte nicht unterscheiden. Getestet wurde auf dem 5%- Niveau. Sobald der vom Test zurückgegebene p-Wert kleiner als 0,05 war, wurde die Nullhypothese verworfen und angenommen, daß die Mittelwerte der Gruppen verschieden sind.

Zur Kennzeichnung auf dem 5%-, 1%-, 0,1%-Niveau signifikanter Befunde wurde die dreistufige Sternsymbolik benutzt. Wurden 3 oder mehr Gruppen miteinander verglichen, wurde eine ANOVA one-way Analyse mit anschließendem post-hoc Test nach Student-

Newman-Keuls oder Bonferroni durchgeführt. Durch die ANOVA Analyse erhält man eine Aussage, ob überhaupt Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, der post-hoc Test gibt Auskunft darüber, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestehen. Bei der Darstellung

$P > 0,05$	(ohne Symbol)
$P < 0,05$	★
$P < 0,01$	★★
$P < 0,001$	★★★

wurde die gleiche Sternsymbolik wie beim T-Test verwendet. Bei der statistischen Auswertung der Organgewichte nach wiederholter Applikation der Prüflösungen (Kapitel 4.1.3) wurde zusätzlich der post-hoc Test nach Fisher-PLSD durchgeführt, wenn Gewichtsunterschiede im Student-Newman-Keuls Test nicht signifikant waren. Der Fisher-PLSD Test zeigt auch geringere Unterschiede als signifikant an. Die Wahrscheinlichkeit einen Fehler der 1. Art zu begehen, d.h. einen Unterschied festzustellen, obwohl in Wirklichkeit keiner vorhanden ist, ist jedoch größer.

4 ERGEBNISSE

4.1 Pharmakologische Untersuchungen

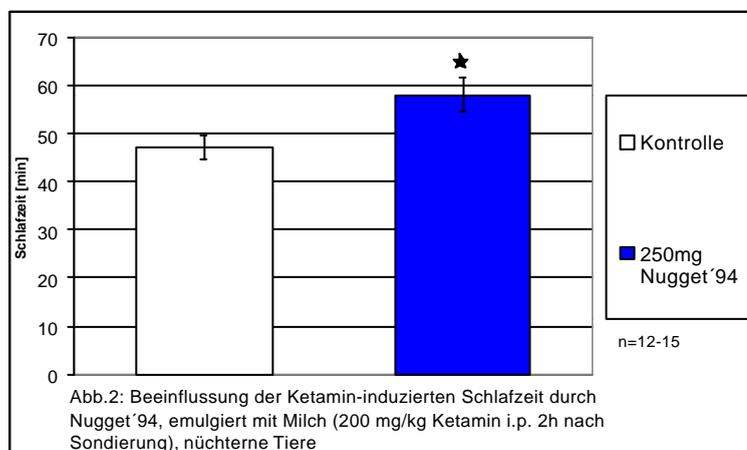
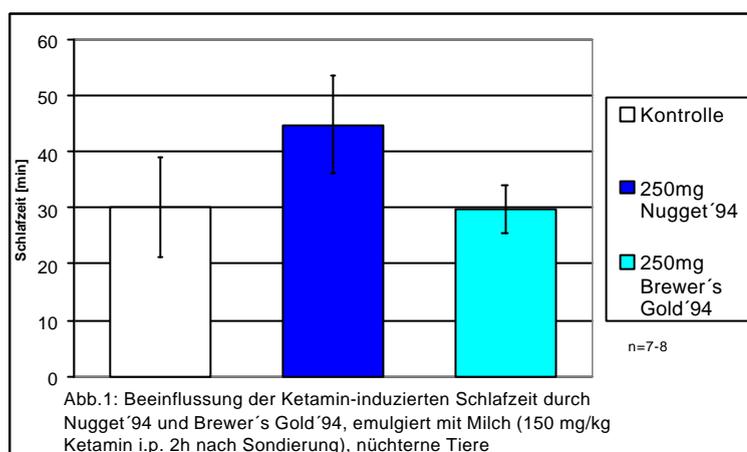
4.1.1 Testung auf Narkoseverlängerung

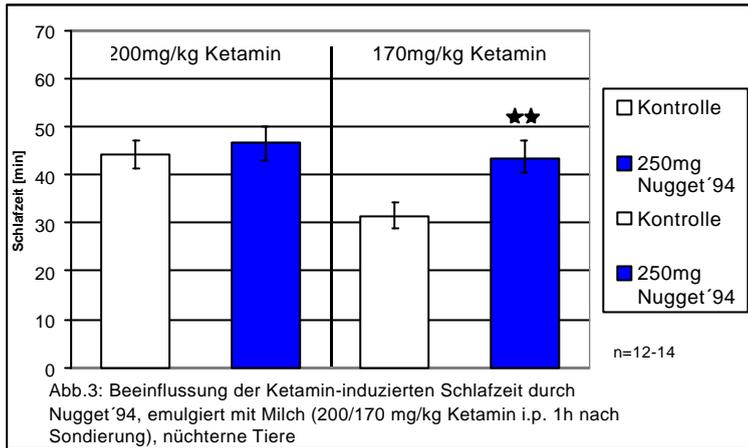
4.1.1.1 Ketaminnarkose

Hopfen-Extrakte Nugget '94 und Brewer's Gold '94:

Die Extrakte waren eine freundliche Leihgabe von Herrn Dr. Pauli und lagerten seit der Lieferung in der original verschlossenen Dose bei -20°C . Sie waren zum Zeitpunkt des Versuches ca. 5 Jahre alt. Nach dem Verfahren "Lösung in Milch unter Erwärmen"

wurden sie emulgiert und in einer Dosis von 250 mg/kg KG oral appliziert. 2 h später wurden die Tiere mit 150 mg/kg KG Ketamin-HCl i.p. narkotisiert. Wie Abb. 1 zeigt, ist der Unterschied zwischen den mit Hopfenextrakt behandelten Tieren und der Kontrolle zwar nicht signifikant, durchschnittlich wird die Schlafzeit jedoch durch den Extrakt um 14 Minuten verlängert. In einem weiteren Versuch (Abb. 2) sollte geklärt werden, ob bei nüchternen Tieren das Test-Ergebnis für den Extrakt Nugget '94 einheitlicher ausfällt. Außerdem wurde die Ketamindosis auf 200mg/kg KG erhöht, da im vorhergehenden Versuch bei allen Gruppen einige Tiere nicht eingeschlafen waren. Alle übrigen Versuchsbedin-

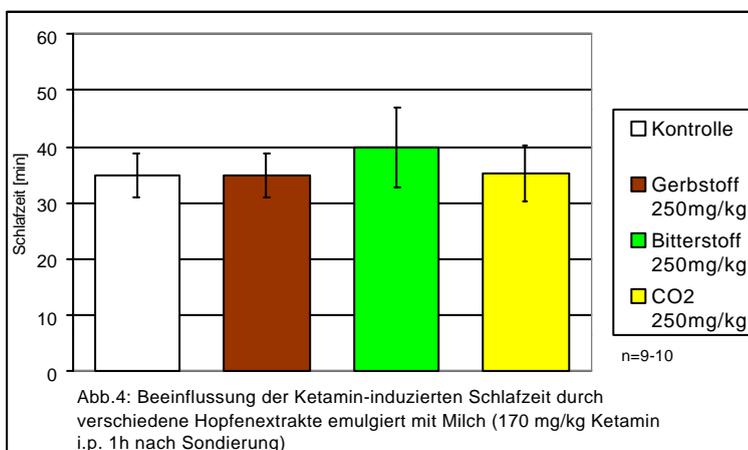




gungen entsprachen denen des ersten Versuchs. Die Behandlung mit dem Extrakt Nugget'94 verlängert in diesem Versuch die Schlafzeit signifikant (T-Test, $p < 0,02$) um durchschnittlich 10 Minuten. Um zu prüfen, ob der Effekt bereits nach einer Stunde deut-

lich ist, wurde mit derselben Versuchsanordnung eine Stunde nach Sondierung getestet. Der linke Teil von Abb. 3 zeigt, daß bei einer Ketamindosis von 200 mg/kg KG kein Unterschied zwischen den Kontroll- und mit Nugget'94 behandelten Tieren erkennbar ist. Durch die hohe Ketamindosis von 200 mg/kg KG schlafen zwar fast alle Mäuse ein, jedoch schlafen sie auch mit ca. 45 Minuten alle sehr lange. Senkt man dagegen die Ketamindosis auf 170 mg/kg KG, schlafen die Kontrollen 12 Minuten kürzer, die mit Nugget'94 behandelten Tiere jedoch ebenso lang wie im vorhergehenden Versuch (Abb.3 rechter Teil). Nugget'94 bewirkte eine signifikante Verlängerung der Schlafzeit um 12 Minuten. Nugget'94 zeigte im Gegensatz zu Brewer's Gold'94 eine deutliche Verlängerung der Schlafzeit nach ein und zwei Stunden. Bei hohen Ketamindosen (200 mg/kg KG) wird der Effekt durch das Narkosemittel überdeckt.

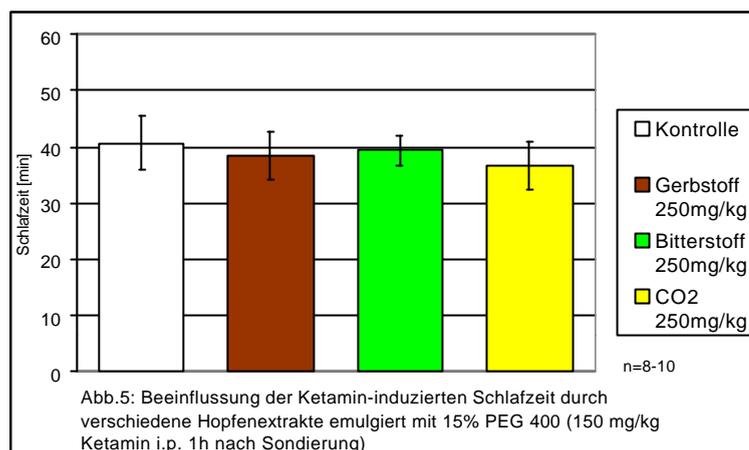
Hopfen-Extrakte 97 031 CO₂, 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase



Die drei Extrakte wurden getestet, weil sie aus dem gleichen Roh-Hopfen-Gemisch von 17% Northern Brewer, 58% Magnum und 25% Brewer's Gold hergestellt wurden und sich nur im Extraktionsverfahren unterscheiden. Die Gerbstoffphase ist ein sogenannter

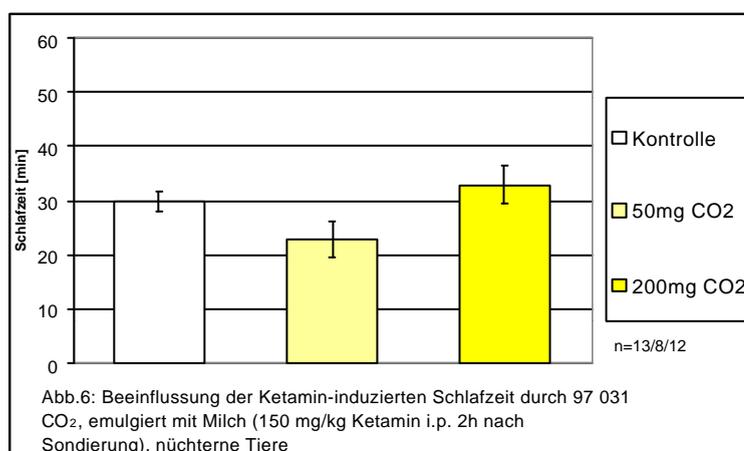
“Heißwasser-Extrakt”, der von den meisten Pharmaherstellern eingesetzt wird, für die Brauereiwirtschaft jedoch ein Abfallprodukt ist. Nach der Extraktion der Droge mit 90%-igem Ethanol wurde der so gewonnene Extrakt erneut mit Wasser versetzt: Der hydrophile Anteil ist die Gerbstoffphase, der lipophile Anteil enthält die Bitterstoffe. Der CO₂-Extrakt wurde mit überkritischem CO₂ hergestellt und hat den höchsten Bitterstoffgehalt. Alle drei Extrakte wurden nach der Methode “Lösung in Milch” emulgiert und in einer Dosierung von 250 mg/kg KG getestet.

Nach 1 h wurden 170 mg/kg KG Ketamin-HCl i.p. gespritzt. Abb. 4 zeigt, daß keiner der Extrakte die Narkosedauer signifikant beeinflusst. Es starben je eine Maus in der mit Bitterstoffphasen- und in der mit CO₂-Extrakt behandel-

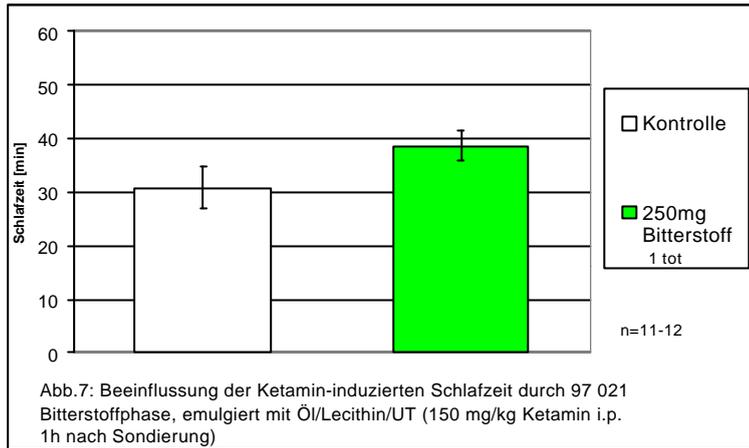


ten Gruppe. Eine weitere Maus aus der mit Bitterstoffphasen-Extrakt behandelten Gruppe wies einen schlechten Zustand auf. Um zu überprüfen, ob das Lösungsverfahren die Schlafzeit beeinflusst, wurde der Versuch mit der Methode “Lösung mit PEG 400 und Ultraschall” unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Abb. 5 zeigt, daß die Schlafzeiten durch den Wechsel der Lösungsmethode nicht wesentlich verändert wurden. Zwar schliefen die Kontrollen im 2. Versuch 5 Minuten länger, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. Das Verhältnis der Schlafzeiten der Extrakte untereinander entspricht sich. Keine Maus starb.

Um auszuschließen, daß das Wirkoptimum übersehen wurde, wurde der CO₂-Extrakt 2 h nach Applikation einer Dosierung von 50 und 200 mg/kg KG untersucht. Er wurde nach der Methode “Lösung in Milch” emulgiert und weiblichen NMRI Mäusen oral gegeben.



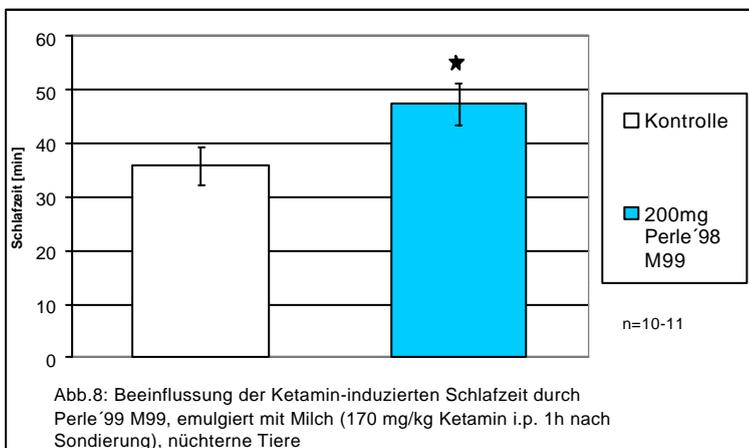
ben. Die Mäuse waren nüchtern, um gleichmäßige Resorptionsbedingungen zu garantieren.



Die Ketamindosis wurde auf 150 mg/kg KG reduziert, da sich in vorherigen Versuchen (Abb. 3) gezeigt hatte, daß mit niedrigeren Ketamin-Dosen Unterschiede in der Schlafzeit besser erkennbar sind. Abb. 6 zeigt, daß eine Dosis von 200 mg/kg KG auch nach 2 h und

mit nüchternen Mäusen nicht zu einer Verlängerung der Narkosedauer führt. Eine Dosis von 50 mg/kg KG verkürzt die Schlafzeit sogar tendenziell. Um zu überprüfen, ob wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe durch die Wärmeeinwirkung bei der Methode "Lösung in Milch" oder durch den Sonicator verändert werden, wurde der Extrakt Bitterstoffphase zusätzlich mit der Emulgiermethode "Lösung mit Lecithin, Öl und UltraTurrax" untersucht. Er wurde wie im Versuch von Abb.4 in einer Dosis von 250 mg/kg KG oral appliziert. Einziger Unterschied war, daß die Ketamindosis 150 anstatt 170 mg/kg KG betrug. Abb. 7 zeigt, daß die Schlafzeit trotz höherer n-Zahl nicht signifikant um 7 Minuten verlängert wurde. Auch in diesem Versuch starb ein Tier in der mit Bitterstoffphase behandelten Gruppe. Damit scheint deutlich, daß weder dem CO₂-Extrakt 97031 noch dem Bitterstoffphasen-Extrakt 97021 eine sedierende Wirkung zukommt.

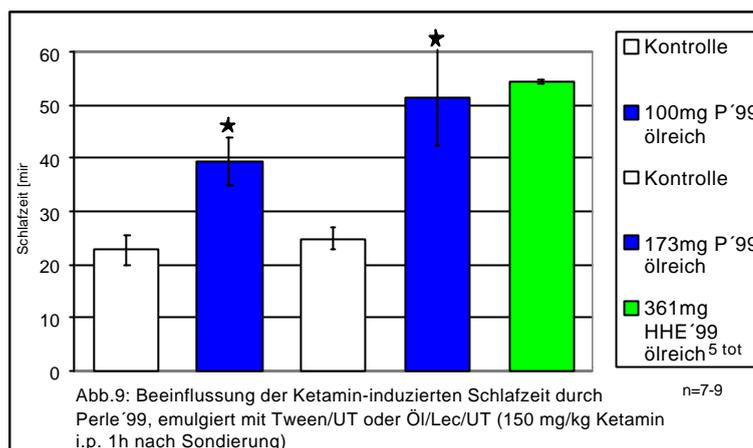
Hopfen-Extrakte HPE'98 März'99, HPE'99 ölreich, HHE'99 ölreich



Der Extrakt HPE'98 März'99 wurde nach der Methode "Lösung in Milch unter Erwärmen" emulgiert und nüchternen, weiblichen NMRI Mäusen oral appliziert. Nach 1 h folgte die i.p. Injektion von 170 mg/kg KG Ketamin HCl. Wie Abb. 8 verdeutlicht, ver-

längerte der Extrakt die Narkosedauer signifikant um 11 Minuten. Allerdings wachten zwei Mäuse in der mit Extrakt behandelten Gruppe nicht mehr auf und starben.

Abb. 9 zeigt 2 Versuche mit Extrakten aus dem Erntejahr 1999, HPE'99 ölreich und



HHE'99 ölreich. Die beiden linken und die drei rechten Säulen gehören zu jeweils einem Versuch. Aus den Extrakten wurde mit der Methode "Lösung mit Tween und UltraTurrax" eine Emulsion hergestellt, die weiblichen NMRI Mäusen oral appliziert wurde. Nach 1 h wurden 150 mg/kg KG i.p. gespritzt. Wie die beiden linken Säulen zeigen, verlängert eine Dosis von 100 mg/kg KG HPE'99 die Schlafzeit signifikant um 16 Minuten, 173 mg/kg KG HPE'99 ölreich verlängern die Schlafzeit sogar um 27 Minuten. Die Mäuse schliefen doppelt so lange wie die der Kontrollgruppe. Eine Dosis von 361 mg/kg KG des Extraktes HHE'99 ölreich verlängerte zwar die Schlafzeit, jedoch verstarben fünf von sieben Tieren in dieser Gruppe. Eine statistische Auswertung der Schlafzeit war nicht möglich. Der Extrakt erwies sich als ausgesprochen toxisch.

Sowohl der Extrakt Perle'99 März'99 als auch die ölangereicherte Version Perle'99 ölreich verlängern signifikant die Schlafzeit, egal ob mit Milch, Tween oder Öl/Lecithin emulgiert. Ob der ölreiche Extrakt wirksamer ist, kann durch die unterschiedlichen Emulgiermethoden und Ketamindosen nicht abschließend beurteilt werden. Der Extrakt Hersbrucker'99 ölreich schied durch seine toxischen Eigenschaften für weitere Untersuchungen aus.

Hopfen-Extrakte Öl 2, Lupulonextrakt entölt [Lup] und Humulonextrakt [Hum]

Öl 2 ist ein Spezialextrakt mit einem sehr hohen Gehalt an Hopfenöl (83 ml/100 g) gegenüber 5 - 10 ml/100 g in normalen Hopfenextrakten. Abb. 10 zeigt die Ergebnisse der Testung verschiedener Konzentrationen von Öl 2. Dargestellt sind jeweils eine Kontroll-

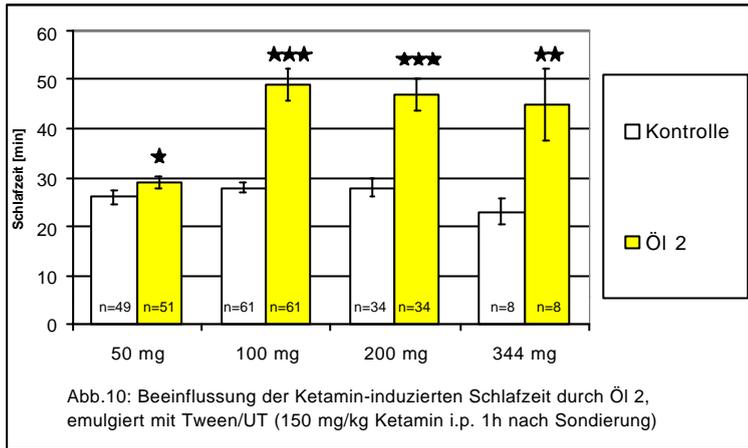


Abb.10: Beeinflussung der Ketamin-induzierten Schlafzeit durch Öl 2, emulgiert mit Tween/UT (150 mg/kg Ketamin i.p. 1h nach Sondierung)

und eine mit Extrakt behandelte Gruppe. Wurden Versuche mehrfach durchgeführt, sind die gemittelten Schlafzeiten dargestellt, die n-Zahl ist in den Säulen vermerkt. Der Extrakt wurde mit der Methode "Lösung mit Tween und UltraTurrax" emulgiert

und oral appliziert. Die Injektion von 150 mg/kg KG Ketamin-HCl erfolgte 1 h später. Bereits eine Dosis von 50 mg/kg KG Öl 2 verlängerte die Schlafzeit signifikant um 3 Minuten. Im Vergleich zu anderen Versuchen liegt jedoch eine wesentlich höhere Anzahl an Versuchstieren von n=49/50 vor, so daß sich bereits die geringe Zunahme als signifikant erwies. Die Verdopplung der Öl 2 Dosis auf 100 mg/kg KG bewirkt eine Verlängerung der Narkosedauer um 21 Minuten bei vergleichbarem Kontrollniveau (26 vs. 28 Minuten). Eine weitere Steigerung der Öl 2 Dosis auf 200 oder 344 mg/kg KG bewirkt keine weitere Verlängerung der Narkosezeit. Der Effekt war mit 100 mg/kg KG maximal. Der Unterschied zur Kontrolle ist bei allen drei Dosierungen von 100/200/344 mg/kg KG etwa gleich groß (21 vs. 19 vs 22 Minuten.). Welchen Einfluß der Emulgator und die Methode der Herstellung der Prüfzubereitung auf die Verlängerung der Schlafzeit hat, zeigt Abb. 11. Es wurde jeweils eine Dosis von 100 mg/kg KG Öl 2 oral appliziert, 60 Minuten später wurden 150 mg/kg KG Ketamin-HCL i.p. gespritzt. Man erkennt, daß die Emulgiermethode einen großen Einfluß auf die Narkoseverlängerung von Öl 2 hat. Verwendet man den Sonicator, war die Schlafzeit kürzer als bei den mit dem UltraTurrax hergestellten Emulsionen, egal ob

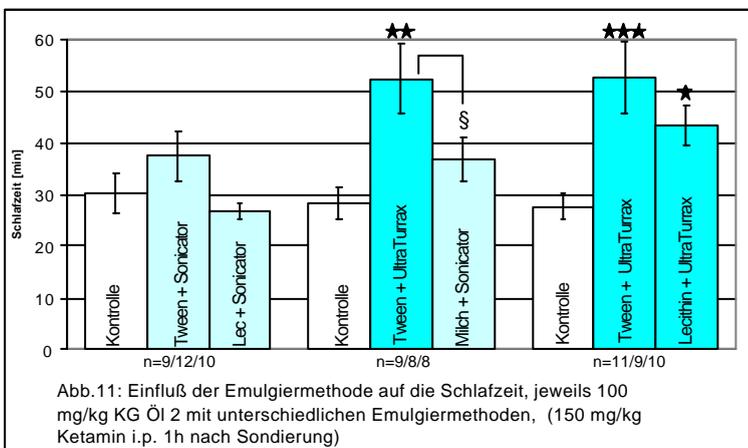
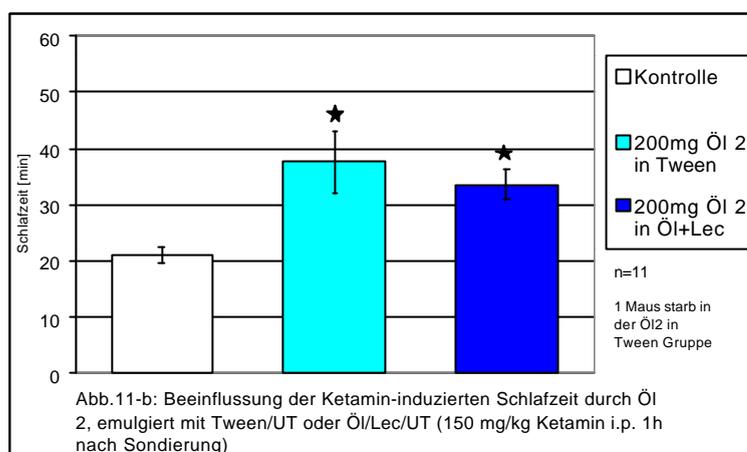


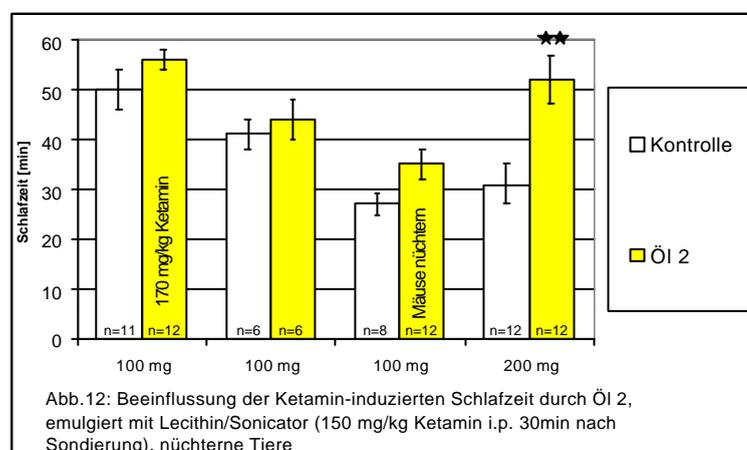
Abb. 11: Einfluß der Emulgiermethode auf die Schlafzeit, jeweils 100 mg/kg KG Öl 2 mit unterschiedlichen Emulgiermethoden, (150 mg/kg Ketamin i.p. 1h nach Sondierung)

man als Emulgator Lecithin, Milch oder Tween 80 nahm (linker Versuch und rechter Versuch). So verlängerte z.B. die Emulsion mit Tween 80 und Sonicator hergestellte die Narkosedauer um 7 Minuten, mit Tween 80 und UltraTurrax

jedoch signifikant um 14 Minuten. Eine Ursache dafür könnte sein, daß bei der Herstellung mit dem Sonicator durch die Ultraschallschwingungen bereits ein Teil des Öles verdampft. Das wurde aber nicht überprüft. Zubereitungen mit Tween verlängerten die Schlafzeit stärker als solche mit Lecithin, gleichgültig ob man den Sonicator oder den UltraTurrax benutzte. Leider war es nicht möglich, mit Milch und UltraTurrax eine stabile Emulsion herzustellen, so daß nicht geklärt werden konnte, ob für die geringere Wirkstärke der Milch + Sonicator Prüflösung die Eigenschaften der Milch oder die Emulgiermethode mit dem Sonicator verantwortlich war. Einen Vergleich zwischen den Emulgiermethoden "Tween und UltraTurrax" und "Öl, Lecithin und UltraTurrax" zeigt Abb.11-b. Eine Dosis von 200 mg/kg KG Öl 2 verlängerte bei beiden Methoden signifikant die Schlafzeit ($p < 0.05$), bei der Methode mit Tween 80 jedoch 4 Minuten länger (nicht signifikant) als mit Öl und Lecithin. In der Öl 2 in Tween 80 Gruppe starb ein Tier. Die Wirkstärke von Öl 2 ist offensichtlich auch vom verwendeten Emulgator abhängig.

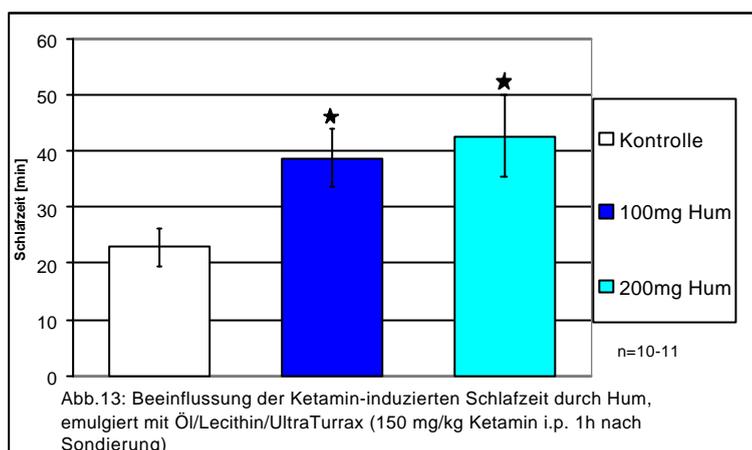


Da sich eine sedierende Wirkung im Motilitätssystem bereits nach kurzer Zeit messen läßt, wurde überprüft, ob man eine Narkoseverlängerung auch bereits nach 30 Minuten nachweisen kann. In Abb. 12 sind vier Versuche zusammengefaßt, in denen Öl 2 auf Narkoseverlängerung getestet wurde. In drei Versuchen wurde durch die Gabe von Öl 2 (100mg/kg KG) in einer Lecithin/Sonicator Emulsion keine signifikante Narkoseverlängerung beobachtet, unabhängig davon, ob die Ketamindosis erhöht wurde oder die Mäuse nüchtern waren. Allerdings schliefen die Tiere in der Kontrollgruppe des ersten und zweiten Versuches



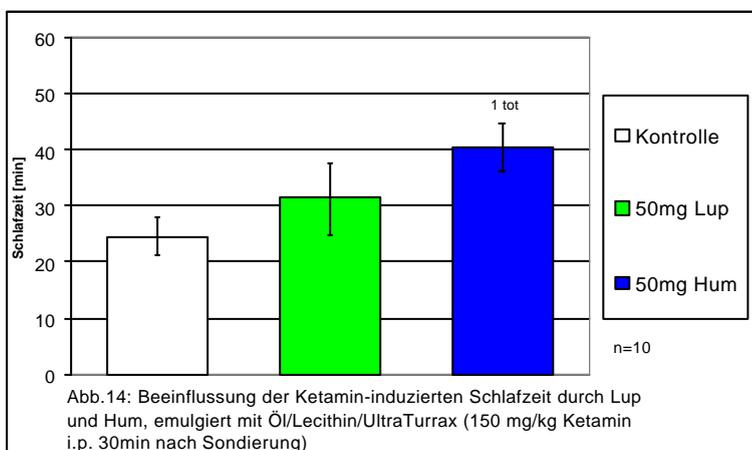
unerwartet lange. Die Erhöhung der Öl 2 Dosis auf 200 mg/kg KG dagegen bewirkte eine signifikante Verlängerung der Schlafzeit um 21 Minuten.

Öl 2 verlängerte ab einer Dosis von 50 mg/kg KG signifikant die Schlafzeit, die Wirkung war jedoch stark vom verwendeten Emulgator und Herstellungsverfahren abhängig. Die besten Ergebnisse wurden mit der Methode "Tween und UltraTurrax" erreicht.



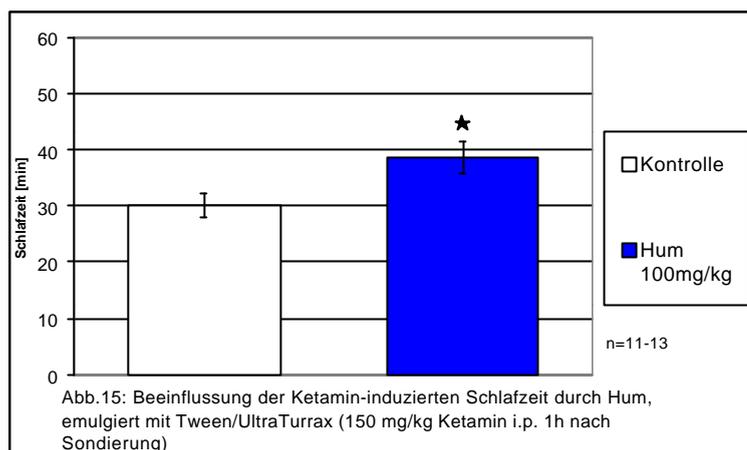
Der Humulonextrakt [Hum] wurde extrem humulonbetont hergestellt (84,4 % alpha-Säuren), er ist sehr arm an beta-Säuren (1,6 % vs. 25 - 50 % in Normalextrakten) und Hopfenöl (0,3 ml/100 g vs. 5 - 10 ml/100 g in Normalextrakten).

Der Extrakt wurde zunächst in einer Dosierung von 100 und 200 mg/kg KG getestet. Die Emulsionen wurden nach der Methode "Lösung mit Lecithin, Öl und UltraTurrax" hergestellt. Eine Herstellung mit dem Sonicator und einem beliebigen anderen Emulgator war bei Humulon nicht möglich, da die Emulsionen sofort brachen. Der Abstand zwischen der oralen Applikation des Extraktes und der Narkose mit 150 mg/kg KG betrug 1 h. Abb. 13 zeigt, daß eine Dosis von 100 mg/kg KG Humulon die Narkosedauer signifikant um 16 Minuten verlängerte, 200 mg/kg KG Humulon verlängerte sie um 20 Minuten. Um zu prüfen, ob eine Verkürzung des Abstandes zwischen Applikation des Extraktes und Narkosebeginn die Wirkung verstärkt, wurde bei einer Dosis von 50 mg/kg KG Humulon die Narkotisierung nach 30 Minuten durchgeführt (Abb. 14). Im



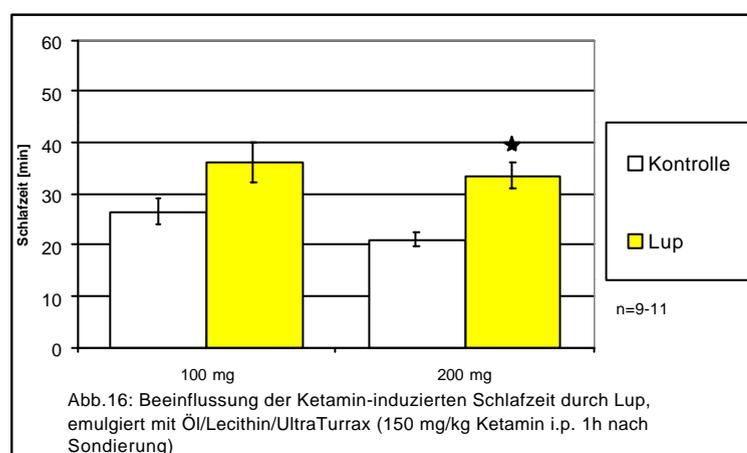
gleichen Versuch wurde auch der Extrakt Lupin getestet. 50 mg/kg KG Humulon verlängerten die Schlafzeit um 16 Minuten. Der statistische Unterschied zur Kontrolle ist je nach verwendetem post-hoc Test signifikant (Dunnett's) oder nicht

signifikant (Student-Newman-Keuls). Ein Tier, in der mit Hum behandelten Gruppe, verstarb in der Narkose. Da Versuche mit Öl 2 gezeigt hatten, daß die Wirkstärke auch vom verwendeten Emulgator abhängig ist, wurde anschließend eine Emulsion mit Tween und

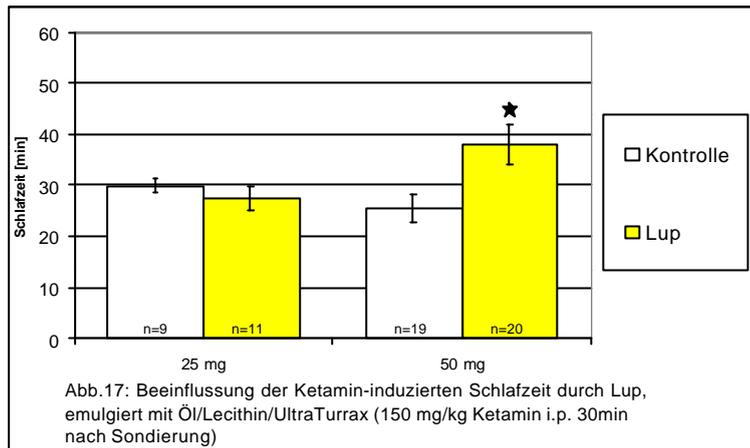


UltraTurrax hergestellt und in einer Dosis von 100 mg/kg KG appliziert (Abb. 15). Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen des ersten Versuches mit 100 mg/kg KG (Abb. 13). Die Schlafzeit wurde durch die Behandlung mit Hum um 9 Minuten signifikant verlängert. Die absolute Schlafzeit von 39 Minuten entsprach der absoluten Schlafzeit des ersten Versuches, während die Kontrolle bei diesem Versuch kürzer schlief.

Der Lupuloneextrakt entölt (Lup) ist ein Spezialextrakt, der reich an beta-Säuren ist (66,5 %) und keine alpha-Säuren (0 %) enthält. Zunächst wurden 100 und 200 mg/kg KG oral appliziert und die Tiere 1 h später mit 150 mg/kg KG Ketamin-HCl narkotisiert. Der Extrakt wurde mit der Methode "Lecithin, Öl und UltraTurrax" emulgiert. Abb. 16 zeigt die

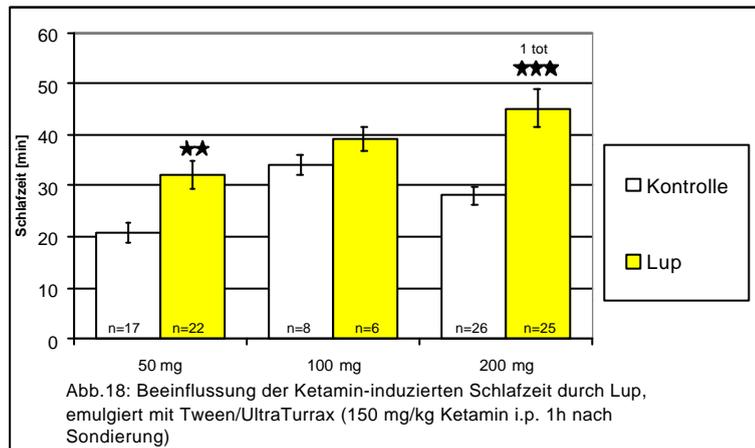


Ergebnisse von zwei Versuchen mit den Dosierungen 100 bzw. 200 mg/kg KG. 100 mg/kg KG bewirken eine Verlängerung der Schlafzeit von 11 Minuten und 200 mg/kg KG verlängerten die Schlafzeit signifikant um 12 Minuten. Um zu überprüfen, ob sich eine Narkoseverlängerung auch mit noch niedrigeren Dosen erreichen läßt, wurden Versuche mit 25 und 50 mg/kg KG durchgeführt. Da aus den Daten der Motilitätsmessung bekannt war, daß die Wirkung des Extraktes sehr früh einsetzt, wurden die Tiere bereits nach 30 Minuten narkotisiert. Alle anderen Versuchsparameter blieben gleich. 25 mg/kg KG hatten keinen Einfluß



auf die Schlafzeit (Abb. 17), 50 mg/kg KG dagegen verlängerten die Schlafzeit signifikant um 13 Minuten, welches ungefähr dem Wert von 200 mg/kg KG nach 1 h entspricht (Abb. 16). In weiteren Versuchen wurde der Einfluß des Emulgators auf die Wirkstärke

untersucht. Für die in Abb. 18 dargestellten Versuche wurde der Emulgator Tween 80 verwendet. Die Herstellung der Emulsion erfolgte wie bei Öl und Lecithin mit dem UltraTurrax. Die Ketamin-Narkose erfolgte 1 h nach oraler Applikation. Eine Dosis von 50 bzw.



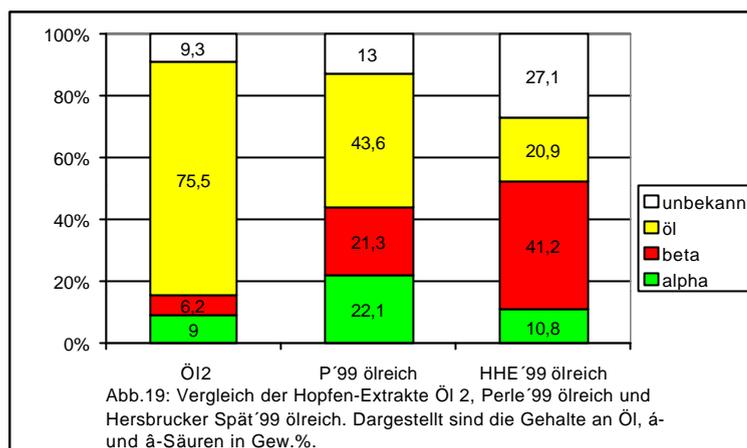
200mg/kg KG verlängerte die Schlafzeit signifikant um 11 bzw. 17min. Ein Tier starb in der mit 200 mg/kg KG behandelten Gruppe. In diesen Dosierungen wurden mehrere Versuche durchgeführt und ausgewertet, daher erklären sich die hohen n-Zahlen. In der

Dosierung von 100 mg/kg KG wurde nur ein Versuch durchgeführt. Lup verlängerte die Schlafzeit tendenziell, jedoch nicht signifikant.

Ab einer Dosis von 50 mg/kg KG verlängerte der Extrakt Lup signifikant die Schlafzeit, unabhängig davon ob als Emulgator Öl/Lecithin oder Tween 80 verwendet wurde. Zwar scheint auch bei diesem Extrakt die mit Tween 80 hergestellte Emulsion stärker wirksam zu sein, jedoch ist der Effekt nur schwach ausgeprägt und nicht signifikant

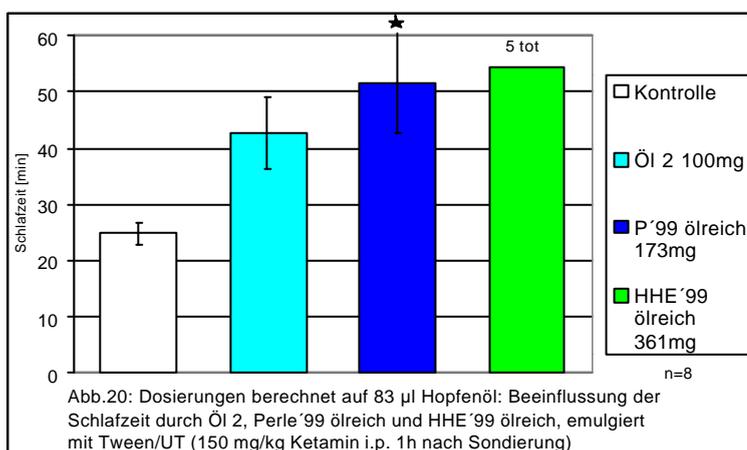
Um herauszufinden, welche Inhaltsstoffe in *Humulus lupulus* für die narkoseverlängernde Wirkung verantwortlich sind, wurden drei Extrakte mit unterschiedlichen Gehalten an Hopfenöl, alpha- und beta-Säuren untersucht.

Dazu wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt und im Versuch überprüft. Zunächst wurde angenommen, Hopfenöl stelle den einzig wirksamen Inhaltsstoff dar. Drei unterschiedliche Extrakte, Öl 2, Perle'99 ölreich und Hersbrucker'99 ölreich wurden

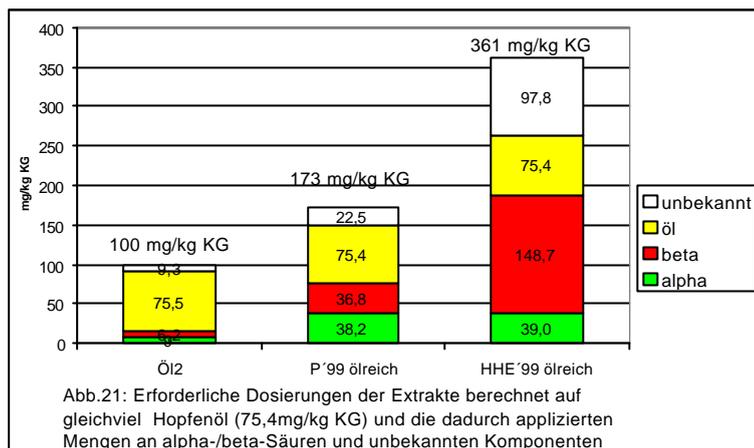


vergleichend getestet, wobei die Dosierung so gewählt wurde, daß mit jedem Extrakt dieselbe Menge an Hopfenöl appliziert wurde. Perle'99 ölreich und Öl 2 wurden beide aus der Aroma-Sorte Perle extrahiert, HHE'99 ölreich aus der Bitter-Sorte Hersbrucker Spät. Die Gehalte der einzelnen Extrakte zeigt Abb. 19. Öl 2 besitzt mit 75,5 % (=83 ml/100 g) den höchsten Gehalt an Hopfenöl, Hersbrucker'99 ölreich den niedrigsten (20,9 % = 23 ml/100 g). Sie enthalten beide etwa 10 % alpha-Säuren, HPE'99 ölreich dagegen doppelt soviel (22,1 %). HHE'99 besitzt mit 41,2 % fast sieben mal soviel beta-Säuren wie Öl 2 und doppelt so viele wie HPE'99 ölreich (21,3 %). Die aus dem Ölgehalt errechneten Applikationsmengen dosiert auf 83 µl(=75,5 mg)/kg KG sind 100 mg/kg KG Öl 2, 173 mg/kg KG HPE'99 ölreich und 361 mg/kg KG HHE'99 ölreich. Die Extrakt-Emulsionen wurden mit

Tween und UltraTurrax hergestellt und eine Stunde vor der Narkose appliziert. Der Effekt der drei Zubereitungen auf die Schlafzeit war nicht identisch [Abb. 20]. In der mit Hersbrucker'99 ölreich behandelten Gruppe starben 5 von 8 Tieren, und eines schlief nicht

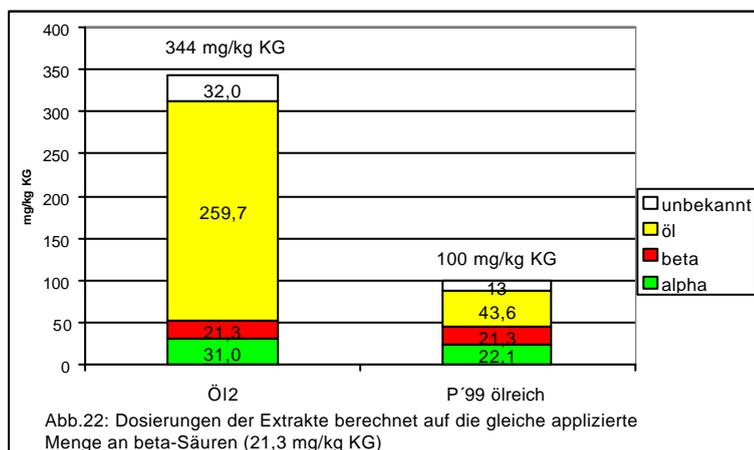


ein, so daß nur 2 Tiere in die Wertung eingingen. Perle'99 verlängert in der Dosierung von 173 mg/kg KG signifikant die Schlafzeit. 100 mg/kg KG Öl 2 verlängern die Schlafzeit etwas weniger und nicht signifikant, jedoch ist der Unterschied zur Perle'99 Gruppe auch nicht signifikant. Allen drei Gruppen wurde gleich viel Hopfenöl appliziert. Vergleicht man



jedoch die gleichzeitig verabreichte Menge an anderen Inhaltsstoffgruppen, so ergeben sich erhebliche Unterschiede [Abb.21]. Der Hersbrucker'99 ölreich Gruppe wurden im Vergleich zur Öl 2 Gruppe 24mal mehr beta-Säuren (148,7 vs. 6,2),

10mal mehr unbekannte Komponenten (97,8 vs. 9,3) und 4mal mehr alpha-Säuren (39 vs. 9) appliziert. Auffallend war die hohe Toxizität von HHE'99, die bedingte, daß 5 von 8 Tieren verstarben. Dafür kann der alpha-Säuren Anteil in diesem Extrakt wahrscheinlich nicht verantwortlich sein, da die mit Perle'99 ölreich behandelte Gruppe eine vergleichbare Menge (39,0 vs. 38,2) erhielt und kein Tier starb. Auch die beta-Säuren dürften nicht die Ursache dieser Toxizität sein, da in vergleichbaren Versuchen mit 200mg/kg KG des Extraktes Lup [Abb. 18] 133 mg/kg KG beta-Säuren appliziert wurden und nach dieser Behandlung nur 1 von 26 Tieren starb. Eine mögliche Erklärung dürfte in den unbekanntem Substanzen liegen, die in der mit Hersbrucker'99 ölreich behandelten Gruppe 4mal höher als in der Perle'99 und 10mal höher als in der Öl 2 Gruppe war.

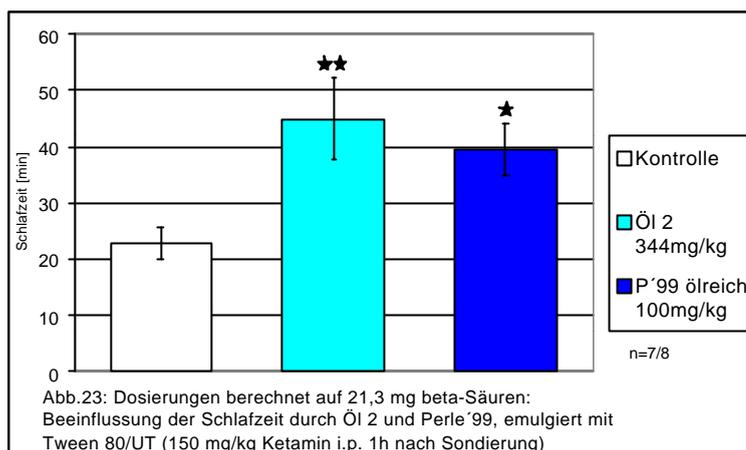


Bei vergleichbaren Versuchsbedingungen wurden die Hopfen-Extrakte Öl 2 und Perle'99 ölreich so dosiert, daß dieselben Mengen an beta-Säuren appliziert wurden. HHE'99 ölreich wurde wegen seiner Toxizität nicht mituntersucht. Die übrigen Versuchsbedin-

gungen waren gleich. Abb. 22 zeigt die tatsächlich applizierten Mengen der beiden Extrakte ihrer bekannten Inhaltsstoffe in mg/kg KG, Abb. 23 die Schlafzeiten. Beide Extrakte verlängerten in der jeweiligen Dosierung signifikant die Schlafzeit. Die mit 344 mg/kg KG Öl 2 behandelten Tiere schliefen nur wenig länger als die mit 100 mg/kg KG Perle'99 ölarm

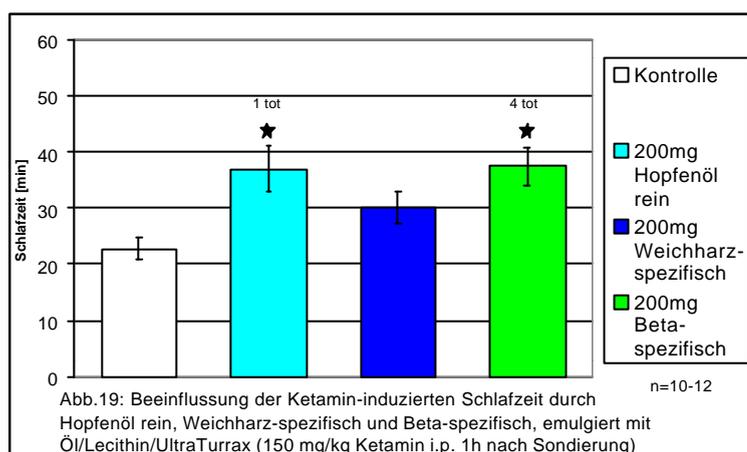
behandelten Tiere (45min vs. 39min), obwohl sie 6mal mehr Hopfenöl erhielten (259,7 vs. 43,6).

Weder der Gehalt an Hopfenöl, noch der an alpha- oder beta-Säuren läßt sich direkt mit der narkoseverlängernden Wirkung korrelieren. Der Effekt könnte auch bereits maximal sein.

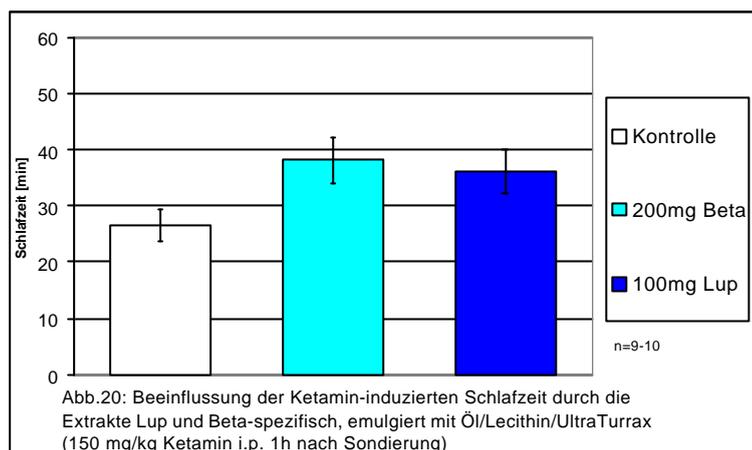


Hopfen-Extrakte Hopfenöl rein [Ölrein], Weichharz-spezifisch [Weich] und Beta-spezifisch [Beta]

Diese Extrakte stellen die Hopfen-Extrakte mit der höchsten Reinheit dar. Ölrein enthält 99 ml/100 g Hopfenöl und fast keine alpha- oder beta-Säuren noch Weichharz (jeweils unter 0,6 %). Der Weichharz-spezifische Extrakt enthält ca. 80 % Weichharz,



ein Polymerisationsprodukt der alpha- und beta-Säuren und zu jeweils ca. 10 % beta-Säuren und Hopfenöl. Der Beta-spezifische Extrakt entspricht in seiner Zusammensetzung mit viel beta-Säuren (63 %) und wenig alpha-Säuren und Hopfenöl weitgehend dem Extrakt Lup, sein Weichharzanteil wurde auf 35 % geschätzt (Angaben des Extraktherstellers). Abb. 19 zeigt die Ergebnisse der Testung von 200 mg/kg KG des jeweiligen Extraktes emulgiert mit Lecithin, Öl und UltraTurrax. Die Narkose erfolgte 1 h nach oraler Applikation mit 150 mg/kg KG Ketamin-HCl i.p.. Das reine Hopfenöl und der Beta-spezifische Extrakt verlängerten die Schlafzeit signifikant um 14 Minuten. In der mit reinem Hopfenöl behandelten Gruppe verstarb ein Tier in der Narkose, in der mit Beta-spezifischen Extrakt behandelten Gruppe



starben ein Tier vor Narkosebeginn und drei Tiere in der Narkose. Der Weichharzspezifische Extrakt war schwächer wirksam, er verlängerte die Schlafzeit nur tendenziell um 7 Minuten. Weil auch nach Rücksprache mit dem Extrakthersteller nicht geklärt

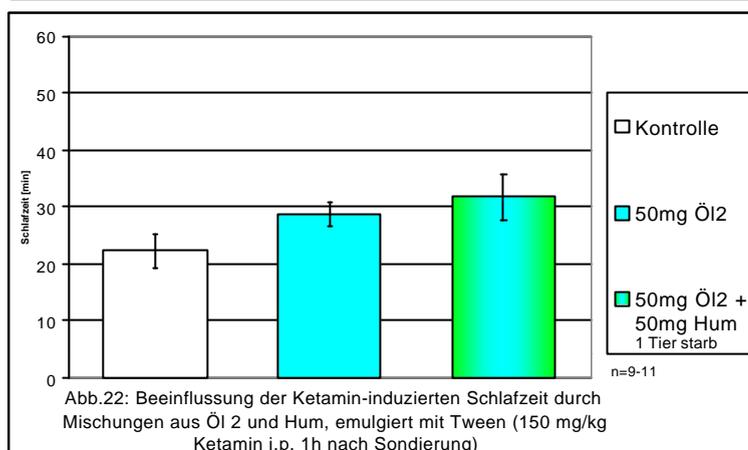
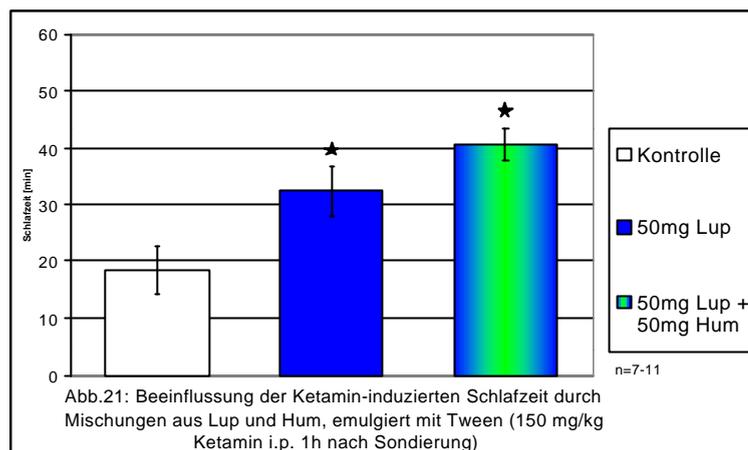
werden konnte, warum der Beta-spezifische Extrakt toxisch wirkte (4 von 11 Tieren starben), wurde der Versuch mit der gleichen Dosierung unter möglichst gleichen Bedingungen wiederholt (Abb. 20) und mit Lup verglichen. 200 mg/kg KG Beta verlängerten die Schlafzeit um 11 Minuten n.s., 100 mg/kg KG Lup um 9 Minuten. Obwohl die Extrakte sich vom Inhaltsstoffmuster sehr ähneln, bewirkt eine doppelt so hohe Dosis nur eine marginale Wirkverstärkung. In diesem Versuch starben keine Tiere. Warum im ersten Versuch derartig viele Tiere starben, konnte nicht geklärt werden.

Von den drei Extrakten, zeigen Ölrein und Beta eine deutliche, signifikante narkoseverlängernde Wirkung, der aus den Polymerisationsprodukten der alpha- und beta-Säuren bestehende Weichharzextrakt nur eine schwächere. Offensichtlich ist die Wirkung weder dem Hopfenöl noch den beta-Säuren alleine zuzuordnen, da der entölte Extrakt Beta und der beta-Säuren arme Extrakt Ölrein eine gleichstarke Wirkung besitzt. Ebenfalls können die alpha-Säuren nicht die alleinige Wirkstoffgruppe darstellen, da Ölrein und Beta fast keine alpha-Säuren enthalten. Ob die Wirkung des Weichharzextraktes durch die in ihm enthaltenen 9,3% beta-Säuren und 8,7% Hopfenöl, durch den 80%-igen Weichharzanteil oder durch andere Inhaltsstoffe verursacht wurde, konnte nicht geklärt werden.

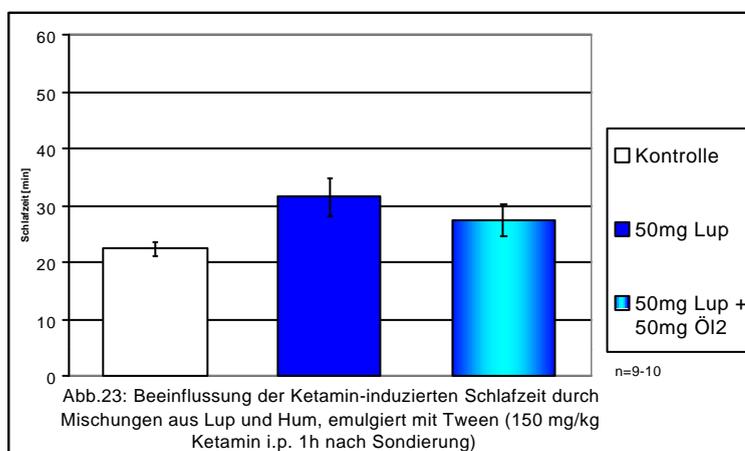
Mischungen aus den Extrakten Hum, Lup, Öl 2 und Ölrein

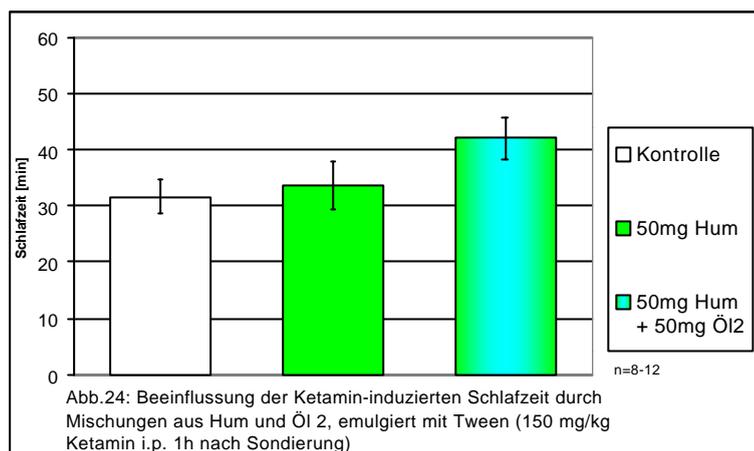
Es sollte geprüft werden, ob Extrakt-Kombinationen im Verhältnis 1:1 eine synergistische, unveränderte oder antagonistische Wirkung besitzen. Deshalb wurden mit Extrakten Hum, Lup und Öl 2 Mischungen aus jeweils zwei Extrakten im Verhältnis 1:1 hergestellt und in jedem Versuch mit einem der beiden Extrakte verglichen. 50 mg/kg KG für die reinen

Extrakte und 50 + 50 mg/kg KG Extrakt für die Kombinationen wurde verwendet, um Unterschiede zwischen reinem Extrakt und Mischung erkennen zu können. Die Dosierungen wurde bewußt niedrig gewählt, da 50 mg/kg KG eine Grenzdosis darstellt, bei der man gerade noch einen Effekt erwarten kann. Wirkverstärkungen oder -verminderungen sollten so besser erfaßbar sein. Die Emulsionen wurden mit Tween und UltraTurrax hergestellt. Eine Dosis von 50 mg/kg KG Lup verlängerte erwartungsgemäß die Schlafzeit um 13 bzw. um 10 Minuten (Abb.21/23). 50 mg/kg KG Öl 2 verlängerten die Schlafzeit n.s. um 7 Minuten. 50 mg/kg KG Hum beeinflussten die Schlafzeit nicht (Abb.24), jedoch schlief bei diesem Versuch die Kontrollgruppe deutlich länger als bei den anderen drei Versuchen. Abb.21 zeigt, daß eine Kombination aus Hum und Lup im Verhältnis 1:1 die Schlafzeit signifikant um 22 Minuten verlängerte, das sind 9 Minuten mehr als bei Lup alleine. Eine Kombination von Lup und Öl 2 im Verhältnis 1:1 dagegen verlängerte die Schlafzeit nur tendenziell (Abb.23) und weniger als die Einzel-Extrakte Lup (Abb.21/23) oder Öl 2 (Abb.22). Eine Kombination aus Öl 2 und Hum (Abb.22/24) verlängerte die Schlafzeit gegenüber den Einzel-Extrakten um 3 Minu-



tenzgemäß die Schlafzeit um 13 bzw. um 10 Minuten (Abb.21/23). 50 mg/kg KG Öl 2 verlängerten die Schlafzeit n.s. um 7 Minuten. 50 mg/kg KG Hum beeinflussten die Schlafzeit nicht (Abb.24), jedoch schlief bei diesem Versuch die Kontrollgruppe deutlich länger als bei den anderen drei Versuchen. Abb.21 zeigt, daß eine Kombination aus Hum und Lup im Verhältnis 1:1 die Schlafzeit signifikant um 22 Minuten verlängerte, das sind 9 Minuten mehr als bei Lup alleine. Eine Kombination von Lup und Öl 2 im Verhältnis 1:1 dagegen verlängerte die Schlafzeit nur tendenziell (Abb.23) und weniger als die Einzel-Extrakte Lup (Abb.21/23) oder Öl 2 (Abb.22). Eine Kombination aus Öl 2 und Hum (Abb.22/24) verlängerte die Schlafzeit gegenüber den Einzel-Extrakten um 3 Minu-

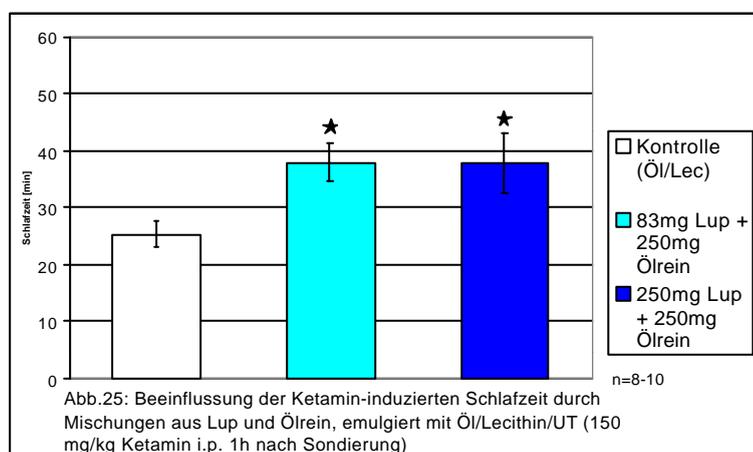




ten bei Öl 2 (Abb.22) und 8 Minuten bei Hum (Abb.24). Ein Tier starb in der mit dieser Kombination behandelten Gruppe (Abb.22). Da Hum auch in Versuchen nach mehrmaliger Applikation toxische Effekte zeigte, wurde eine weitere Untersuchung von Kombi-

nationen mit Hum ausgeschlossen. Die Kombination von Lup und Öl 2 im Verhältnis 1:1 zeigte keinen Vorteil gegenüber Lup oder Öl 2 alleine.

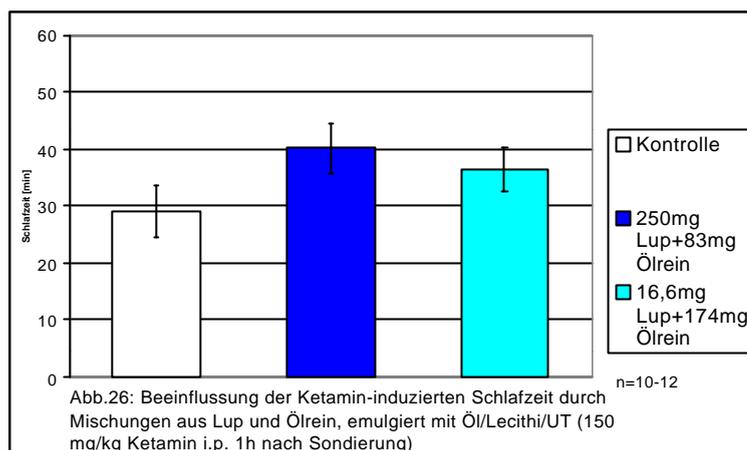
Aus den Extrakten Lup und Ölrein, wurden Kombinationen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen hergestellt, 1:3, 1:1, 3:1 und 1:10,5. Die Extrakte wurden so ausgewählt, daß sie keine (Lup) bzw. nur in Spuren (Ölrein) alpha-Säuren enthalten. Die Testung einer Kombination von Lup:Ölrein wie 1:10,5 stellt das beta-Säuren zu Hopfenöl Verhältnis in Öl 2 dar. Da Öl 2 ein wirksamer, aber nach mehrmaliger Applikation bei Mäusen nur mäßig verträglicher Extrakt war, wurde versucht, eine besser verträgliche Mischung ähnlich wie Öl 2,



aber frei von alpha-Säuren herzustellen. Die Emulsionen wurden mit der Methode "Öl/Wasser/Lecithin mit UltraTurax" hergestellt. Abb.25 zeigt, daß beide Kombinationen aus Lup und Ölrein, sowohl im Verhältnis 1:3 als auch im Verhältnis 1:1 die Schlafzeit um

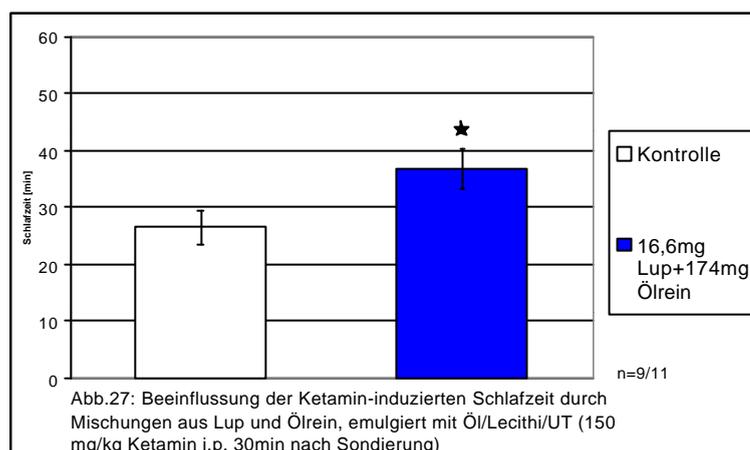
13 Minuten signifikant verlängerten ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls). Offensichtlich ist es fast unerheblich, ob man 250 mg/kg Ölrein mit genauso viel (250 mg/kg) oder nur einem Drittel (83 mg/kg KG) Lup kombiniert, es wurde durch beide Gemische eine vergleichbare Wirkung erreicht. Abb.26 zeigt die Ergebnisse mit Lup-Ölrein Kombinationen mit den Verhältnissen 3:1 und 1:10,5. 250 mg/kg KG Lup + 83 mg/kg KG Ölrein verlängerten die

Schlafzeit um 11 Minuten, 16,6 mg/kg KG Lup + 174 mg/kg KG Ölrein etwas weniger um 7 Minuten. 16,6 mg Lup kombiniert mit 174 mg Ölrein enthalten ungefähr die Menge an beta-Säuren und Hopfenöl, wie 200 mg Öl 2. Öl 2 enthält zusätzlich 18 mg (9%) alpha-



Säuren und 18,6 mg (9,3 %) unbekanntes Rest. Die Kombination (16,6 + 174) enthält zusätzlich 0,17 mg (0,09%) alpha-Säuren und 24,9 mg (13%) unbekanntes Rest. Eine Dosis von 200 mg/kg KG Öl 2 emulgiert mit Öl/Lecithin/UltraTurrax verlängerte die Schlafzeit ähnlich lange (6 Minuten s.

Abb.11-b), so daß die alpha-Säuren alleine nicht die nicht wirkbestimmende Gruppe sein können. Führt man die Narkose mit der Dosierung 16,6 mg/kg KG Lup + 174 mg/kg KG Ölrein bereits nach 30 Minuten nach Applikation durch

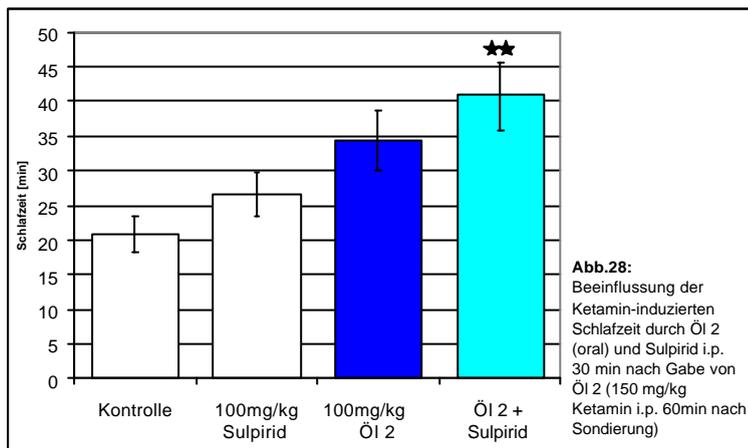


(Abb.27), wurde die Schlafzeit signifikant um 11 Minuten verlängert ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls). Offensichtlich setzte die Wirkung schnell ein und ließ nach 1 h bereits wieder nach.

Untersuchung auf Interferenzen zwischen Hopfenextrakten und Dopamin-Rezeptorantagonisten

Um Hinweise auf den Wirkmodus zu erhalten, wurde versucht, die durch den Extrakt Öl 2 induzierte Schlafzeitverlängerung zu antagonisieren. Dazu wurden die Tiere entweder mit dem relativ spezifischen $D_{2/3}$ Rezeptorantagonist Sulpirid oder dem $D_{1/2}$ Rezeptorantago-

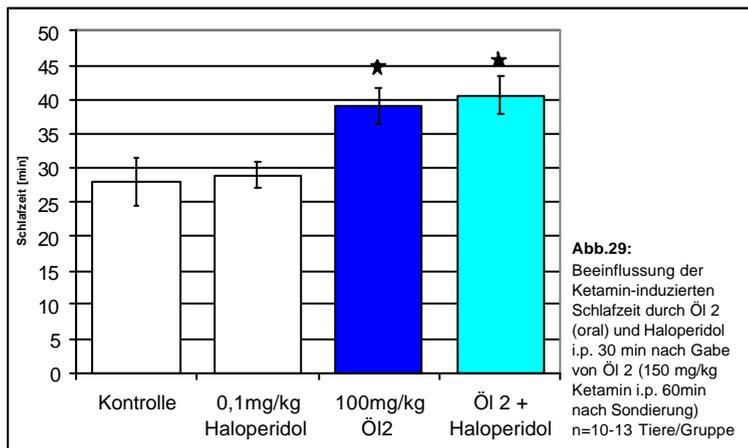
nist Haloperidol 30 Minuten vor Extraktgabe vorbehandelt. Versuchstiere waren weibliche NMRI-Mäuse, bei jedem Versuch wurden 4 Behandlungsgruppen verglichen. Die Gruppen 2 und 4 erhielten den jeweiligen Antagonisten i.p. appliziert, die Gruppen 1 und 3 erhielten 0,9 %ige Kochsalzlösung. Die Dosierungen wurden mit 100 mg/kg KG Sulpirid und 0,1 mg/kg KG Haloperidol so gewählt, daß der Antagonist alleine die Schlafzeit nicht signifikant beeinflusste. Nach 30 Minuten erhielten die Gruppen 3 und 4 Öl 2 in einer Dosis von 100 mg/kg KG oral appliziert, die Gruppen 1 und 2 erhielten Wasser. Der Extrakt war mit der Methode "Tween 80 und UltraTurrax" emulgiert worden. 60 Minuten später wurden die



Tiere mit 150 mg/kg KG Ketamin narkotisiert.

Abb.28 zeigt, daß die Schlafzeit der mit Sulpirid behandelten Tier nur wenig über Kontrollniveau lag, während Ö1 2 sie deutlich verlängerte. Testete man mit dem schwächeren Fisher-PLSD Test, war

der Unterschied signifikant. Die Behandlung mit der Kombination aus Sulpirid und Ö1 2 verdoppelte signifikant die Schlafzeit (41 vs. 21, $p < 0,01$ Student-Newman-Keuls). Sulpirid konnte offensichtlich die Wirkung von Ö1 2 nicht antagonisieren, die Effekte addierten sich



sogar.

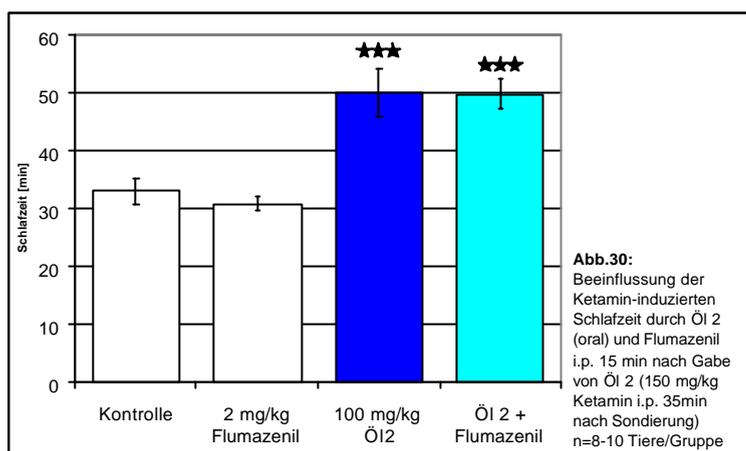
In einem zweiten Versuch wurde mit dem $D_{1/2}$ Rezeptorantagonisten Haloperidol vorbehandelt (Abb.29). Die Schlafzeit der mit Haloperidol vorbehandelten Tiere lag auf Kontrollniveau (29 vs. 28), die mit der Kombination aus Ö1 2

und Haloperidol behandelten Tiere lagen auf dem gleichen Niveau wie die mit Ö1 2 alleine behandelten Tiere (41 vs. 39). Auch Haloperidol konnte die Wirkung von Ö1 2 nicht antago-

nisieren. Es machte keinen Unterschied, ob die Tiere mit Haloperidol vorbehandelt waren oder nicht.

Untersuchung auf Interferenzen zwischen Hopfenextrakten und Benzodiazepin-Rezeptorantagonisten

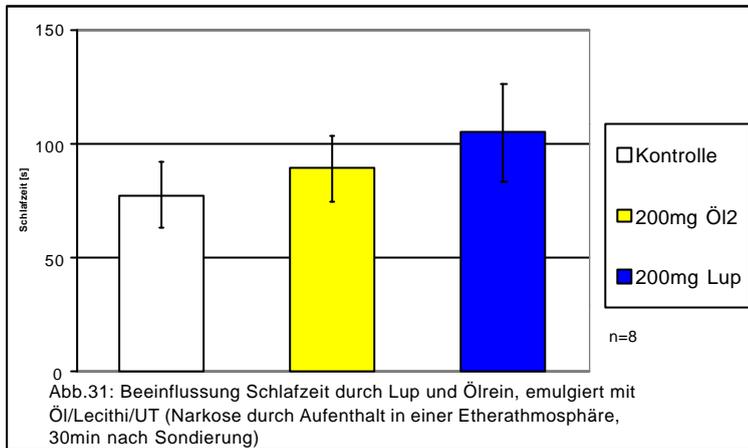
Durch aufeinanderfolgende Applikation des Extraktes Öl 2 und Flumazenil wurde getestet, ob sich die narkoseverlängernde Wirkung des Hopfenextraktes durch einen Benzodiazepinrezeptor-Antagonisten aufheben läßt. Dazu wurde 4 Gruppen mit je 10 Tieren



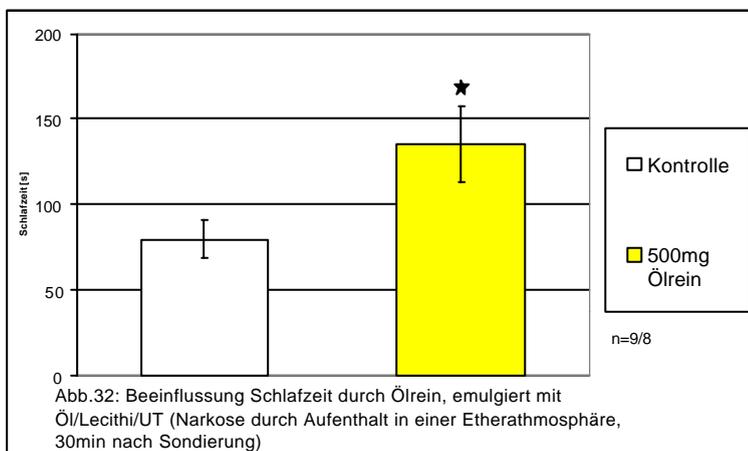
gebildet. Eine Gruppe erhielt nur den Antagonisten, eine andere nur den Extrakt und eine dritte die Kombination aus Extrakt und Antagonist. Dabei wurde zuerst der Extrakt (100 mg/kg KG) in einer 2,5 %-igen Tween 80 Emulsion oral appliziert, der Antagonist (2 mg/kg KG) mit einem zeitlichen Abstand von 15 Minuten i.p. danach. Die Kontrolle erhielten jeweils 2,5 %-ige Tween 80 Lösung oder/und 0,9 %-ige Kochsalzlösung. Flumazenil wurde aus Ampullen des Präparates Anexate[®] mit einem Gehalt von 0,1 mg/ml entnommen. Um eine Dosis von 2 mg/kg KG erreichen zu können, wurden deshalb abweichend zu den anderen Versuchen 20 ml/kg KG appliziert. Wie Abb. 30 zeigt, ließ sich die narkoseverlängernde Wirkung von Öl 2 durch Gabe von Flumazenil nicht antagonisieren. Beide Gruppen, die den Extrakt erhalten hatten, schliefen signifikant länger als die Kontrolle ($p < 0,0001$ Bonferroni). Es machte keinen Unterschied, ob zusätzlich der Antagonist gegeben wurde oder nicht. Die Gabe des Antagonisten alleine dagegen beeinflusste die Narkosedauer nicht. Eine Wirkung des Extraktes über den Benzodiazepin-Rezeptor ist deshalb nicht erkennbar.

4.1.1.2 Ethernarkose

Um auszuschließen, daß es sich bei einer Verlängerung der Ketamin-induzierten Schlafzeit nicht um eine zentral sedierende sondern um eine rein metabolische Interaktion handelt, die



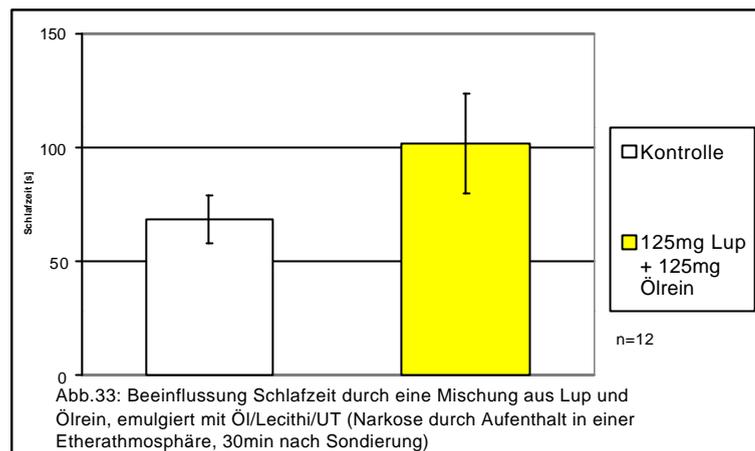
einigen Extrakten zusätzlich eine Ethernarkose durchgeführt. Abb. 31 zeigt die Beeinflussung der Schlafzeit nach oraler Gabe von 200 mg/kg KG Öl 2 oder Lup. Die Emulsionen wurden mit der Methode "Öl, Lecithin und UltraTurrax" hergestellt. Auf der Ordinate ist die Schlafzeit in Sekunden aufgetragen. In der mit Öl 2 behandelten Gruppe wurde die Schlafzeit durchschnittlich um 12 s verlängert (89 vs. 77), in der mit Lup behandelten Gruppe um 28 s (105 vs. 77). Durch die hohen Streuungen sind keine



statistisch signifikanten Aussagen möglich, jedoch schließen die mit Lup behandelten Tiere deutlich länger als die Kontrolltiere. Abb. 32 zeigt, daß eine Dosis von 500 mg/kg KG Ölein die Schlafzeit nach einer Ethernarkose ebenfalls verlängert. Die Mäuse in der Verum-Gruppe schiefen signifikant 56 s länger als die in der Kontrollgruppe (136 vs. 80). Die Emulgiermethode und der Abstand zwischen Applikation und Narkosebeginn entsprachen exakt denen des vorherigen Versuches (Abb.31).

In einem weiteren Versuch (Abb.33) wurde eine Mischung aus den Extrakten Lup und Ölein im Verhältnis 1 : 1 untersucht. Die Dosierung wurde so gewählt, daß jeweils 125 mg/

kg KG Lup und Ölein appliziert wurden. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen der vorherigen Versuche (Abb.31/32). Die Mäuse in der mit der Mischung behandelten Gruppe schliefen 23 s länger als die in der Kontrollgruppe. Zwar sind durch die

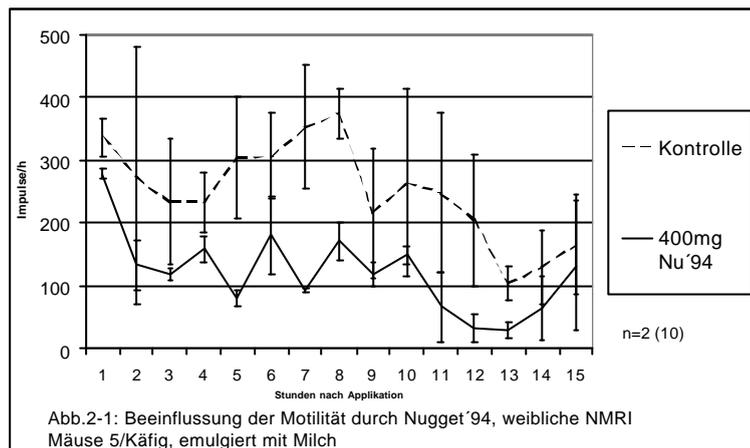


schlechte Reproduzierbarkeit der Methode keine quantitativen Aussagen möglich, jedoch verlängern die getesteten Extrakte oder Mischungen aus Extrakten die Schlafzeit in diesem Modell, so daß eine metabolische Interaktion mit dem Narkosemittel als Ursache der Verlängerung der Schlafzeit ausgeschlossen werden kann.

4.1.2 Testung auf Beeinflussung der Motilität

4.1.2.1 Motilitäts-Meßsystem

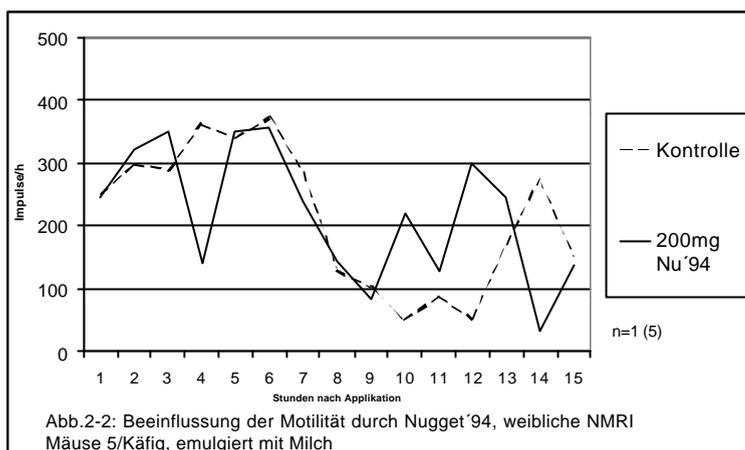
Hopfen-Extrakte Nugget '94 und Nugget '98/Nov '98



Als Scening-Testverfahren auf zentral sedierende Aktivität wurden Motilitäts-Messungen an Mäusen durchgeführt. Um über längere Zeit die Beeinflussung der Motilität durch Hopfenextrakte messen zu können und damit Hinweise auf Wirkeintritt und Dauer zu

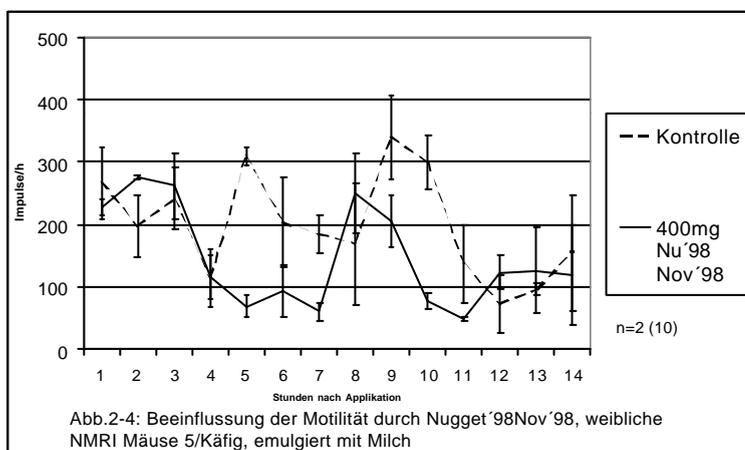
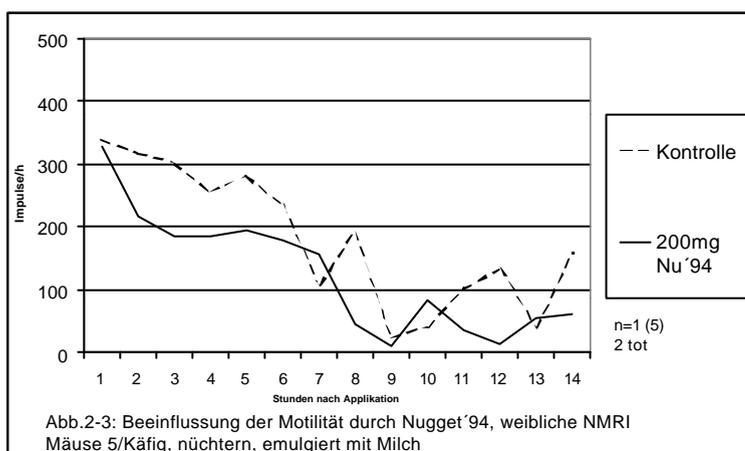
erhalten, wurde die Aktivität der Tiere mit dem Motilitäts-Meßsystem überprüft. Abb.2-1 zeigt die Motilität von weiblichen NMRI Mäusen nach oraler Gabe von 400 mg/kg KG Nu'94. Der Extrakt wurde nach der Methode "Lösung in Milch unter Erwärmen" emulgiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Unterbrechungen der Lichtschranken pro Stunde angegeben, auf der Abzisse die Zeit in Stunden nach der Sondierung. Da am Anfang der Arbeit nur 2 Lichtschrankenkäfige zur Verfügung standen, wurden zur Erhöhung der n-Zahl jeweils 5 Mäuse auf einmal in jeden Käfig gesetzt. Der Versuch wurde 2 mal durchgeführt und die Werte gemittelt. Als später 8 Käfige zur Verfügung standen, wurde die Strategie mit mehreren Mäusen/Käfig nicht weitergeführt, da 5 Mäuse in einem Käfig eine geringere Impulsanzahl verursachen als die gemittelten Werte von 5 Mäusen in 5 Käfigen. Ursache ist, daß die Passierung von 2 Mäusen gleichzeitig nur als 1 Impuls erfaßt werden kann. Diese Tatsache muß beim Vergleich mit späteren Versuchen beachtet werden. Aus den in Abb. 2-1 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß der Nu'94 einen Motilitäts-senkenden Effekt hat, der zwei Stunden nach Sondierung einsetzte und bis zu 12 Stunden anhält. Der Anstieg der Motilität in der Kontrollgruppe 4 Stunden nach Sondierung, das ist nach dem Ausgehen des Lichtes im Tierhauses, unterblieb in der mit Nu'94 behandelten Gruppe.

Danach wurde die Dosis halbiert und der Versuch unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Abb.2-2 zeigt, daß die Reduktion der Motilität deutlich weniger ausgeprägt war. Ein Effekt ist nur zwischen drei und fünf Stunden nach Applikation sichtbar. Um zu



untersuchen, ob die Magenfüllung einen Einfluß auf die Wirkstärke des Extraktes hat, wurde die Dosis von 200 mg/kg KG an nüchternen Mäusen getestet (Abb.2-3). Zwei Mäuse starben in der Verum-Gruppe. Die Motilität wurde ebenfalls gesenkt, jedoch kann nicht eindeutig unterschieden werden, ob das eine Folge des Extraktes war, oder ob es daran lag, daß nur noch die Impulse von drei Mäusen gezählt wurden. Bei einem Vorversuch mit 250 mg/kg KG des gleichen Extraktes waren ebenfalls zwei von fünf nüchternen Mäusen gestorben.

Wird der Extrakt auf nüchternen Magen appliziert, wirkt er offensichtlich toxisch bei NMRI Mäusen. Um zu untersuchen, ob auch andere CO₂-Extrakte der Sorte Nugget die Spontanmotilität zu beeinflussen vermögen, wurde im selben Modell der Extrakt Nugget'98 Nov'98 geprüft (Abb.2-4). Das Rohmaterial des Extraktes stammte aus der Hopfen-Ernte 1998, die Extraktion wurde im November 1998 durchgeführt. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wie bei Nugget'94



(Abb.2-1), senkte auch dieser Extrakt die Motilität, wenn anscheinend auch nicht in dem Ausmaß wie Nugget'94. Die Wirkung setzte erst viel später, nach ca. vier Stunden ein und der Effekt war nicht so langanhaltend. Da zu den beiden Extrakten keine näheren Spezifikationen vorlagen und unklar ist, welche Inhaltsstoffe für die sedierende Aktivität verantwortlich sind, kann über eine Erklärung nur spekuliert werden.

Hopfen-Extrakte der Ernten 1997 und 1998

Ob eine Abhängigkeit zwischen der sedierenden Aktivität und der Hopfen-Sorte oder dem Erntejahr besteht, wurde an Extrakten aus den Jahren 1997 und 1998 untersucht. Aus den Bittersorten Hallertauer Magnum, Northern Brewer und Nugget sowie aus den Aromasorten Perle, Spalter Select und Hersbrucker Spät wurden verschiedene Extrakte hergestellt, die sich in Erntejahr, Extraktionszeitpunkt und z.T. in der Extraktionsart unterscheiden. Um eine Übersicht über die motilitätshemmende Wirkung zu erhalten, wurden zunächst alle Extrakte getestet. Das Ergebnis zeigt Tab. 2-5. Zu diesem Zeitpunkt standen 4 Meßkäfige zur Verfügung, so daß immer eine Kontrollgruppe mit 3 verschiedenen Verum-Gruppen verglichen wurde. In Tab. 2-5 gehören immer vier Zeilen zu einem Versuch. In der ersten Spalte steht der Name des Extraktes, in der zweiten die Anzahl der Zählimpulse innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation, in der zweiten Spalte die Anzahl innerhalb der zweiten Stunde usw.. In der letzten Spalte ist die Summe der Impulse über die gesamte Versuchszeit von 13 Stunden aufgeführt. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig wurde auf drei Tiere reduziert, um fehlende Zählimpulse zu vermeiden, wenn zwei Mäuse gleichzeitig eine Lichtschranke passieren. Es wurden 400 mg/kg KG je Extrakt oral appliziert, die Emulgiermethode war bei allen Versuchen "Milch unter Erwärmen". Bei Betrachtung von Tab. 2-5 wird deutlich, daß Aktivitäten in den Kontrollgruppen sehr unterschiedlich waren. Das erschwerte die Beurteilung der dazugehörigen Behandlungsgruppen. Trotzdem wurde versucht, eine grobe Einteilung in wirksam und wenig wirksam vorzunehmen. Perle'98 März'99, Perle'97 Juni'98 ölreich, Hersbrucker Spät'98 Dez'98 und Magnum'98 März'99 wurden als wirksam eingestuft, da sie die Motilität gegenüber der jeweiligen Kontrolle über mehrere Stunden deutlich senkten. Der Effekt setzte mit Ausnahme von Magnum'98

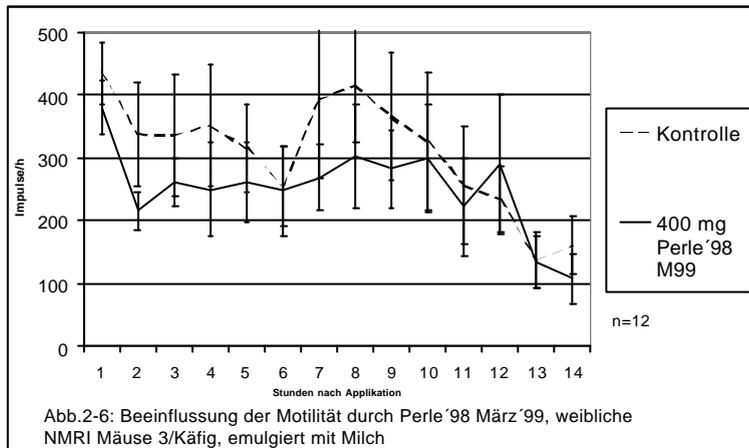
Stunden nach Applikation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Summe
Kontrolle (Milch)	1137	889	725	654	589	487	542	476	183	17	123	694	731	7247
Hersbrucker Spät´97 Juni98 400 mg/kg	308	245	214	287	274	87	221	43	78	37	110	33	120	2057
Perle´97 Juni98 ölreich 400 mg/kg	537	216	114	94	20	55	124	37	91	59	41	68	143	1599
Spalter Select´97 April98 400 mg/kg	407	298	213	220	338	227	259	174	138	132	138	130	343	3017
Kontrolle (Milch)	321	289	407	292	206	184	256	257	76	130	245	279	381	3323
Magnum´98 März99 400 mg/kg	231	148	225	136	38	75	118	11	59	44	96	54	50	1285
Northern Brewer´98 Dez98 400 mg/kg	418	316	215	90	159	137	57	86	75	69	44	197	184	2047
Perle´97 Juni98 400 mg/kg	483	381	293	119	235	204	93	38	71	29	170	79	171	2366
Kontrolle (Milch)	326	366	354	323	319	258	95	267	294	326	338	420	404	4090
Perle´98 März99 400 mg/kg	299	170	74	72	91	35	83	117	14	55	14	47	86	1157
Perle´98 März99 ölarm 400 mg/kg	421	393	302	209	182	227	132	274	74	41	56	170	233	2714
Perle´98 März99 ölreich 400 mg/kg	238	290	244	246	212	191	172	75	58	145	34	142	53	2100
Kontrolle (Milch)	165	42	321	376	410	215	327	438	25	22	19	149	13	2522
Hersbrucker Spät´98 Dez98 100 mg/kg	436	281	142	249	245	213	157	344	169	87	33	61	233	2650
Perle´98 März99 400 mg/kg	257	45	144	74	91	74	52	14	45	14	10	6	42	868
Northern Brewer´98 Nov98 400 mg/kg	353	197	146	208	124	199	126	180	226	70	179	236	277	2521
Kontrolle (Milch)	310	295	402	302	271	124	108	418	57	221	91	44	50	2693
97021 Bitterstoffphase 400 mg/kg	251	192	208	181	179	272	143	91	130	161	206	92	92	2198
Magnum´98 Okt98 400 mg/kg	312	169	124	268	205	137	198	121	125	187	80	72	67	2065
Hersbrucker Spät´98 Dez98 400 mg/kg	512	169	131	84	60	108	51	33	16	61	37	29	31	1322

Tab.2-5: Testung auf Beeinflussung der Motilität verschiedener Hopfenextrakte der Ernten 1997/98, weibl. NMRI Mäuse 3/Käfig, emulgiert mit Milch

März´99 mit einer Verzögerung von ein bis zwei Stunden ein. Als wenig wirksam wurden Magnum´98 Okt´98, Hersbrucker Spät´97 Juni´98, Perle´97 Juni´98, Northern Brewer´98 Dez´98, Spalter Select´97 April´98, Northern Brewer´98 Nov´98, Perle´98 März´99 ölarm und ölreich eingestuft. Die Motilität in den behandelten Gruppen wurde gesenkt, aber deutlich weniger stark ausgeprägt als in den als "wirksam" eingestuften Extrakten.

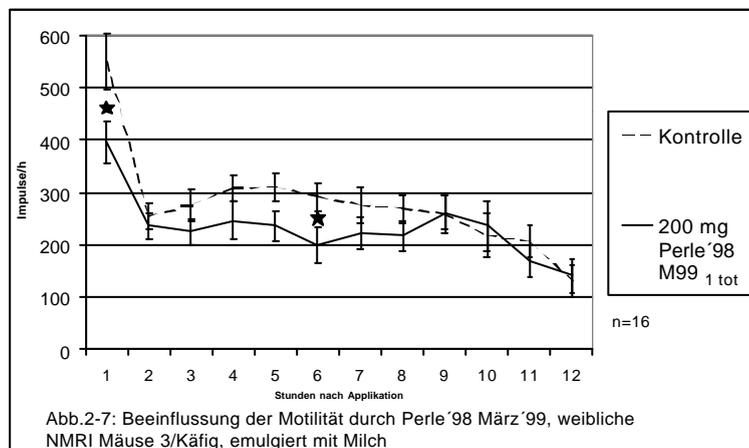
Der sedierende Effekt scheint nach einer groben Voruntersuchung (Tab.2-5) nicht von der Sorte oder Sortenart abhängig zu sein, da als wirksam eingestufte Extrakte sowohl aus der

Aromasorte Perle (Perle´98 März´99 und Perle´97 Juni´98 ölreich) als auch aus den Bittersorten Magnum und Hersbrucker (Magnum´98 März´99 und Hersbrucker Spät´98 Dez´98) gewonnen wurden. Extrakte aus der gleichen Sorte eines Jahrganges zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert, scheinen nicht die gleiche Wirkung zu haben (Magnum´98 März´99 und Magnum´98 Okt´98). Daher ist es nicht erkennbar, ob es Unterschiede in der Wirkung abhängig vom Jahrgang gibt. Welche Rolle die bekannten Inhaltsstoffgruppen der Humulone und Lupulone bei der Wirkung spielen, wird nicht klar, da laut Hersteller der Extrakt Perle´97 Juni´98 ölreich arm an Humulonen und Lupulonen ist, der Extrakt Magnum´98 hingegen reich.

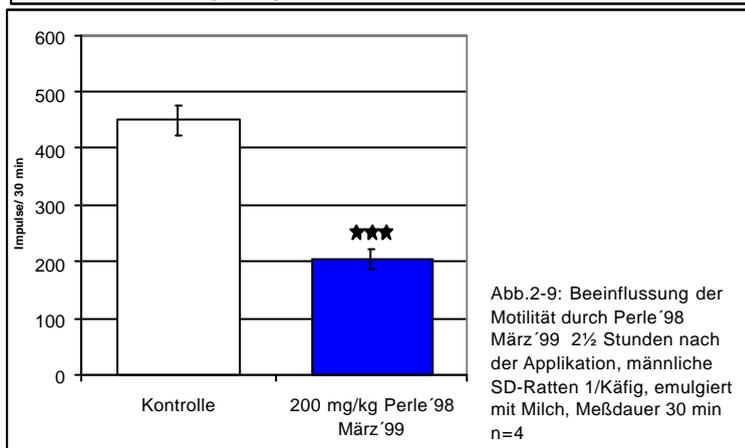
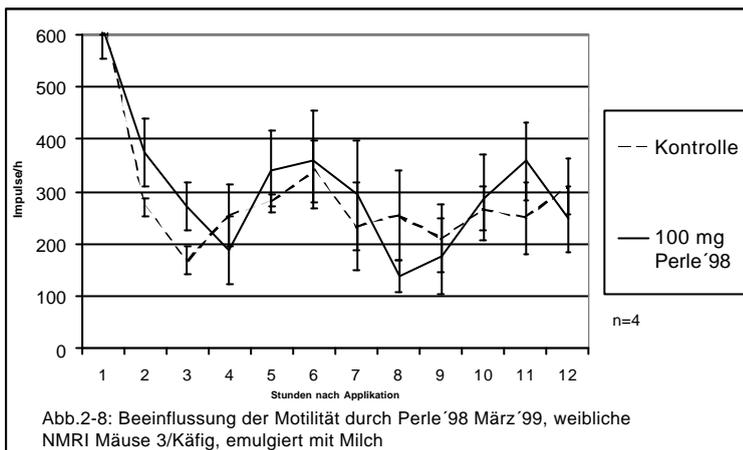


Der als wirksam eingestufte Extrakt Perle´99 März´99 wurde genauer untersucht, um die Wirkung auf Dosisabhängigkeit der Effekte zu prüfen. Abb.2-6 zeigt die Beeinflussung der Motilität nach oraler Gabe von 400 mg/kg KG (n=12). Die übrigen Versuchs-

bedingungen entsprachen mit 3/NMRI Mäusen pro Käfig und einer Emulsion mit Milch den Versuchsbedingungen in Abb.2-5. Die Motilität in der mit Perle behandelten Gruppe wurde tendenziell gesenkt, die Wirkung setzte erst nach ca. zwei Stunden ein. Wegen der starken Streuung in der Kontrollgruppe unterschieden sich die Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant. Nach ca. 9 Stunden waren beide Gruppen wieder auf ähnlichem Aktivitätsniveau. Danach wurde die Dosis halbiert und unter den gleichen Bedingungen



gemessen. Wie Abb.2-7 zeigt, bewirkten 200 mg/kg KG Perle´99 März´99 eine Reduktion der Motilität. Der Effekt war ebenfalls sehr langanhaltend. Durch die homogenere Aktivität der Kontrolltiere war der Unterschied nach 1 und



nach 6 Stunden signifikant ($p < 0,05$). Ein Tier starb in der mit Perle behandelten Gruppe 45 Minuten nach der Applikation. Eine Dosis von 100 mg/kg KG bewirkte keine Senkung der Motilität (Abb.2-8). Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen unterschieden sich die Aktivitäten von Kontroll- und Hopfenextrakt-Gruppe nicht. Um zu überprüfen, ob Perle'98 März'99 auch die Motilität anderer Tier-Spezies beeinflusst, wurde der Extrakt an männlichen SD-Ratten getestet. Es wurde eine Dosis von 200 mg/kg KG emulgiert in Milch appliziert. In dem Versuch sollte zusätzlich überprüft werden, ob das „klassische“ Open Field und das Motilitäts-Meßsystem qualitativ gleiche Aussagen liefern. Deshalb wurde die Aktivität der Tiere zuerst im Open Field und danach in den Lichtschrankkäfigen ermittelt. Die Ergebnisse des Open Field sind in Abb. 5-3 dargestellt. In beiden Modellen bewirkte die Gabe des Extraktes eine signifikante Senkung der Motilität gegenüber den Kontrolltieren auf 64 % im Open Field bzw. auf 47 % in den Lichtschrankkäfigen.

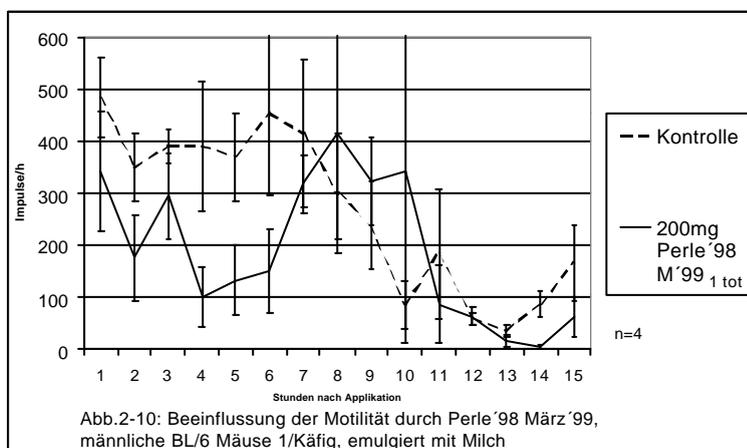
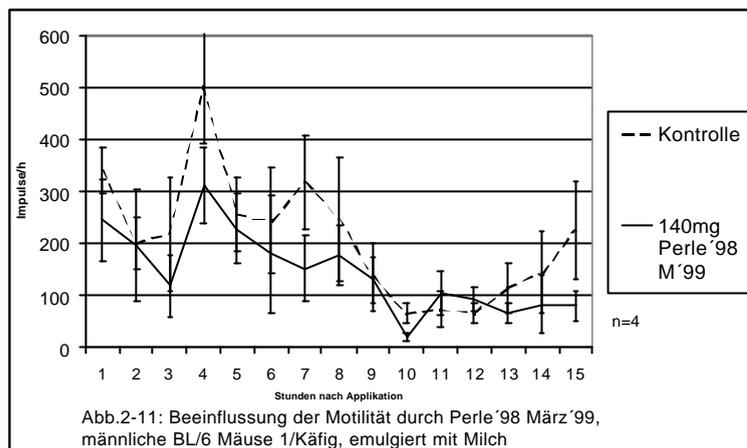


Abb.2-10 zeigt die Motilität von männlichen BL/6-Mäusen nach Gabe von Perle'98 M'99. BL/6-Mäuse besitzen im Gegensatz zu NMRI eine höhere Grundaktivität, deshalb wurde hier nur eine Maus pro Käfig verwendet. Unter sonst

gleichen Versuchsbedingungen wurden 200 mg/kg KG appliziert. Ein Tier starb nach 45 Minuten, ein weiteres bewegte sich im Zeitraum zwischen 3 und 5 Stunden nach der Applikation nicht. Die Motilität der behandelten Tiere wurde sofort gesenkt, der



Effekt hielt etwa 6 Stunden an. Offensichtlich reagieren männliche BL/6-Mäuse empfindlicher auf den Extrakt als NMRI-Mäuse, eine Dosis von 200 mg/kg KG wirkt bereits toxisch. Deshalb wurde die Dosis reduziert und der Versuch wiederholt (Abb.2-11). Nach Gabe von 140 mg/kg KG starb kein Tier, jedoch wurde die Motilität gegenüber der Kontrollgruppe nur wenig gesenkt. Die Aktivität der Kontrolltiere war allerdings geringer als in Abb.2-10, so daß ein direkter Vergleich schwierig ist.

Der Extrakt Perle '99 März '99 senkt in einer Dosis von 200 mg/kg KG die Motilität. Der Effekt ist sowohl bei weiblichen NMRI Mäusen, bei männlichen SD-Ratten als auch bei BL/6 Mäusen sichtbar. Jedoch erreicht die Wirkung erst nach 4 bis 6 Stunden ihr Maximum und ist sehr langanhaltend. Der Extrakt verursacht in einer Dosierung von 200 mg/kg KG sowohl bei NMRI als auch BL/6 Mäusen toxische Erscheinungen.

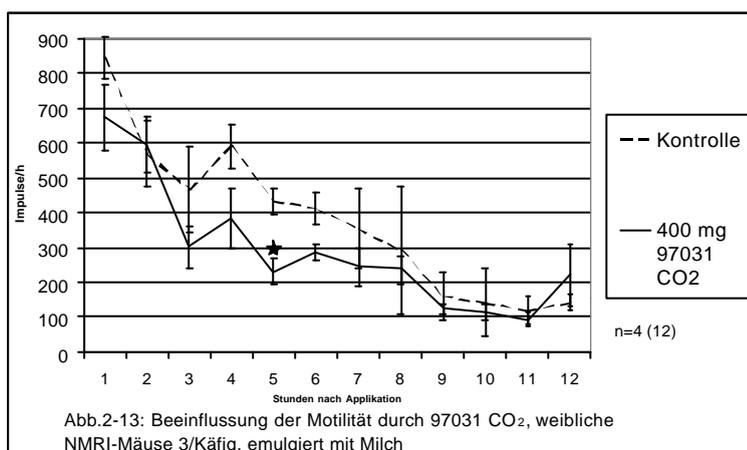
Hopfen-Extrakte 97 031 CO₂, 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase

Da einige Extrakte im Verlauf der Arbeit immer wieder getestet wurden, aber sowohl Emulgiermethode als auch das Lichtschrankensystem immer weiter entwickelt wurden, unterscheiden sich die Versuche hinsichtlich Tieranzahl pro Käfig, Lösungsmittel und Software-Einstellung. Tab.2-12 zeigt das Ergebnis eines vergleichenden Versuches zwischen allen drei Extrakten mit 3 Mäusen pro Käfig und der Emulgiermethode "Lösung in Milch". In den Spalten ist die Anzahl der Impulse pro Stunde angegeben, in der letzten Spalte die Summe der Impulse über den ganzen Versuch. Durch alle Extrakte wurde die Motilität gegenüber der Kontrollgruppe in der ersten Stunde nach der Applikation gesenkt, in der

Stunden nach Applikation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Summe:
Kontrolle (Milch)	340	201	224	312	293	56	364	373	189	154	67	79	241	2893
97021 Bitterstoffphase 400 mg/kg	240	218	217	298	481	207	479	94	311	100	51	45	172	2913
97031 CO ₂ -Extrakt 400 mg/kg	237	350	293	148	243	224	314	63	12	72	86	24	52	2118
97021 Gerbstoffphase 400 mg/kg	254	290	452	220	293	295	186	262	201	104	50	74	210	2891

Tab.2-12: Testung auf Beeinflussung der Motilität, weibl. NMRI Mäuse 3/Käfig, emulgiert mit Milch

zweiten Stunde stieg sie in der CO₂-Extrakt- und der Gerbstoffphasen-Gruppe aber wieder an, während sie in Bitterstoffphasen-Gruppe drei Stunden lang gesenkt blieb. Etwa neun Stunden nach Applikation des CO₂-Extraktes fiel die Aktivität in dieser Gruppe stark ab und blieb bis zum Ende des Versuches auf niedrigem Niveau, deshalb war auch die Gesamtaktivität über den Zeitraum des Versuches (Summe) gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Da das Ergebnis durch die geringe n-Zahl nur Hinweise geben kann, wurden die Extrakte wiederholt getestet. Ab diesem Versuch wurde eine verbesserte Ansteuerungs-Routine für die digitale I/O-Karte verwendet, mit der eine empfindlichere Auswertung der Impulse möglich

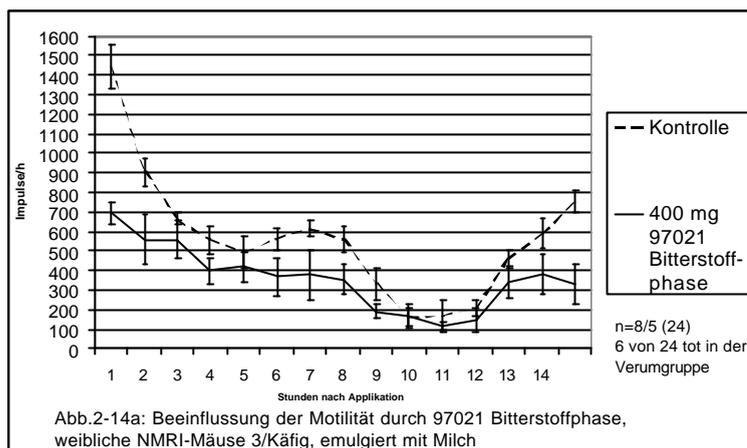


war. Die gemessene Aktivität ist daher nicht direkt mit vorherigen Versuchen vergleichbar. Abb.2-13 zeigt das Ergebnis für den CO₂-Extrakt 97031. Die Skala für Impulse/h mußte wegen der Software- Umstellung und der hohen Anfangsaktivität auf 900 Impulse/h

erweitert werden. Die Aktivität in der mit Extrakt behandelten Gruppe war in der ersten Stunde nicht signifikant unter Kontrollniveau. Sie blieb von der 3. bis zur 7. Stunde nach Applikation unter Kontrollniveau, in der 5. Stunde der Unterschied zum Kontroll-Kollektiv signifikant. Die Wirkung war mit ca. 7 Stunden langanhaltend, aber nicht so ausgeprägt wie im Vor-Versuch angedeutet. Insgesamt besitzt der Extrakt nur einen mäßig hemmenden Effekt auf die Motilität von weiblichen NMRI-Mäusen.

Abb.2-14a zeigt das Ergebnis der gleichen Dosierung des Extraktes 97021 Bitterstoffphase. Der Versuch wurde zweimal mit je n=12 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Zwar liegt die

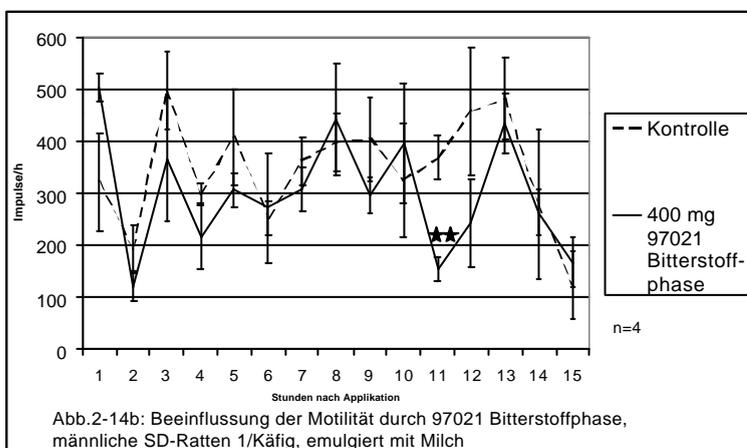
Aktivität der Verumgruppe vor allem zu Beginn deutlich unter dem Niveau der Kontrollgruppe, jedoch verstarben 25 % (6/24) der mit Extrakt behandelten Tiere. Die Lichtschrankenkäfige, in denen Tiere starben, wurden nicht gewertet, eine statistische Aussage zur

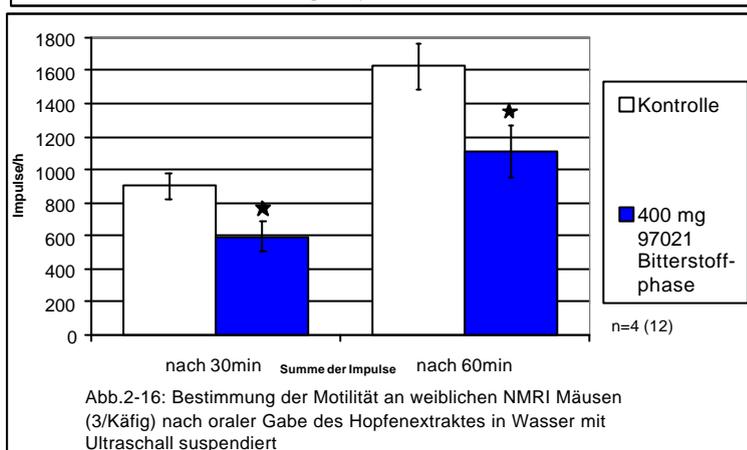
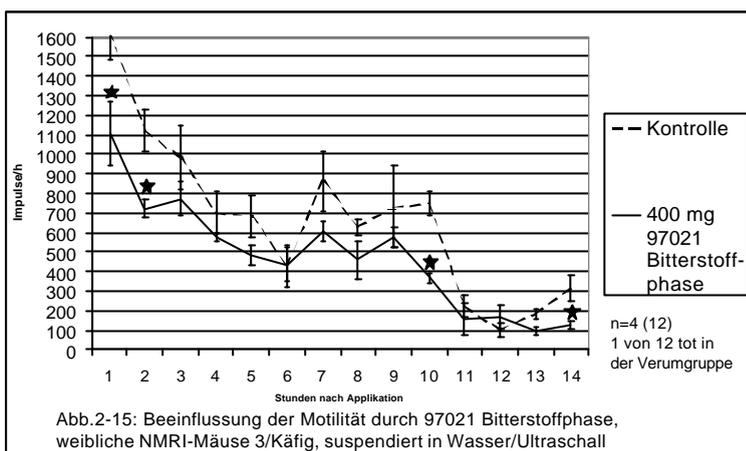


sedierenden Aktivität schien aber nicht sinnvoll, da nicht klar war, ob die übrigen Mäuse sediert waren oder aufgrund einer bereits toxischen Wirkung inaktiver waren.

Um die Wirkung bei anderen Mausstämmen zu untersuchen, wurden männliche BL/6-Mäuse verwendet. Der Extrakt wurde mit der Methode "Lösung in Milch" emulgiert und eine Dosis von 400 mg/kg KG appliziert. Die Gruppenstärke betrug n=4 Tiere. 3 Tiere in der mit 97021 Bitterstoffphase behandelten Tiere verstarben nach 30-90 Minuten. Das 4. Tier war stark beeinträchtigt, es bewegte sich in den folgenden 10 Stunden kaum. Offensichtlich reagieren männliche BL/6-Mäuse auf den Extrakt viel empfindlicher als weibliche NMRI-Mäuse, eine Dosis von 400 mg/kg KG wirkt fast zu 100 % letal.

Um die Wirkung an anderen Tierspezies zu untersuchen, wurde 97021 Bitterstoffphase unter sonst gleichen Versuchsbedingungen männlichen SD-Ratten appliziert (Abb.2-14b). Initial bewirkte der Extrakt tendenziell eine Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe, 11 Stunden nach der Applikation war die Verum-Gruppe für eine Stunde ruhiger. Der Effekt ist signifikant, kann jedoch durch die hohe Streuung innerhalb der Gruppen und die geringe n-Zahl auch Zufall sein. Warum die mit Extrakt behandelten Ratten zu Beginn aktiver waren, blieb unklar, könnte aber mit dem extrem bitteren Geschmack des Extraktes zu tun haben. Insgesamt bewirkte eine Dosis von 400 mg/kg KG keine erkennbare Sedierung bei männlichen SD-Ratten.



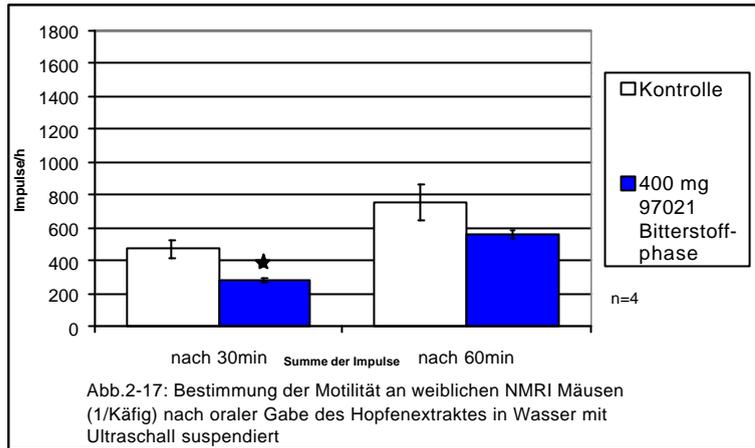


Die immer wieder beobachtete Toxizität von 97021 Bitterstoffphase, in Milch verabreicht, war sehr unerwartet. Daher sollte untersucht werden, ob mit einem anderen Lösungsmittel in ähnlichen Dosierungen ebenfalls sedierende oder toxische Effekte auftraten. Daher wurde der Extrakt 97021 Bitterstoffphase mit der Methode "Suspension in Wasser mit Ultraschall" in eine applikationsfähige Form gebracht. Abb.2-15 zeigt das Ergebnis nach Gabe von 400 mg/kg KG. Die Motilität in der

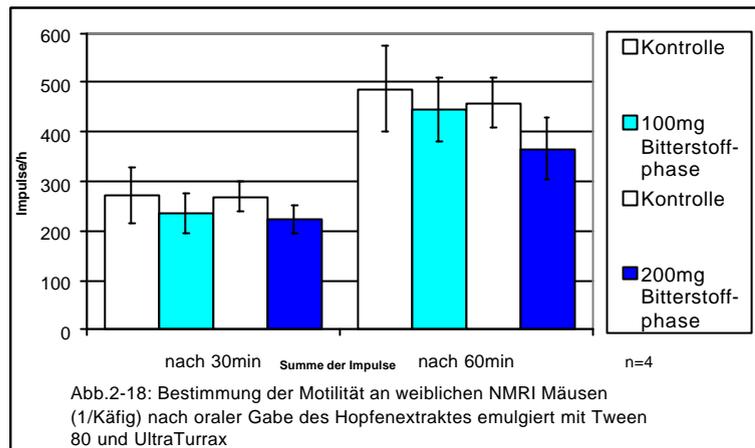
Verumgruppe wurde in den ersten beiden Stunden signifikant gesenkt und liegt danach tendenziell unter Kontrollniveau, nach 10 und 14 Stunden noch einmal signifikant. Ein Tier starb in der Verumgruppe. Das Ergebnis des Versuches ähnelte dem Ergebnis des Versuches mit der Emulsion in Milch (Abb.2-14a), jedoch wirkte der Extrakt als Suspension in Wasser gegeben deutlich weniger toxisch. Betrachtet man nur die erste Stunde nach der Applikation (Abb.2-16), so erkennt man, daß die Wirkung sehr schnell einsetzte, da bereits nach 30 Minuten die Aktivität in der Kontroll- und Verumgruppe signifikant verschieden war. Die Differenz betrug 305 Impulse nach 30 Minuten und stieg auf 517 Impulse nach 1 Stunde.

Danach wurde versucht, ob sich das Ergebnis auch mit nur einer Maus pro Käfig reproduzieren ließ. Wie Abb.2-17 zeigt, erhält man ungefähr die Hälfte der Impulse in der Kontrollgruppe im Vergleich zum Versuch Abb.2-16 mit 3 Mäusen pro Käfig. In den ersten 30 Minuten nach Applikation des Extraktes war die Motilität in der Verumgruppe signifikant erniedrigt, nach 60 Minuten war der Effekt bereits vorbei, denn die Differenz zwischen der Motilität der Verum- und Kontrollgruppe nach 30 Minuten (185 Impulse) vergrößerte sich

nur marginal im Vergleich zur Differenz nach 1 Stunde (194 Impulse). Da das Ergebnis der Aussage des vorherigen Versuches mit drei Mäusen pro Käfig entspricht, ist es auch möglich, mit nur einer Maus pro Käfig zu messen.

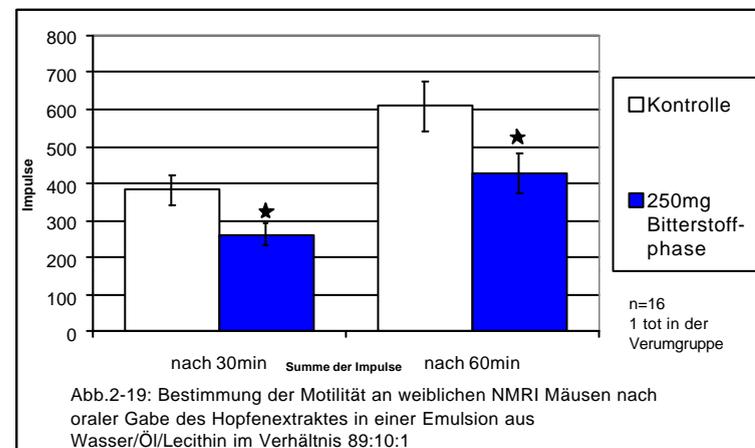


Der Extrakt wurde in geringeren Dosierungen auch mit den Methoden "Lösung mit Tween 80 und UltraTurrax" und "Lösung mit Öl, Lecithin und UltraTurrax" getestet. Abb.2-18 stellt die Ergebnisse von zwei Versuchen da, in denen



eine Dosis von 100 oder 200 mg/kg KG getestet wurde. Dargestellt ist die Aktivität der Kontrollgruppe und der Verumgruppe jeweils nach 30 und 60 Minuten. Innerhalb von 30 Minuten nach der Applikation senkte weder eine Dosis von 100 noch von 200 mg/kg KG signifikant die Motilität. Nach einer Stunde senkte die Dosis von 200 mg/kg KG die Motilität tendenziell, nach Gabe von 100 mg/kg KG blieb sie unverändert. Senkt man die Dosis von 97021 Bitterstoffphase auf 200 mg/kg KG ist die sedierende Wirkung nur noch schwach ausgeprägt, bei 100 mg/kg KG ist sie nicht mehr meßbar.

Die Ergebnisse der Dosiserhöhung auf 250 mg/kg KG emulgiert mit der Methode "Lösung mit Öl, Lecithin und UltraTurrax" stellt Abb.2-19 dar. In der



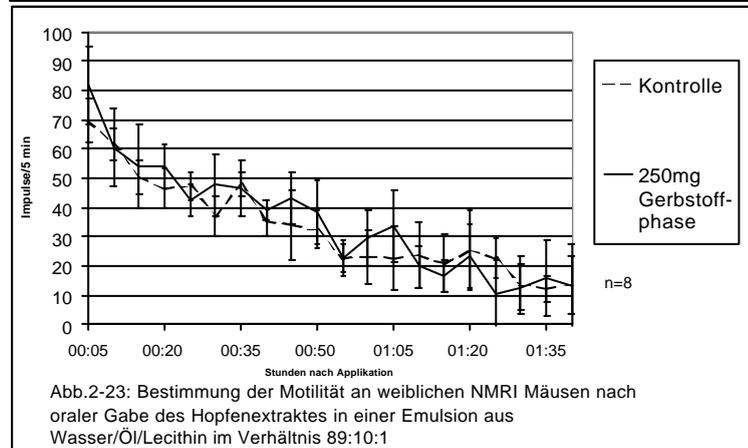
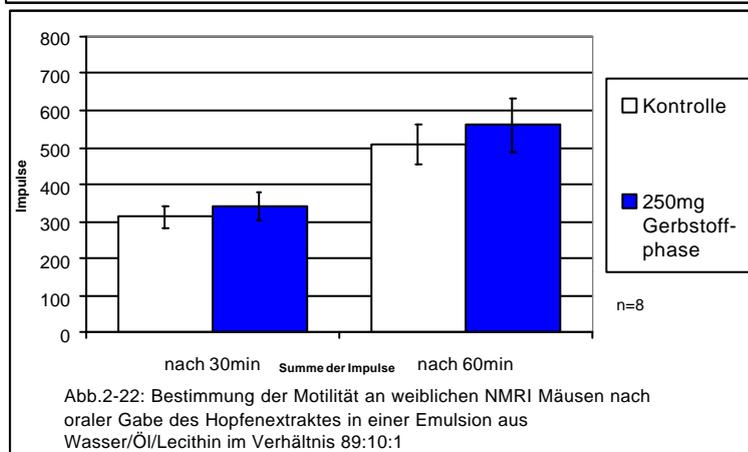
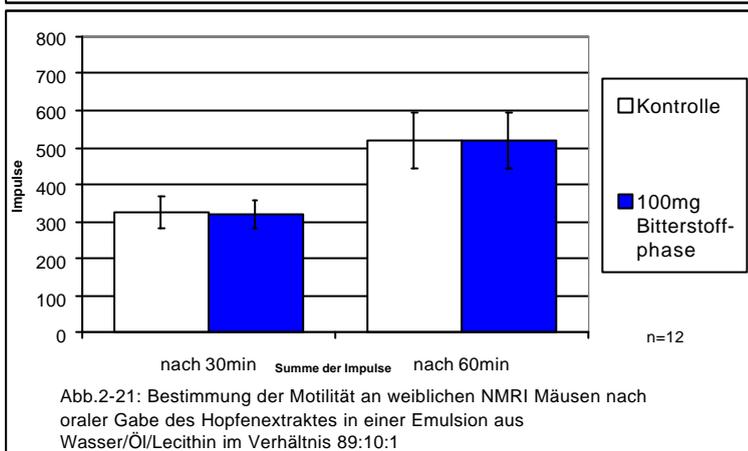
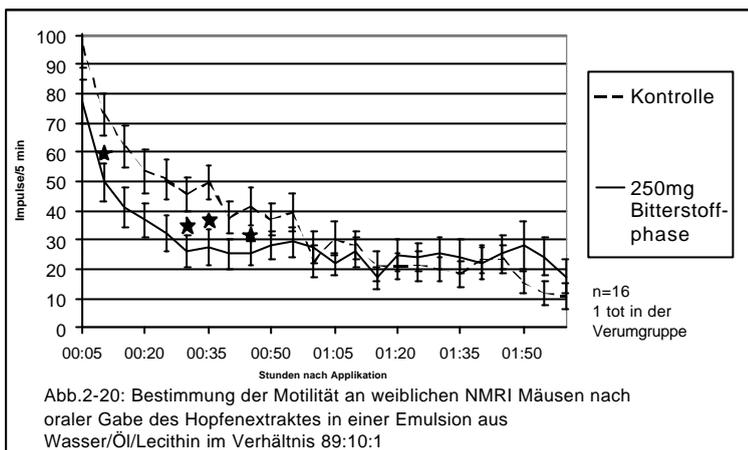


Abbildung sind vier Versuche zusammengefaßt, daher die hohe n-Zahl. Sowohl im Zeitraum 30 als auch 60 Minuten nach der Applikation war die Motilität in der Verumgruppe signifikant gesenkt. Ein Tier starb in der mit Extrakt behandelten Gruppe. Die Frage, ob der Effekt nach einer Stunde zu Ende war, beantwortet Abb.2-20. Dort ist der Versuch aus Abb.2-19 mit einer erweiterten und feineren Zeit-Skala dargestellt. Offensichtlich setzte der Effekt sehr schnell nach 5 bis 10 Minuten ein und hielt eine Stunde lang an, bzw. dann fiel die Aktivität der Kontrollgruppe auf das Niveau der Verumgruppe. Der sedierende Effekt war im Intervall nach 10, 30, 35 und 45 Minuten signifikant ($p < 0,05$). Nach 2 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde eine Dosis von 100 mg/kg KG getestet (Abb.2-21). Auch hier sind drei Versuche zusammengefaßt. Ähnlich wie nach Gabe der gleichen Dosis emulgiert

mit Tween 80 (Abb.2-18) wurde die Motilität nicht beeinflusst. Bei einer Dosis von 100 mg/kg KG traten weder sedierende noch toxische Effekte auf.

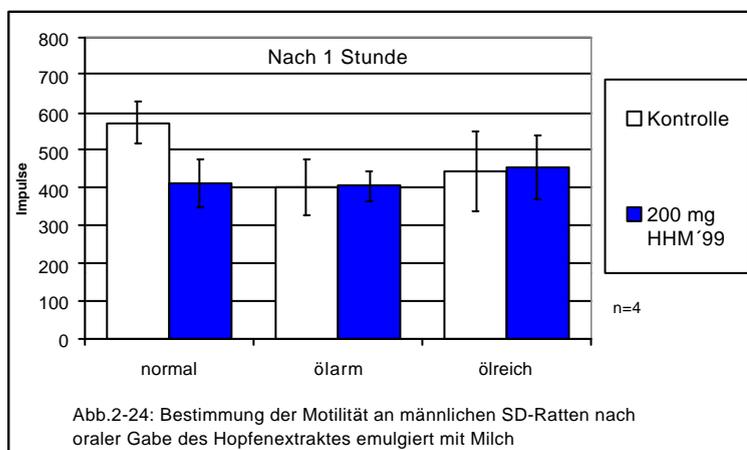
Abb.2-22 zeigt das Ergebnis der Testung von 250 mg/kg KG 97021 Gerbstoffphase. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie im Versuch von Abb.2-19, bewirkte der Extrakt keine Veränderung der Motilität. Auch nach längerer Latenzzeit deutete sich kein Effekt an (Abb.2-23). Kein Tier starb oder wies Intoxikationssymptome auf. Offensichtlich sind die Inhaltsstoffe, die bei der gleichen Dosis Bitterstoffphase einen sedierenden Effekt bewirkten (Abb.2-19) lipophil und nicht in der hydrophilen Gerbstoffphase enthalten.

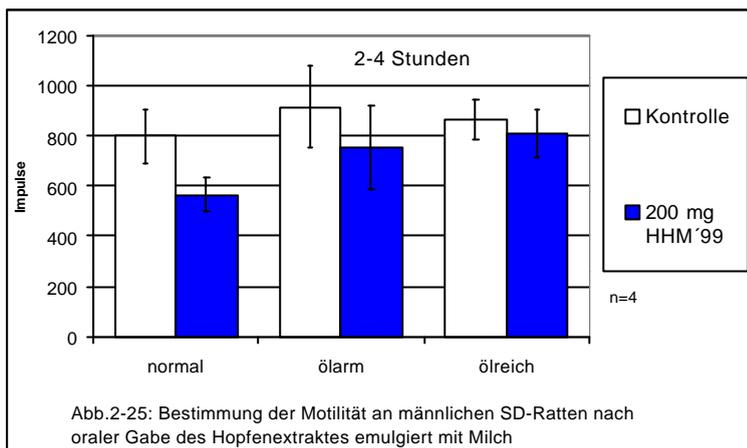
Hopfen-Extrakte der Ernte 1999

Mit den drei Sorten Hersbrucker, Magnum und Perle wurde weitergearbeitet. Aus der Ernte 1999 wurden jeweils drei Extrakte hergestellt, ein Normalextrakt, eine ölarme- und eine öltreiche Fraktion.

1) Ergebnisse mit unterschiedlichen Extrakten der Sorte Magnum

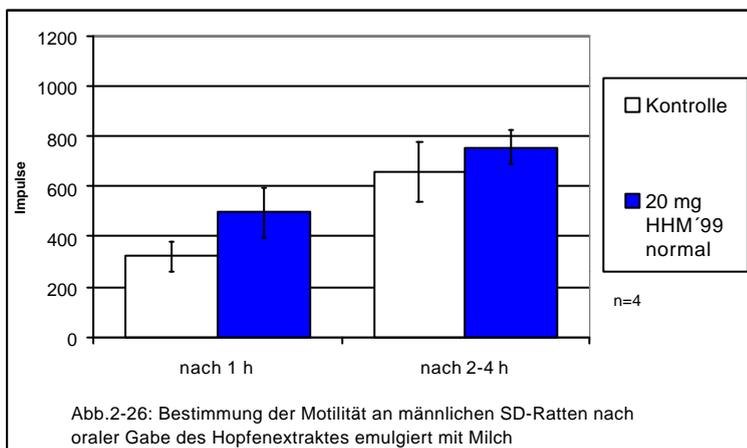
Die Extrakte wurden zuerst an SD-Ratten in einer Dosis von 200 mg/kg KG getestet. Die Emulsionen wurden mit der Methode "Lösung in Milch" hergestellt. Abb.2-24/25 zeigen die Motilität gemessen als Summe der Impulse nach 1 Stunde und den anschließenden 3 Stunden (in der Abbildung als 2-4 Stunden bezeichnet). Innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation (Abb.2-24) senkte nur der Normalextrakt die Motilität um 28 % (573 vs. 411), die Gabe der beiden anderen Extrakte bewirkte keine Veränderung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Allerdings waren die Kontrollen dieser beiden Versuche deutlich weniger aktiv als die Kontrolle des Normalextraktes.





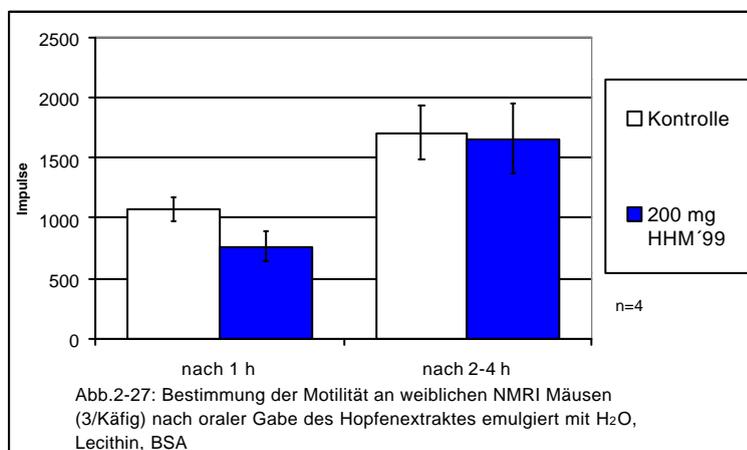
In den anschließenden 3 Stunden war die Motilität in den mit ölarm- und ölreichem Extrakt behandelten Gruppen tendenziell gesenkt (18 bzw. 7 %), in der Normalextraktgruppe wie nach 1 Stunde um 29 %. In der Normalextraktgruppe starb ein Tier 16 Stunden nach der Applikation, so daß ein toxischer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Meßwerte dieses Tieres wurden miteingerechnet, da sie bis kurz vor dem Tod keine auffallenden Unterschiede zu anderen Tieren aufwiesen.



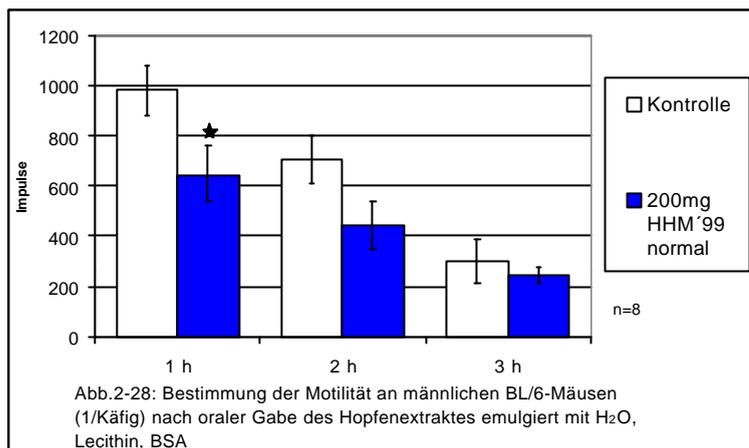
Anschließend wurde der Normalextrakt in einer 10-fach niedrigeren Dosis von 20 mg/kg KG untersucht (Abb.2-26). Diese Dosis scheint da eher motilitätssteigernd zu wirken, sowohl innerhalb der ersten Stunde als auch zwischen 2 und 4 Stunden die Motilität im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht war.

Die Ergebnisse mit diesem Extrakt an NMRI-Mäusen sind in Abb.2-27 dargestellt. Der Extrakt wurde mit der Methode "Lösung mit Lecithin, BSA und Ultraschall" emulgiert, die Dosis betrug 200 mg/kg KG.



Innerhalb der ersten Stunde war die Motilität gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt, im Intervall zwischen 2 und 4 Stunden waren beide Gruppen auf gleichem Aktivitätsniveau. Die Wirkung war nicht so lang-

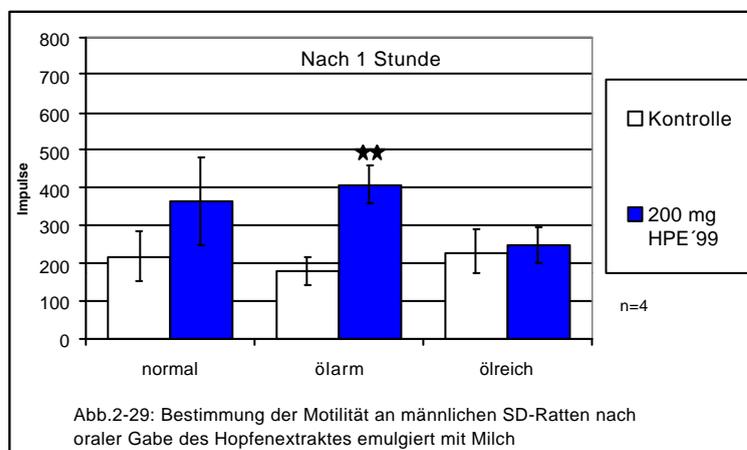
anhaltend wie bei den SD-Ratten. Abb.2-28 zeigt die Testung des Extraktes an männlichen BL/6-Mäusen in der Dosierung von 200 mg/kg KG unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Dargestellt ist die Summe der Impulse innerhalb der ersten, zweiten und dritten

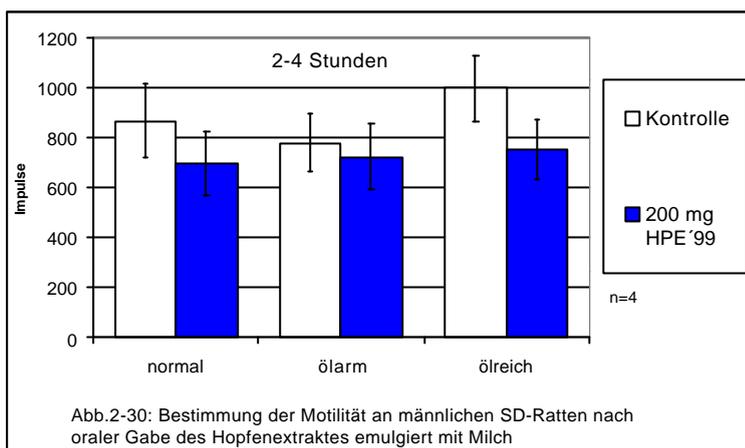


Stunde nach der Applikation. In der ersten Stunde wurde die Motilität in der mit Extrakt behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant gesenkt ($p < 0,05$). In der zweiten Stunde war der Effekt noch vorhanden, jedoch nicht mehr signifikant, in der dritten Stunde glich sich die Aktivität beider Gruppen an. Die Einzeldaten zeigen (keine Abb.), daß hier bereits zwei Tiere aus der Kontrollgruppe schliefen, deshalb ist die Dauer des sedierenden Effektes nicht klar. Insgesamt scheinen die BL/6 Mäuse wesentlich empfindlicher auf den Extrakt zu reagieren, die Motilität wurde für 1-2 Stunden gesenkt.

2) Ergebnisse mit unterschiedlichen Extrakten der Sorte Perle

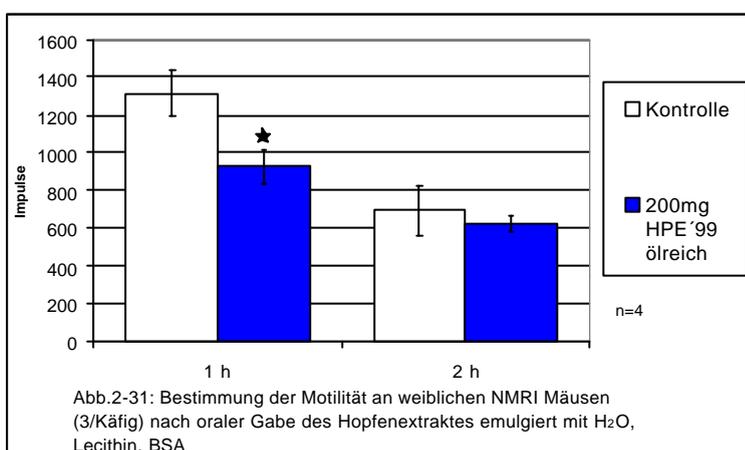
Die Extrakte wurden zunächst unter gleichen Versuchsbedingungen wie die der Sorte Magnum an männlichen SD-Ratten getestet (Abb.2-29/30). Auffallend im Gegensatz zur Sorte Magnum war der große Unterschied zwischen der 1. Stunde und den anschließenden 3 Stunden. Waren bei Magnum die Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle in beiden Zeiträumen entweder gleich oder gesenkt, bewirkte eine Dosis von 200 mg/kg KG der Sorte Perle innerhalb der ersten Stunde nach der Sondierung bei keinem Extrakt eine



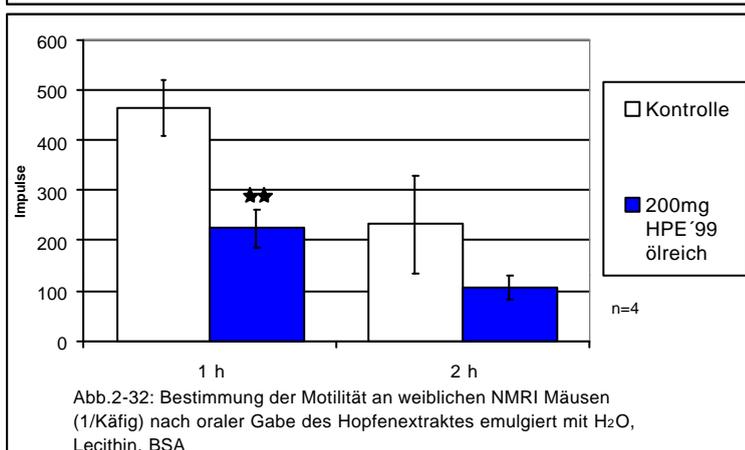


Senkung der Motilität, die Gabe des Extraktes HPE'99 ölärm sogar eine signifikante Erhöhung ($p < 0.01$). Im Zeitraum zwischen 2 und 4 Stunden war die Aktivität in den mit HPE'99 normal und öereich behandelten Gruppen dagegen leicht gesenkt, bei HPE'99

ölärm nicht. Sicher kann die Wirkung bei $n=4$ Tieren/Gruppe nicht abschließend beurteilt werden, jedoch scheint eine anfängliche Stimulierung bei einem Sedativum nicht sinnvoll, deshalb wurde nur der Extrakt HPE'99 öereich weitergetestet.

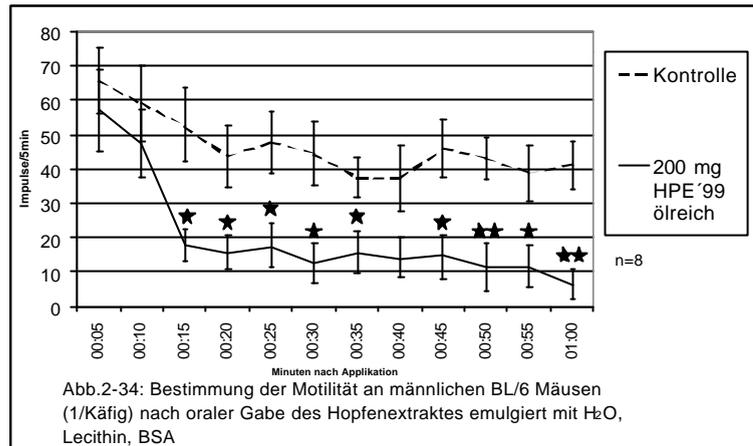
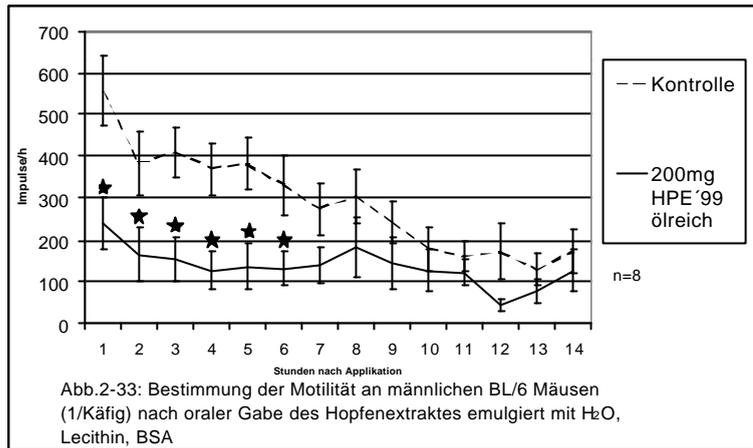


Versuche mit weiblichen NMRI-Mäusen wurden entweder mit 3 Tieren pro Käfig (Abb.2-31) oder mit 1 Tier pro Käfig (Abb.2-32) durchgeführt. In beiden Versuchen bewirkte eine Dosis von 200 mg/kg KG emulgiert mit der Methode "Lösung mit Lecithin, BSA und Ultraschall" eine signifikante Senkung der Motilität in der ersten Stunde nach der Applikation des Extraktes ($p < 0,05$ bei Abb.2-31, $p = 0,01$ bei Abb.2-32). In der zweiten Stunde war der Effekt nicht mehr signifikant (Abb.2-32)



oder nicht mehr nachweisbar (Abb.2-31). Offensichtlich bewirkte diese Dosis emulgiert mit Wasser, Lecithin und BSA bei NMRI Mäusen eine deutliche, schnell einsetzende Sedierung.

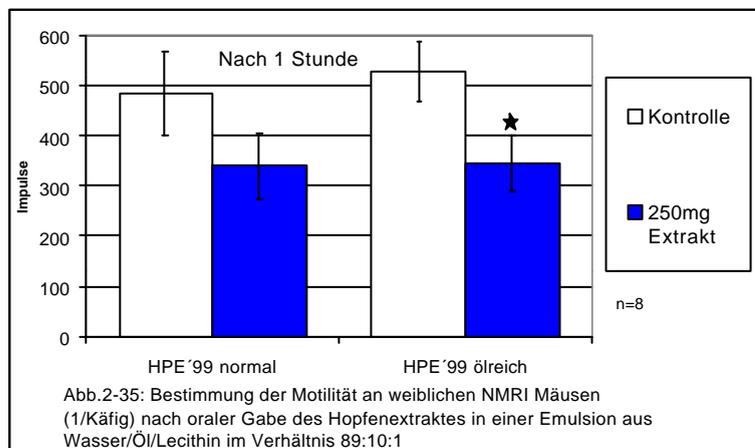
Unter gleichen Versuchsbedingungen war der Effekt bei BL/6-Mäusen stärker ausgeprägt. In Abb.2-33 ist das gesamte Versuchsergebnis über 14 Stunden dargestellt, in Abb.2-34 nur die erste Stunde. Bereits nach 15 Minuten waren die Tiere in der mit HPE'99 öleereich behandelten Gruppe signifikant ruhiger als die Kontrolltiere (53 vs.18 $p<0,05$). Der Unterschied war 6 Stunden lang signifikant ($p<0,05$), danach lag die Aktivität in der Extraktgruppe bis Versuchsende nicht signifikant unter dem Kontrollniveau.

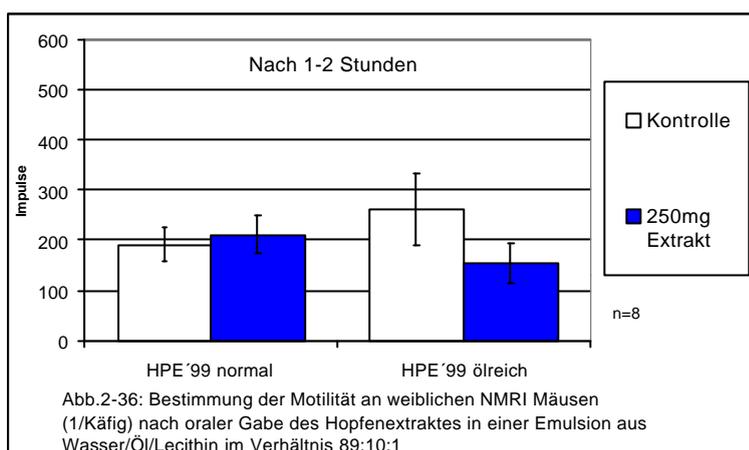


Offensichtlich reagierten die BL/6-Mäuse sehr empfindlich auf den Extrakt. Ein Tier saß über mehrere Stunden in einer Käfigecke, ohne sich zu bewegen.

Um zu untersuchen, ob die Anreicherung an Hopfenöl im öleereichem Extrakt zu einer Wirkverstärkung geführt hat, wurden gleiche Mengen an normal- und öleereichem Extrakt gegeneinander getestet. Abb. 2-35 zeigt die Beeinflussung der Motilität nach Gabe von 250 mg/kg KG des jeweiligen Extraktes emulgiert mit der Methode "Lösung mit Öl, Lecithin und UltraTurrax". Dargestellt ist

die Summe der Impulse innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation. In der mit Normal-extrakt behandelten Gruppe wurde die Aktivität auf 70 % des Kontrollniveaus gesenkt (339 vs. 486), in der mit öleereichem Extrakt behandelten

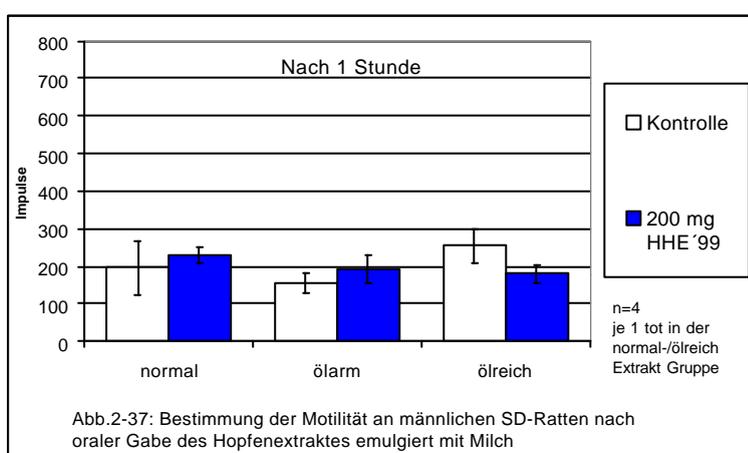




Gruppe signifikant auf 65 % (345 vs. 528; $p < 0,05$). In der zweiten Stunde nach der Applikation (Abb.2-36) lagen Kontroll- und Normalextraktgruppe auf einem Aktivitäts-Niveau (211 vs. 191), in der HPE'99 ölreich Gruppe war sie tendenziell gesenkt (155

vs. 266). Offensichtlich bewirkt bei gleicher Dosierung von 250 mg/kg KG der ölreiche Extrakt eine stärker ausgeprägte und länger anhaltende Senkung der Motilität als der Normalextrakt.

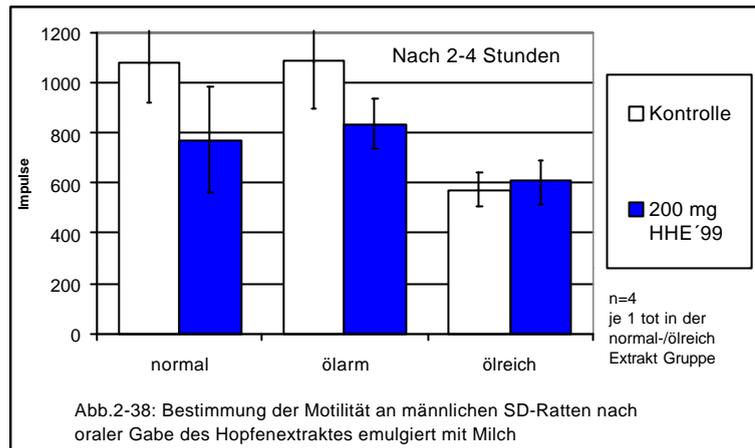
3) Ergebnisse mit unterschiedlichen Extrakten der Sorte Hersbrucker



Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei den Sorte Magnum und Perle wurden die Extrakte der Sorte Hersbrucker an männlichen SD-Ratten getestet. In der ersten Stunde nach der Applikation bewirkte eine Dosis von 200 mg/kg KG des normal-, und des ölarmen

Extraktes tendenziell eine leichte Steigerung der Aktivität, des ölreichen Extraktes eine leichte Senkung (Abb.2-37). Nach 2-4 Stunden war dagegen die Aktivität in der Normal- und Ölarmextrakt-Gruppe leicht gesenkt, in der ölreich-Gruppe auf Kontrollniveau (Abb.2-38). In der mit Normalextrakt behandelten Gruppe starb ein Tier 30 Minuten nach der Applikation, in der mit ölreichem Extrakt behandelten Gruppe ein Tier nach ca. 15 Stunden, was erstaunlich ist, da beide Extrakte nur eine mäßige sedative Aktivität besaßen. Wegen

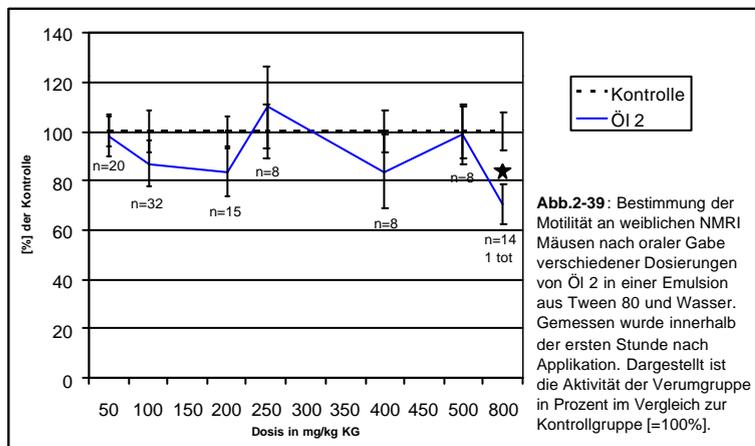
der aufgetretenen toxischen Effekte wurden die Extrakte der Sorte Hersbrucker nicht weiter getestet.

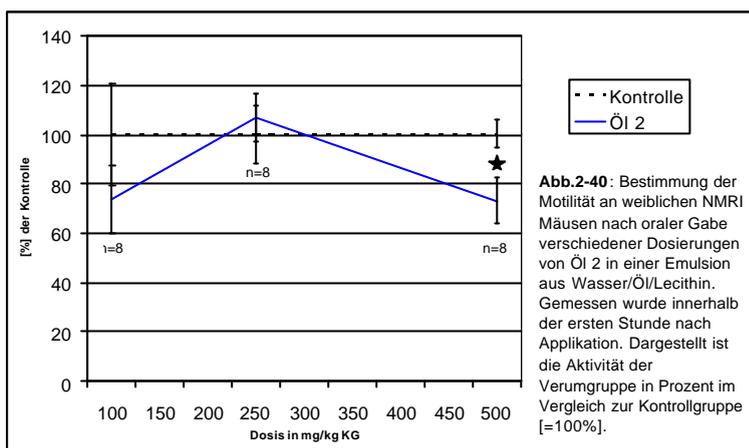


Hopfen-Extrakt Öl 2

Die stärkere Sedierung durch den Extrakt HPE '99 öereich im Vergleich zum Normalextrakt (Abb.2-36) ließ vermuten, daß unter den Herstellungsbedingungen des öereichen Extraktes auch der oder die sedierend wirkenden Inhaltsstoffe angereichert werden. Um das zu überprüfen, wurden vom Extrakthersteller zwei Ölextrakte der Sorte Perle mit hohem Hopfenölgehalt zur Verfügung gestellt. Von den beiden Extrakten wurde der zweite Extrakt [Öl 2] getestet, der durch den höheren Gehalt an Hopfenöl besser zur Überprüfung der Vermutung geeignet war. Abb.2-39 zeigt das Ergebnis der Testung 7 verschiedener Dosierungen von Öl 2. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche wurde die Aktivität der Kontrollgruppe jeweils gleich 100 % gesetzt und die Aktivität in der Extrakt-Gruppe in Prozent der Kontrolle angegeben. Gemessen wurde innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation, nachdem der Extrakt mit der Methode "Lösung mit Tween 80 und UltraTurrax" emulgiert worden war. Keine der Dosierungen zwischen 50 und 500 mg/kg KG bewirkte eine signifikante Senkung der Motilität.

Nach Gabe von 800 mg/kg KG wurde die Aktivität signifikant gesenkt ($p < 0,05$), jedoch starb ein Tier, so daß eine toxische Wirkung nicht auszuschließen ist. In einigen Dosierungen wurde der



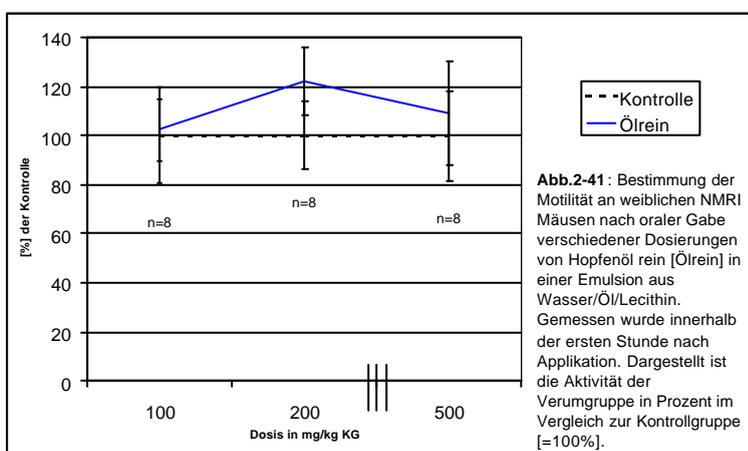


Extrakt auch emulgiert mit der Methode “Lösung mit Öl, Lecithin und UltraTurrax” (Abb.2-40) untersucht. Dosierungen von 100 und 250 mg/kg KG bewirkten keine signifikante Senkung der Motilität. Nur nach Gabe von 500 mg/kg KG wurde sie signifikant um

27 % gesenkt ($p < 0,05$).

Eine weitere Erhöhung des Hopfenölgehaltes in Öl 2 gegenüber HPE'99 ölfreich bewirkte keine Steigerung des sedativen Effektes. 250mg/kg KG HPE'99 ölfreich senkten signifikant die Motilität innerhalb der ersten Stunde nach Sondierung (Abb.2-35), die gleiche Dosis Öl 2 nicht.

Hopfen-Extrakt Hopfenöl rein [Ölrein]



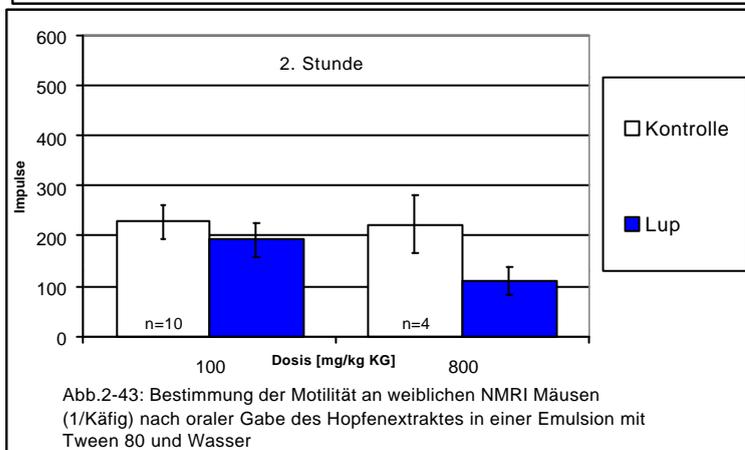
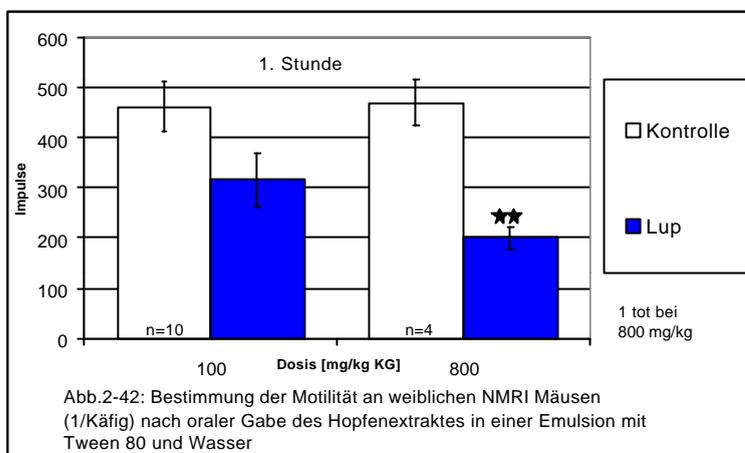
Der Extrakthersteller konnte später einen hochreinen Ölextrakt zur Verfügung stellen, der 99 ml/100 g Hopfenöl, 0,1 % alpha- und 0,6 % beta-Säuren enthielt. Er wurde mit Wasser/Öl/Lecithin und UltraTurrax emulgiert und unter den gleichen Bedingungen wie Öl 2

(Abb.2-40) in drei verschiedenen Dosierungen getestet. Dargestellt ist die Aktivität der mit Extrakt behandelten Gruppe in Prozent der Kontrollgruppen-Aktivität. In keiner der Dosierungen von 100, 200 und 500 mg/kg KG senkte Ölrein die Aktivität der behandelten Tiere. Tendenziell war die Aktivität nach Gabe von 200 und 500 mg/kg KG eher erhöht, jedoch liegen die Unterschiede im Bereich der Streuung. Der Extrakt Ölrein bewirkte in den drei

untersuchten Dosierungen keine Beeinflussung der Motilität, während der Extrakt Öl 2 in der Dosierung von 500 mg/kg KG sedierend wirkte. Die weitere Anreicherung an Hopfenöl auf 99 gegenüber 83 ml/100 mg Extrakt bei Öl 2 hatte einen Verlust der sedativen Wirkung zur Folge. Offensichtlich waren andere Inhaltsstoffe in Öl 2 für die Wirkung verantwortlich oder mitverantwortlich.

Hopfen-Extrakte Lupulonextrakt und Lupulonextrakt entölt [Lup]

Vom Extrakthersteller erhielten wir zwei Lupulonextrakte mit hohem beta-Säuregehalt, einen mit unverändertem Ölgehalt (60 % Lupulon, 4,5 % Öl) und einen entölten (66,5 % Lupulon, 0,9 % Öl: angeführt als Lup-Extrakt). Von den beiden Lupulonextrakten wurde nur der entölte ausgewählt und getestet, da er einen höheren Gehalt an beta-Säuren aufweist und durch den niedrigeren Ölgehalt besser mit dem Humulonextrakt vergleichbar ist. Abb.2-42/43 zeigen die Ergebnisse der Gabe von 100



bzw. 800 mg/kg KG an weiblichen NMRI-Mäusen. Dargestellt ist die Anzahl der Impulse in der ersten bzw. zweiten Stunde nach der Applikation. Die Emulsionen wurden mit Tween 80 und UltraTurrax hergestellt. Abb.2-42 zeigt, daß nach Gabe von 100 mg/kg KG die Motilität in der Extraktgruppe innerhalb der ersten Stunde um 32 % gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt wurde (361 vs. 461). 800 mg/kg KG wirkten deutlich stärker, die Motilität wurde um 57 % gesenkt (200 vs. 469), jedoch starb eine Maus 30 Minuten nach

Sondierung. Die Werte dieser Maus wurden nicht mitgerechnet. In der zweiten Stunde (Abb.2-43) befand sich nach Gabe von 100 mg/kg KG diese Gruppe auf etwa gleichem Niveau wie die Kontrolle, nach Gabe von 800 mg/kg KG hielt der Effekt länger an, war jedoch nicht mehr signifikant.

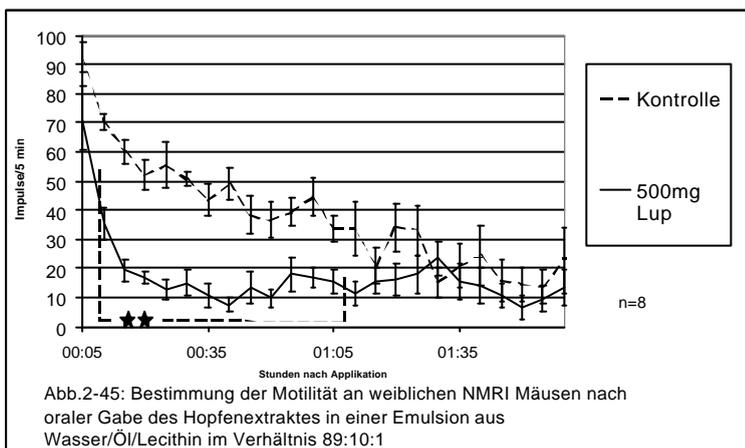
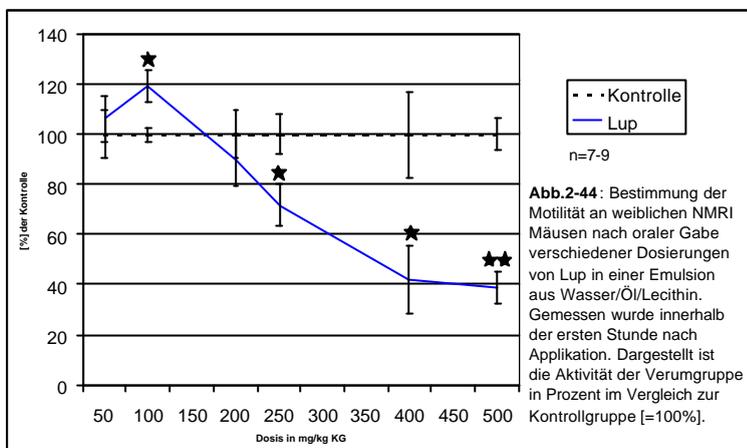


Abb.2-44 zeigt die Hemmung der Motilität verschiedener Dosierungen des Extraktes emulgiert mit Wasser/Öl/Lecithin. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Aktivitäten der mit Extrakt behandelten Gruppen als Prozent der Kontrollen aufgetragen. Gemessen wurde in der ersten Stunde nach der Applikation. Eine Dosis von 50 mg/kg KG hatte keinen Einfluß auf die Motilität, 100 mg/kg KG erhöhten die Motilität signifikant um 20 %. Dosierungen zwischen 250 und 500 mg/kg KG senkten die Motilität

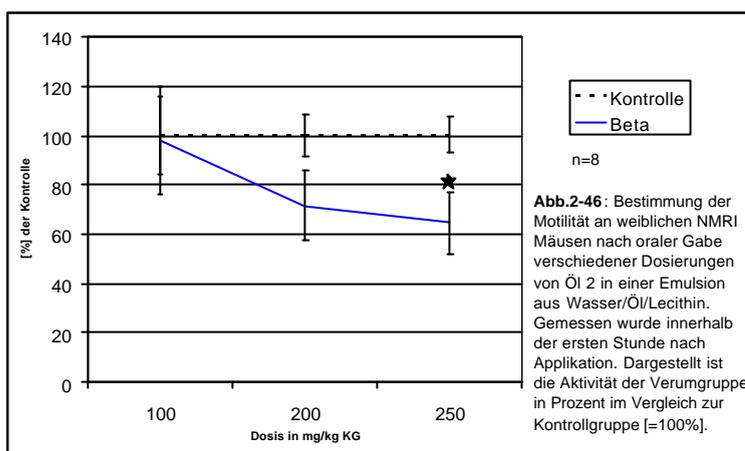
signifikant um bis zu 60 % ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Abb.2-45 zeigt die Beeinflussung der Motilität nach Gabe von 500 mg/kg KG. Die Summe der Impulse pro 5 Minuten ist auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abzisse aufgetragen. Direkt nach der Gabe des Extraktes fiel die Motilität der behandelten Tiere stark ab. Im Zeitraum zwischen 10 Minuten bis zu 1 Stunde war der Unterschied hoch signifikant ($p < 0,01$).

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde der Extrakt männlichen BL/6 Mäusen in einer Dosis von 200 mg/kg KG gegeben. Die Tiere reagierten sehr sensibel, alle behandelten Mäuse starben innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation, während dieselbe Dosis von den NMRI Mäusen gut vertragen wurde.

Hopfen-Extrakt Beta-spezifisch [Beta]

Der Beta-spezifische Extrakt enthält ähnlich wie der Extrakt Lup viel beta-Säuren (63 %), wenig alpha-Säuren (0,3 %) und wenig Hopfenöl (0,6 %). Unterschiede liegen laut Extrakthersteller nur im Co-lupulon / n- + Adlupulon Verhältnis. Der Extrakt Beta enthält fast gleichviel Colupulon / n- + Adhumulon (35,8 / 27,2 %), der Extrakt Lup deutlich mehr Colupulon (50 / 16,5 %). Der “geschätzte Weichharzanteil” liegt laut Extrakthersteller bei ca. 35 %.

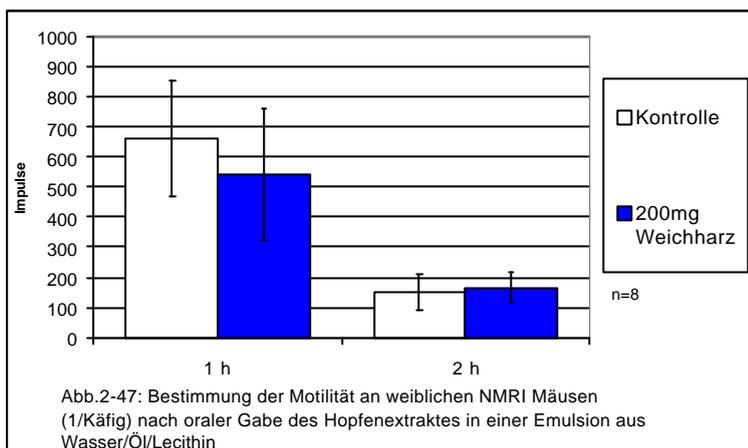
Abb.2-46 zeigt die Beeinflussung der Motilität an weiblichen NMRI-Mäusen nach Gabe verschiedener Konzentrationen des Extraktes Beta, emulgiert mit Wasser/Öl/Lecithin/Ultra-Turrax. Gemessen wurde innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation, zur besseren Ver-



gleichbarkeit der Versuche ist der Wert der mit Extrakt behandelten Gruppe in Prozent der jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt. Nach Gabe von 100 mg/kg KG wurde die Motilität nicht beeinflusst, die doppelte Dosis (200 mg/kg KG) senkte tendenziell die Motilität und 250 mg/kg KG führten zu einer signifikanten Senkung der Motilität um 35 % ($p < 0,05$). Der Extrakt schien etwas stärker wirksam als Lup zu sein, bei dem eine Dosis von 100 mg/kg KG zu einer Stimulation führte und 250 mg/kg KG die Motilität nur um 28 % gegenüber 35 % bei Beta senkten.

Hopfen-Extrakt Weichharz-spezifisch

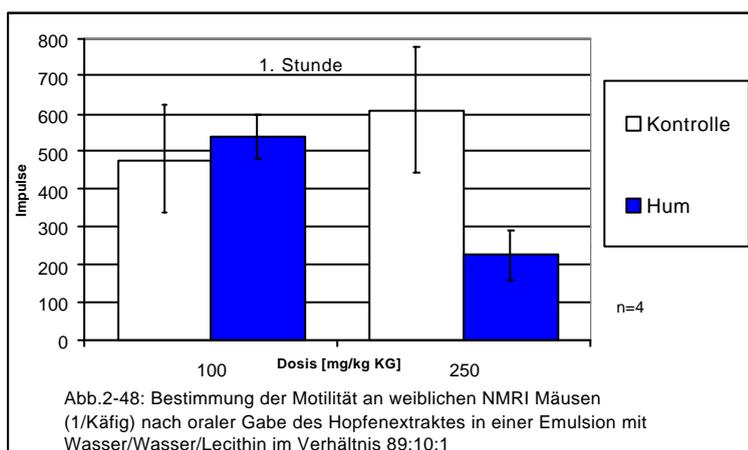
Laut Analyse des Extraktherstellers besitzt der Weichharz-spezifische Extrakt einen hohen Gehalt an Weichharzen (geschätzt ca. 80 %) und einen niedrigen Gehalt alpha-Säuren (0,4 %), beta-Säuren (9,3 %) und Hopfenöl (8,7 ml/100 g). Der Extrakt wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie der Extrakt Beta untersucht. Abb.2-47 zeigt die Beeinflussung



gleiche Aktivitätsniveau.

sung der Motilität nach Gabe von 200 mg/kg KG. In der ersten Stunde nach der Applikation war kein Effekt erkennbar, allerdings streuten die Werte sowohl in der Kontroll- als auch in der Extraktgruppe sehr stark. In der zweiten Stunde hatten beide Gruppe das

Hopfen-Extrakt Humulonextrakt [Hum]



getestet. Abb.2-48 zeigt, daß eine Dosis von 100 mg/kg KG innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation die Motilität nicht beeinflusste, 250 mg/kg KG dagegen sedierend wirkten. Aufgrund der geringen n-Zahl ist das Ergebnis nicht signifikant. Der Effekt war nach einer Stunde nicht beendet, sondern hielt etwa 9 Stunden an. Der Extrakt erwies sich nach mehrtägiger Applikation in einer Dosierung von 200 mg/kg KG als toxisch und wurde deshalb nicht weiter getestet.

Der Extrakt wurde Humulonbetont hergestellt, d.h. er besitzt einen hohen alpha-Säuregehalt (84,4 %), wenig beta-Säuren (1,6 %) und Hopfenöl (0,3 ml/100 g). Der Extrakt Hum wurde unter gleichen Bedingungen wie der Extrakt Weich in zwei Dosierungen

Mischungen aus den Extrakten Lup und Ölrein

Um zu untersuchen, ob die beiden Inhaltsstoffgruppen Lupulone und Hopfenöl in ihrer Wirkung beeinflussen, wurden Mischungen der beiden Extrakte in verschiedenen Verhältnissen und Dosierungen getestet. Mischungen mit dem Humulon-betonten Extrakt wurden nicht durchgeführt, da er sich nach mehrtägiger Applikation als toxisch erwiesen hatte. In Abb.2-49 ist die Beeinflussung der Motilität verschiedener Mischungen aus den Extrakten Lup und Ölrein dargestellt. Getestet wurde an NMRI-Mäusen mit einer Emulsion aus Wasser/Öl/Lecithin. Auf der Abzisse ist die Zusammensetzung der im jeweiligen Versuch applizierten Menge angegeben. Im ersten Versuch wurde 41,5 mg/kg Lup und 125 mg/kg KG Ölrein gegeben. Das entspricht einem Verhältnis von 1:3. Die Gabe der Mischung erhöhte die Motilität der Tiere innerhalb der ersten Stunde signifikant auf 140 % der Kontrollgruppe

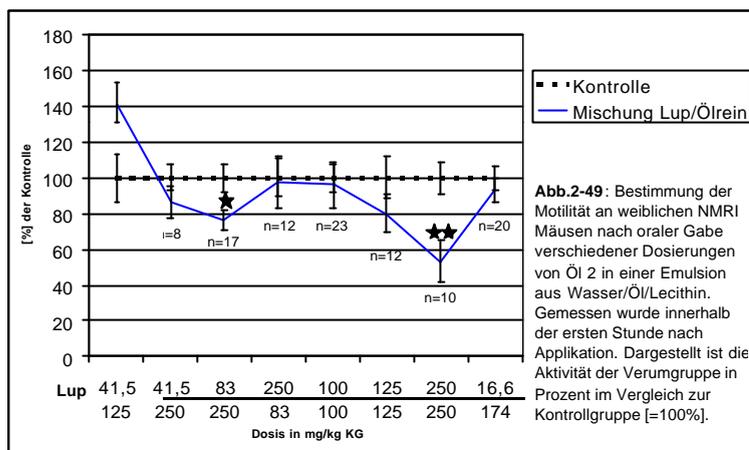


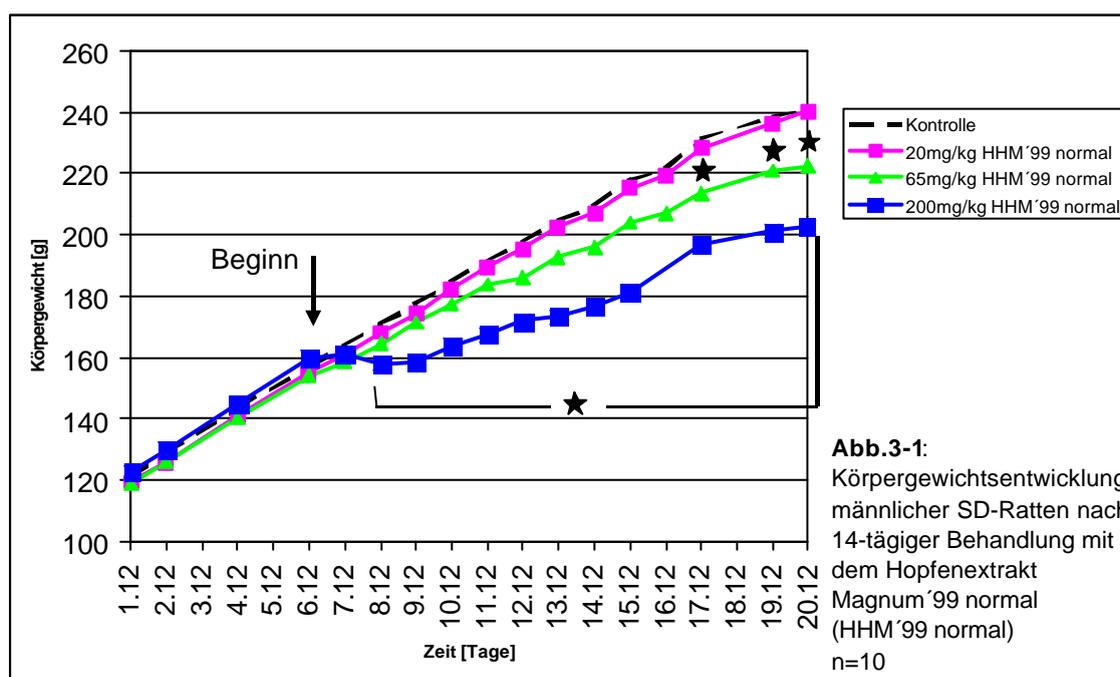
Abb.2-49: Bestimmung der Motilität an weiblichen NMRI Mäusen nach oraler Gabe verschiedener Dosierungen von Öl 2 in einer Emulsion aus Wasser/Öl/Lecithin. Gemessen wurde innerhalb der ersten Stunde nach Applikation. Dargestellt ist die Aktivität der Verumgruppe in Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe [=100%].

($p < 0,05$). Verdoppelte man den Ölrein-Anteil (41,5/250), wurde die Motilität nicht mehr gesteigert, sondern etwas abgesenkt. Eine Verdoppelung des Lup Anteils in dieser Mischung (83/250), führte zu einer signifikanten Senkung der Motilität in der behandelten Gruppe auf 80 % der Kontrolle ($p < 0,05$). Drehte man das Verhältnis Lup/Ölrein um (250/83), wurden die Tiere nicht mehr sediert. Mischungen im Verhältnis 1:1 senkten nur in höheren Dosierungen von jeweils 250 mg/kg KG signifikant die Motilität ($p < 0,01$). Die Mischung von 16,6 mg/kg KG Lup und 174 mg/kg KG Ölreich entspricht dem Mengenverhältnis an Hopfenöl und beta-Säuren, das bei einer Dosis von 200 mg/kg KG des Extraktes Öl2 appliziert wird. Sie hatte keinen Einfluß auf die Motilität.

4.1.3 Versuche nach wiederholter Applikation der Prüflösungen

4.1.3.1 14-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal

Bei der Prüfung auf sedative Aktivität starb eine Ratte 16 Stunden nach der Applikation von 200 mg/kg KG HHM'99 normal. Um zu klären ob der Extrakt toxisch ist oder nicht, wurde ein Versuch mit 14-tägiger Behandlung durchgeführt. Die Zielsetzung war, die Effekte des Extraktes auf Körper- und Organgewichte bei subakuter Applikation festzustellen. Es gab drei Behandlungsgruppen (20/65/200 mg/kg KG) und eine Kontrollgruppe. Die Gruppengröße betrug n=10. Die Dosis wurde einmal täglich oral mit einer Schlundsonde appliziert, der Extrakt wurde mit der Methode "Milch unter Erwärmen" emulgiert. Der Versuch wurde am 6.12.99 begonnen. Abb.3-1 zeigt, daß bereits nach 2 Tagen die Tiere der 200 mg/kg Gruppe signifikant ($p=0,004$ / Bonferroni) weniger als die Tiere der Kontrollgruppe wogen.



Am 10./15./16.12 starb in der 200 mg/kg Gruppe je ein Tier. Um diese Gruppe nicht noch mehr zu verkleinern, wurde die Behandlung an den folgenden drei Tagen ausgesetzt, danach die Dosierung auf die Hälfte reduziert. Nach 11 Tagen (17.12) wogen auch die Tiere der 65mg/kg Gruppe signifikant ($p=0,005$ / Bonferroni) weniger als die Kontrollgruppe. Bei Versuchsauflösung zeigte sich in der 200 mg/kg Gruppe eine Gewichtsreduktion fast aller untersuchten Organe (Tab.3-2). Leber-, Nieren- und Samenblasengewicht waren sehr stark

		Kontrolle		HHM '99 20 mg/kg		HHM '99 65 mg/kg		HHM '99 200 mg/kg	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Körper- Gewicht	[g]	243,9	5,4	242,8	5,1	224,7	4,9	205,6	6,3
Leber	[g]	11,5	0,3	11,6	0,3	10,0	0,6	9,2	0,4
Nieren	[g]	1,86	0,04	1,86	0,05	1,71	0,04	1,54	0,04
Milz	[g]	0,68	0,04	0,69	0,03	0,58	0,03	0,54	0,02
Hypophyse	[mg]	9,040	0,36	8,440	0,35	7,990	0,27	7,614	0,40
Schilddrüse	[mg]	10,6	0,39	11,0	0,47	10,7	0,53	9,0	0,56
Nebenniere	[mg]	38,5	2,86	40,5	1,37	39,9	1,70	42,9	2,52
Thymus	[mg]	414,7	34,48	484,4	36,73	414,8	26,43	344,9	42,64
Hoden	[g]	3,2	0,09	3,2	0,08	2,9	0,21	3,1	0,05
Samenblase	[mg]	466,8	19,01	417,6	22,15	340,8	43,19	328,3	30,06
Prostata	[mg]	273,8	22,29	224,5	24,80	220,2	20,14	200,1	21,46

Tab.3-2: Organgewichte von männl. SD-Ratten nach 14-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte gelöst in Milch

graue (gelb) hinterlegte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe.
Test: Student-Newman-Keuls, 5 % Niveau

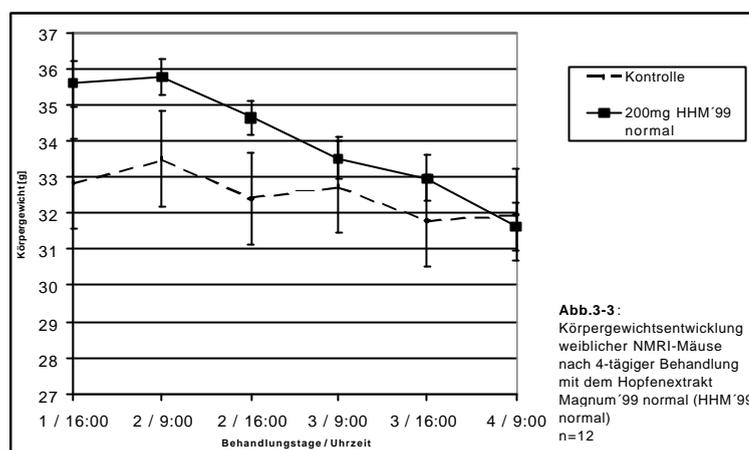
reduziert ($p < 0,05$), Milz-, Schilddrüsen-, Prostata- und Hypophysengewicht stark reduziert ($p < 0,05$). In der 65 mg/kg Gruppe waren die Gewichte von Leber, Nieren, Samenblase und Hypophyse verringert. Die 20 mg/kg Gruppe wies keine signifikanten Veränderungen auf, jedoch waren tendenziell die Samenblasen-, Prostata- und Hypophysengewichte ebenfalls verringert.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Extrakt vor allem in höheren Konzentrationen deutlich toxische Effekte verursachte. Die Gewichtsreduktion an Prostata und Samenblase könnte, da

der Versuch mit männlichen Tieren durchgeführt wurde auf eine eventuell vorhandene estrogenere Aktivität hinweisen.

4.1.3.2 4-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal

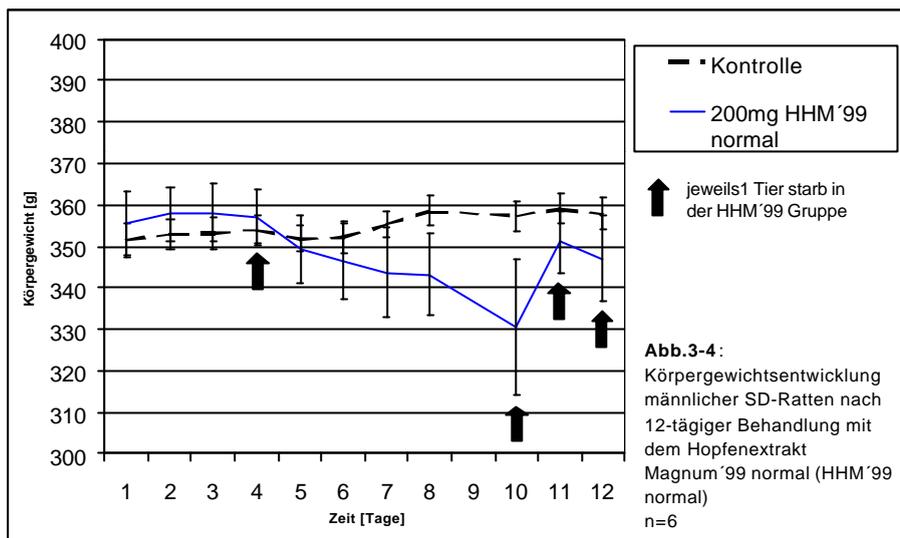
Um herauszufinden ob der toxische Effekt speziesspezifisch ist, wurde danach an weiblichen NMRI-Mäusen getestet. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wurden 200 mg/kg KG des Extraktes 4 Tage lang appliziert und die Tiere zweimal täglich, um 9:00



und um 16:00 gewogen. Abb.3-3 zeigt, daß auch bei NMRI-Mäusen eine Gewichtsreduktion in der mit Extrakt behandelten Gruppe eintrat. Trotz niedrigerem Körpergewicht bei den Kontrollen zu Behandlungsbeginn (33g bei der Kontrolle, 35,5g bei der Hopfen-Gruppe), haben nach 4 Tagen beide Kollektive das selbe Gewicht erreicht. Ein Tier starb an Tag 4 in der Extrakt-Gruppe. Der beobachtete toxische Effekt ist also nicht rattenspezifisch.

4.1.3.3 12-tägige Applikation des Extraktes HHM'99 normal

Um zu untersuchen, ob die Art des Lösungsmittels einen Einfluß auf die toxischen Effekte des Extraktes hat, wurde zum Lösen des Extraktes nicht Milch verwendet, sondern eine Emulsion mit der Methode "Lösung mit Lecithin, BSA und Ultraschall" hergestellt. Eine Dosis von 200 mg/kg KG wurde männlichen, ca. 10 Wochen alten SD-Ratten über 10 Tage einmal täglich morgens oral verabreicht. Die letzte Applikation erfolgte 24 Stunden vor Versuchsauflösung. Die Körpergewichte wurden täglich ermittelt und sind in Abb.3-4 dargestellt. Die Gewichte der Kontrolltiere nahmen während des Versuches leicht zu, die der mit Extrakt behandelten Tiere ab. An Tag 4, 10, 11 und 12 des Versuches starb jeweils ein



Tier in der Extrakt-Gruppe. Das erste Tier an Tag 4 war zu Beginn mit 381 g das schwerste Tier des Versuches. Es starb etwa 7 Stunden nach der letzten Applikation ohne vorherigen

Gewichtsverlust. Auch die Tiere an Tag 10 und 12 starben ohne vorherigen Gewichtsverlust, das Tier an Tag 11 hatte dagegen 35 g von Tag 9 auf Tag 10 abgenommen, das erklärt den großen Standardfehler an Tag 10 in der Extrakt-Gruppe.

		Kontrolle		HHM'99 200 mg/kg	
		Mittelwert n=6	SEM	Mittelwert n=2	SEM
Gewicht	[g]	358	3,9	347	18,0
Leber	[g]	11,3	0,5	11,4	1,0
Nieren	[g]	2,0	0,1	2,0	0,0
Milz	[mg]	705	31,3	661	1,0
Hypophyse	[mg]	9,9	0,4	10,6	0,3
Schilddrüse	[mg]	9,2	0,7	8,6	0,6
Nebenniere	[mg]	41,3	2,3	39,5	4,3
Thymus	[mg]	234	44,6	227	120,5
Hoden	[g]	3,3	0,1	2,9	0,1
Samenblase	[mg]	521	74,5	706	64,5
Prostata	[mg]	617	59,4	602	224,5

Tab.3-5: Organgewichte von männl. SD-Ratten nach 12-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation HHM'99 normal emulgiert mit Wasser/Lecithin/BSA

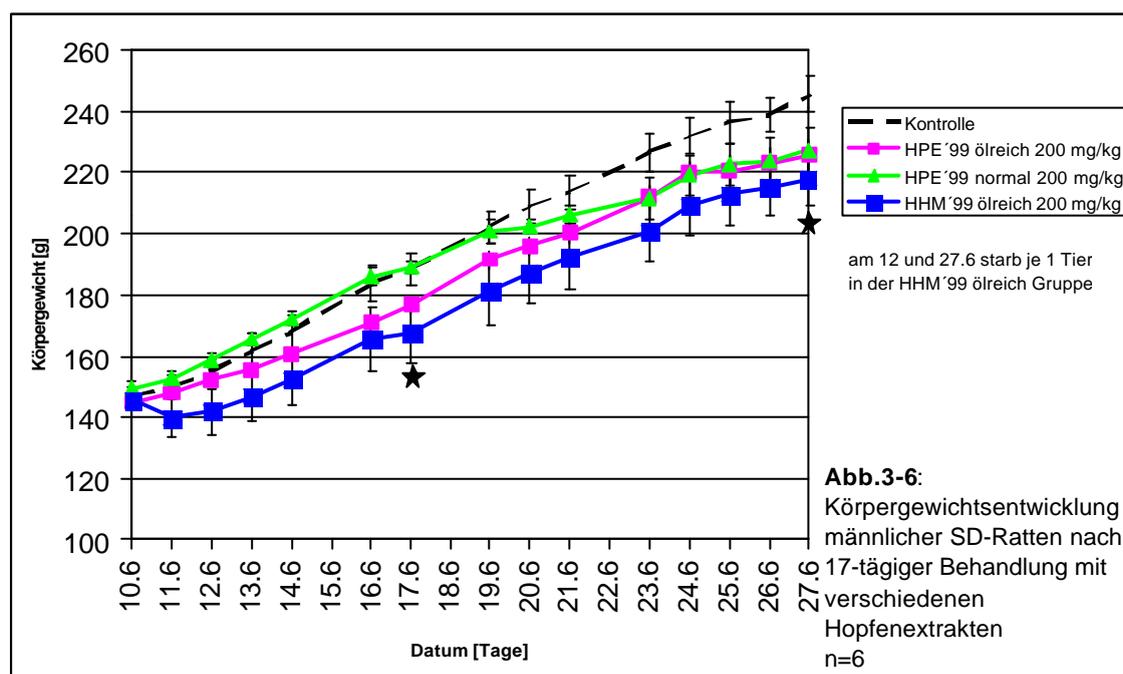
In Tab.3-5 sind die Organgewichte der beiden Gruppen zusammengestellt. Da in der Extraktgruppe 4 von 6 Tieren gestorben waren, konnten nur von zwei Tieren Mittelwerte berechnet werden, der Standardfehler ist deshalb bei einigen Organgewichten sehr groß oder klein. Die beiden Tiere hatten bis auf ein erhöhtes Samenblasengewicht (706 vs. 521) keine auffälligen Organgewichtsveränderungen gegenüber den Kontrolltieren. Da der Versuch mit fast adulten Tieren durchgeführt wurde, wäre einer Reduzierung der Organgewichte nicht zu erwarten.

Das Ergebnis zeigt, daß HHM'99 normal auch in anderen Lösungsmitteln toxische Effekte zeigt, eine wiederholter Gabe von 200 mg/kg KG wirkte bei 66 % der Tiere letal.

4.1.3.4 12-tägige Applikation der Extrakte HHM'99 öereich, HPE'99 normal und HPE'99 öereich

Um zu untersuchen, ob die toxischen Effekte von HHM'99 normal sorten- oder extrakt-spezifisch sind, wurden aus dem gleichen Erntejahr 1999 der Normalextrakt der Sorte Perle, der aus dem gleichen Extraktmaterial hergestellte öreiche Extrakt und der öreiche Extrakt der Sorte Magnum getestet. Versuchstiere waren juvenile, männliche SD-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 138 und 156 g. Die Gruppengröße betrug n=6 Tiere pro Gruppe. Wie im vorherigen Versuch wurden die Extrakte als Emulsion aus Wasser/Lecithin/BSA oral verabreicht. 200 mg/kg KG des jeweiligen Extraktes wurden über 17 Tage einmal täglich nachmittags appliziert. Die letzte Applikation erfolgte 18 Stunden vor Versuchsauflösung.

Abb.3-6 zeigt die Körpergewichtsentwicklung der einzelnen Versuchsgruppen während des



Behandlungszeitraumes. Es wird deutlich, daß nach 17 Tagen die Extrakte der Sorte Perle zu einer leichten, nicht signifikanten Senkung des Körpergewichtes führten. Die Tiere der Gruppe HHM'99 öereich wogen signifikant weniger als die Kontrolltiere an den Tagen 17.6 und 27.6 ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls). Der Unterschied zu den anderen Gruppen war nicht signifikant. In der Gruppe starben am 12. und 27.6 jeweils 1 Tier.

		Kontrolle		HPE '99 normal		HPE '99 öereich		HHM '99 öereich	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Körper-Gewicht [g]		253	6,0	233	7,8	237	6,0	232	7,1
Leber	[g]	10,8	0,4	10,4	0,5	10,7	0,6	10,3	0,5
Nieren	[g]	1,69	0,05	1,55	0,05	1,60	0,06	1,61	0,06
Milz	[mg]	647	30,9	578	8,0	545	35,4	555	15,9
Hypophyse	[mg]	8,1	0,57	7,8	0,38	7,8	0,28	8,5	0,69
Schilddrüse	[mg]	10,4	0,80	9,8	0,93	11,3	0,74	11,7	0,28
Nebenniere	[mg]	37,0	1,37	36,9	2,16	35,6	0,60	33,5	1,78
Thymus	[mg]	407	41,8	412	40,2	342	29,9	373	39,0
Hoden	[g]	3,0	0,09	3,0	0,12	3,1	0,06	3,1	0,11
Samenblase	[mg]	419	24,4	390	17,4	378	24,1	368	30,5
Prostata	[mg]	354	47,6	255	31,2	256	24,7	238	47,5

Tab.3-7: Organgewichte von männl. SD-Ratten nach 17-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte (alle 200mg/kg KG) emulgiert in Wasser/Lecithin/BSA

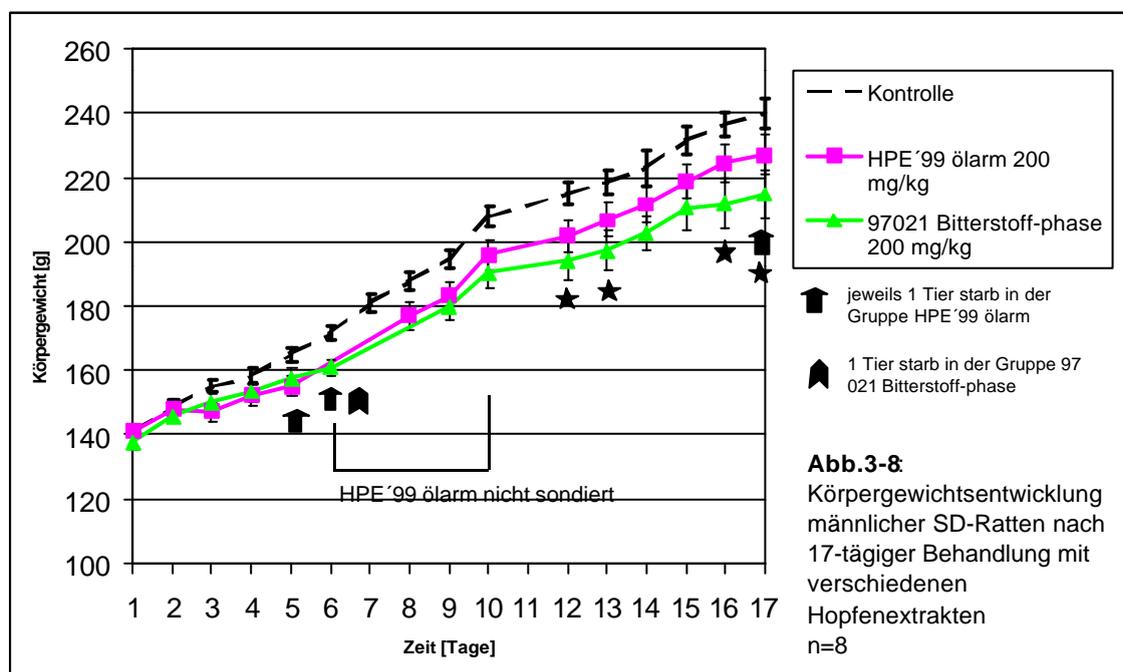
In Tab.3-7 sind die Organgewichte der einzelnen Behandlungsgruppen zusammengestellt. Die Körpergewichte aller drei Extrakt-Gruppen waren nicht signifikant erniedrigt. In der HHM '99 öereich Gruppe war der Unterschied am Vortag signifikant (Abb.3-6), durch die verkleinerte Gruppengröße auf n=4 Tiere bei Versuchsauflösung nicht mehr. Tendenziell erniedrigt waren in allen drei Gruppen auch Milz-, Samenblasen- und Prostatagewicht, statistisch signifikant waren die Unterschiede auf dem 5 % Niveau durch die geringe Gruppengröße nicht. Die beiden Gruppen, die mit Extrakten der Sorte Perle behandelt worden waren, wiesen Unterschiede untereinander nur im Milz- und Thymusgewicht auf, das Gewicht war jeweils in der HPE '99 öereich Gruppe etwas niedriger.

Die Extrakte der Sorte Perle hatten weniger Auswirkungen auf Körper- und Organgewichte als der öereich Extrakt der Sorte Magnum. In diesen Gruppen starb kein Tier. Der öereich Extrakt der Sorte Magnum scheint weniger toxisch zu sein als der Nomalextrakt der gleichen Sorte (Abb.3-4), jedoch deutlich toxischer als die Extrakte der Sorte Perle.

4.1.3.5 17-tägige Applikation der Extrakte HPE´99 ölarm und 97 021 Bitterstoffphase

Der Einfluß auf das Körper- und Organgewicht wurde an männlichen, juvenilen SD-Ratten mit einem Anfangs-Gewicht zwischen 135 und 148 g untersucht. Die Applikation erfolgte oral einmal täglich in einer Dosierung von 200 mg/kg KG. Die Emulsionen wurden mit der Methode "Lösung mit BSA und Ultraschall" hergestellt. Die Gruppenstärke betrug n=8 Tiere/Gruppe. Die letzte Applikation der Prüflösungen erfolgte 24 Stunden vor Versuchsauflösung.

Abb.3-8 zeigt die Entwicklung der Körpergewichte über 17 Tage. In der Gruppe HPE´99 ölarm starb je ein Tier an Tag 5, 6 und 17. Um die Gruppenstärke nicht weiter zu dezimieren, erhielten die Tiere dieser Gruppe an den Tagen 6 - 10 keinen Extrakt, sondern Kontrolllösung. Ab Tag 11 wurde bis Versuchsende Extrakt appliziert. Danach unterschieden sich die Körpergewichte der HPE´99 ölarm Gruppe an Tag 12, 13, 16 und 17 signifikant ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls) von denen der Kontrollgruppe. In der mit 97 021 Bitterstoffphase



behandelten Gruppe starb ein Tier an Tag 5, die Körpergewichte der Tiere lagen etwas unter der Kontrollgruppe, der Unterschied war nicht signifikant.

Tab.3-9 zeigt die die Organgewichte der einzelnen Gruppen. Hypophysen-, Nebennieren- und Samenblasegewicht waren in der mit HPE'99 ölarom behandelten Gruppe signifikant erniedrigt ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls). Verwendet man den schwächeren Fisher-PLSD Test, so war auf dem 5 %-Niveau auch das Lebergewicht erniedrigt. Die Behandlung mit 200 mg/kg KG 97 021 Bitterstoff-phase verursachte ein signifikant niedrigeres Hypophysengewicht ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls). Testet man mit Fisher-PLSD, so waren auch Körper-, Leber-, Nieren- und Nebennierengewicht signifikant erniedrigt ($p < 0,05$).

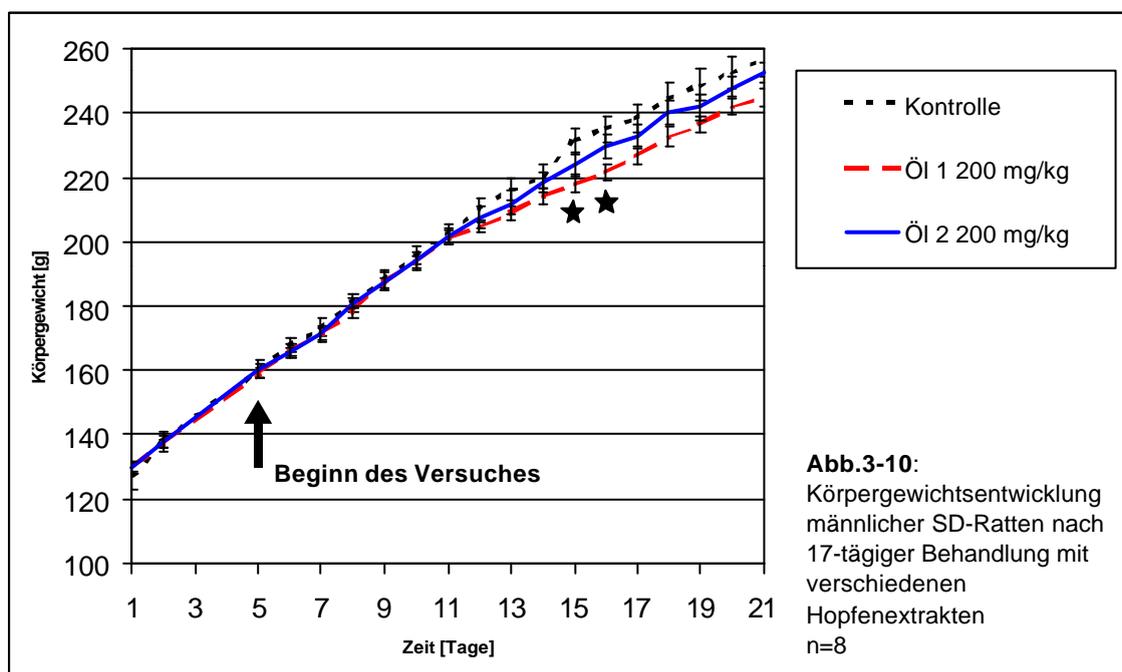
		Kontrolle		HPE '99 ölarom 200 mg/kg		97 021 Bitterstoff- phase 200 mg/kg	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
KG	[g]	284,4	5,5	258,2	12,9	258,4	10,1
Leber	[g]	11,38	0,37	9,50	0,73	9,79	0,55
Nieren	[g]	1,92	0,05	1,76	0,10	1,70	0,06
Milz	[g]	0,647	0,03	0,588	0,03	0,572	0,04
Hypophyse	[mg]	10,4	0,55	8,2	0,45	8,8	0,31
Schilddrüse	[mg]	11,6	0,31	11,5	0,37	12,2	0,85
Nebenniere	[mg]	42,8	1,54	36,2	2,31	37,7	1,48
Thymus	[mg]	338,5	33,18	369,0	29,55	309,9	29,81
Hoden	[g]	3,3	0,11	3,2	0,09	3,3	0,16
Samenblase	[mg]	510,9	22,15	409,8	29,17	485,9	30,67
Prostata	[mg]	456,8	34,06	458,8	34,40	494,3	41,42

Tab.3-9: Organgewichte männl. SD-Ratten nach 17-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte gelöst in Wasser / 1% BSA. Grau (gelb) hinterlegte Felder unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Test: Student-Newman-Keuls 5 % Niveau

Die Ergebnisse machen deutlich, daß HPE '99 ölarom toxische Effekte ausübt. 3 von 8 Tieren starben, die übrigen wiesen Gewichtsveränderungen vieler untersuchter Organe auf. Das steht im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit dem normal- und dem ölreichen Extrakt der gleichen Sorte (Abb.3-7). Der Extrakt 97 021 war weniger toxisch, nur 1 Tier starb, jedoch verursachte auch er verringerte Körper-, Leber-, Nieren- und Hypophysengewichte.

4.1.3.6 17-tägige Applikation der Extrakte Öl 1 und Öl 2

Die beiden Extrakte, die aus der Sorte Perle stammen, wurden 17 Tage lang an juvenilen, männlichen SD-Ratten getestet. Sie wurden in einer Dosierung von 200 mg/kg KG einmal täglich per os appliziert. Die applikationsfähigen Emulsionen wurden mit der Methode "Lösung mit Lecithin und Ultraschall" hergestellt. Abb.3-10 zeigt den Körpergewichtsverlauf über einen Zeitraum von 21 Tagen. Mit dem Versuch begonnen wurde an Tag 5, davor



wurden die Tiere nur gewogen. Während bei dem Extrakt Öl 1 ab Tag 12 die Tiere etwas weniger schnell zunahmten als die Kontrollen, an den Tagen 15 und 16 wogen sie signifikant weniger als die Kontrollen ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls), war nichts dergleichen nach Behandlung mit dem Extrakt Öl 2 zu beobachten.

		Kontrolle		Öl 1 (200 mg/kg)		Öl 2 (200 mg/kg)	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Gewicht	[g]	270,1	5,7	255,6	2,7	263,8	3,0
Leber	[g]	10,86	0,40	11,59	0,16	11,77	0,31
Niere	[g]	1,80	0,04	1,76	0,04	1,83	0,04
Milz	[g]	0,684	0,03	0,620	0,02	0,672	0,02
Hypophyse	[mg]	8,5	0,58	8,5	0,22	8,5	0,36
Schilddrüse	[mg]	12,5	0,77	11,0	0,44	12,3	0,54
Nebenniere	[mg]	32,5	1,58	36,7	1,17	36,7	0,87
Thymus	[mg]	492,9	17,17	421,4	40,71	393,8	36,72
Hoden	[g]	3,2	0,05	3,3	0,04	3,4	0,04
Samenblase	[mg]	449,4	16,77	409,4	16,43	500,5	22,83
Prostata	[mg]	281,8	10,12	260,8	12,25	321,9	24,31
Tab.3-11: Organgewichte männl. SD-Ratten nach 17-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO ₂ -Hopfenextrakte gelöst in Wasser/1,5% Lecithin							

Tab.3-11 zeigt die Organgewichte bei den Versuchstieren. Die mit Öl 1 behandelten Tiere wiesen signifikant niedrigere Körper- und Nebennierengewichte ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls) und signifikant höhere Hodengewichte auf ($p < 0,05$). In der Öl 2 Gruppe waren nur die Hodengewichte vergrößert ($p < 0,05$). Testet man mit dem schwächeren Fisher-PLSD auf dem 5 % Niveau, waren in der mit Öl 1 behandelten Gruppe auch Milz, Samenblase und Schilddrüse signifikant verkleinert. Die Gewichte der Milz, Samenblase und Prostata waren gegenüber der Öl 2 Gruppe signifikant kleiner. Auffällig in beiden Gruppen war das nicht

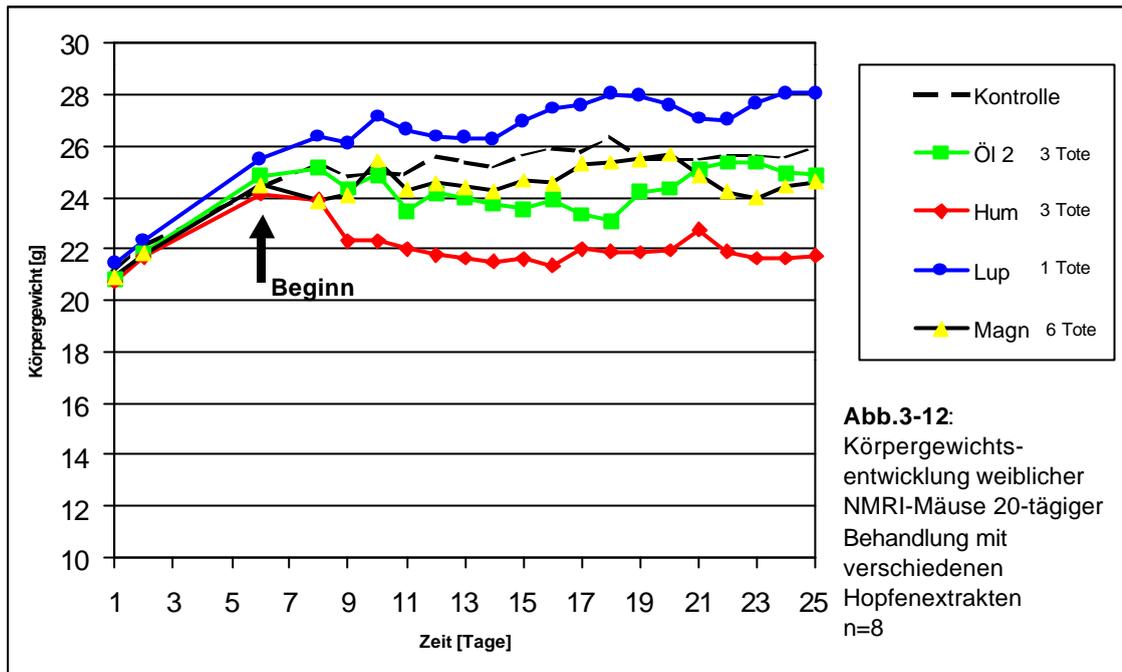
signifikant erhöhte Lebergewicht, obwohl das Körpergewicht der Tiere niedriger war als in der Kontrollgruppe.

Verglichen mit den bisher getesteten Hopfenextrakten waren die beiden Ölextrakte deutlich besser verträglich. Keines der Tiere verstarb. Von den im Versuch getesteten Extrakten ist der höher angereicherte Extrakt Öl 2 (83 vs 62 ml/100 g Hopfenöl) der verträglichere. Ob der etwa halb so hohe Gehalt an Humulon/Lupulon in Öl 2 gegenüber Öl 1 (Humulon 9 vs. 17 % / Lupulon 6,2 vs 12 %) oder ein sonst identifizierter Inhaltsstoff dafür verantwortlich war, blieb offen.

4.1.3.7 20-tägige Applikation der Extrakte Öl 2, Hum, Lup und HHM'99 normal

Um die Wirkung der drei Extrakte miteinander vergleichen zu können und gleichzeitig Hinweise auf mögliche toxische Effekte zu erhalten, wurde ein 3 Wochen Versuch an weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Der Extrakt HHM'99 normal hatte sich bereits in anderen Versuchen (siehe 3.1.3.1 ff.) als toxisch erwiesen und wurde deshalb als Negativkontrolle mitgeführt. Alle Extrakte wurden in einer Dosis von 200 mg/kg KG einmal täglich per os appliziert. Die Gruppenstärke betrug 10 Tiere/Gruppe. Die Extrakte wurden mit der Methode "Tween 80 und UltraTurrax" emulgiert.

Abb.3-12 zeigt die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse, aufgeteilt nach der Behandlungsgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte über die Zeit in Tagen, der Standardfehler ist zur besseren Übersichtlichkeit nicht eingetragen. Statistisch signifikante Unterschiede an den einzelnen Tagen auf dem 5 %- und 1 %-Niveau sind in Abb.3-13 angegeben. Die Tiere kamen an Tag 1 an, zu Versuchsbeginn an Tag 6 befanden sich alle Gruppen auf dem selben Niveau. Bereits an Tag 10, d.h. nach 4-tägiger Behandlung, wogen die mit Hum behandelten Tiere signifikant weniger als die Kontrolltiere ($p < 0,01$) und die der anderen Gruppen ($p < 0,05$). Für die Lup-Gruppe war eine Tendenz nach oben zu erkennen, die Tiere wuchsen vergleichsweise am schnellsten. Bei den übrigen Tieren war kein Unterschied deutlich, allerdings starb in der HHM'99 normal Gruppe an Tag 2 und 3 je ein Tier. Bis zu Versuchsende starben in dieser Gruppe 60 % der Tiere, die überlebenden besaßen ein stumpfes,



Tag	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Kontrolle vs. Öl 2											p<0,05							
Kontrolle vs. Hum			p<0,05	p<0,05	p<0,01		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,01		p<0,05	p<0,05		
Kontrolle vs. Lup						p<0,05						p<0,05						
Kontrolle vs. HHM																		
Öl 2 vs. Hum			p<0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05			p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05		
Öl 2 vs. Lup				p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,05					
Öl 2 vs. HHM																		
Hum vs. Lup		p<0,05	p<0,01															
Hum. Vs HHM			p<0,05		p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,01					
Lup vs. HHM						p<0,05			p<0,05									

Tab.3-13: Signifikante Unterschiede im Körpergewicht an den Versuchstagen, Student-Newman-Keuls Test, 1%- und 5%-Niveau

ungepflegtes Fell. Zusätzlich ergaben sich bei der Sektion Organengewichtsveränderungen bei der HHM'99 normal Gruppe (Abb.3-14). Das Schilddrüsengewicht dieser Versuchstiere war signifikant erhöht ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls), Thymus-, Uterus- und Ovariengewichte tendenziell, allerdings nicht signifikant erniedrigt.

In der Hum-Gruppe wogen die Tiere durchgängig ab dem 4. Behandlungstag (Tag 9) bis Versuchsende signifikant weniger als die Kontrolle (Tab.3-13). In dieser Gruppe starben 3 Tiere, eins an Tag 17 und zwei an Tag 21. Die Schilddrüsengewichte waren wie bei HHM'99 normal signifikant erhöht, Thymus-, Ovarien-, und Uterusgewichte tendenziell erniedrigt (Tab.3-14).

In der Lup-Gruppe starb nur eine Maus und zwar am 10. Behandlungstag (Tag 15). Die Tiere dieser Gruppe hatten keine reduzierte Körpergewichtszunahme, sie wogen an Tag 13

		Kontrolle		Öl 2 (200mg/kg)		Hum (200mg/kg)		Lup (200mg/kg)		HHM '99 n (200mg/kg)	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Gewicht	[g]	26,7	0,4	26,0	0,7	23,1	1,3	28,2	0,4	24,6	3,0
Leber	[g]	1,403	0,04	1,388	0,04	1,335	0,06	1,668	0,04	1,443	0,14
Nieren	[g]	0,294	0,03	0,284	0,01	0,268	0,01	0,314	0,01	0,279	0,02
Milz	[g]	0,110	0,01	0,115	0,01	0,085	0,02	0,105	0,00	0,123	0,01
Hypophyse	[mg]	2,3	0,32	2,1	0,18	2,2	0,29	2,6	0,38	1,8	0,24
Schilddrüse	[mg]	3,1	0,30	4,0	0,63	5,1	0,44	3,5	0,27	4,9	0,54
Nebenniere	[mg]	12,0	0,79	11,8	0,82	10,2	0,47	12,5	0,93	12,6	1,65
Thymus	[mg]	79,4	7,57	74,1	9,17	62,0	7,88	80,5	3,90	57,7	8,70
Uterus	[mg]	79,9	9,15	71,1	14,68	43,2	11,48	72,5	12,59	49,4	9,39
Ovarien	[mg]	10,9	0,95	12,6	1,68	8,5	2,15	10,1	1,31	9,2	1,32

Tab.3-14: Organgewichte weiblicher NMRI-Mäuse nach 20-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte gelöst in Wasser/2,5% Tween 80

und 19 signifikant mehr als die Kontrolltiere ($p < 0,05$). Die Mäuse dieser Versuchsgruppe hatten ein glänzendes Fell und wirkten wohlgenährter als die der Kontrollgruppe. Bei der Sektion wurden allerdings signifikant erhöhte Lebergewichte festgestellt ($p < 0,05$).

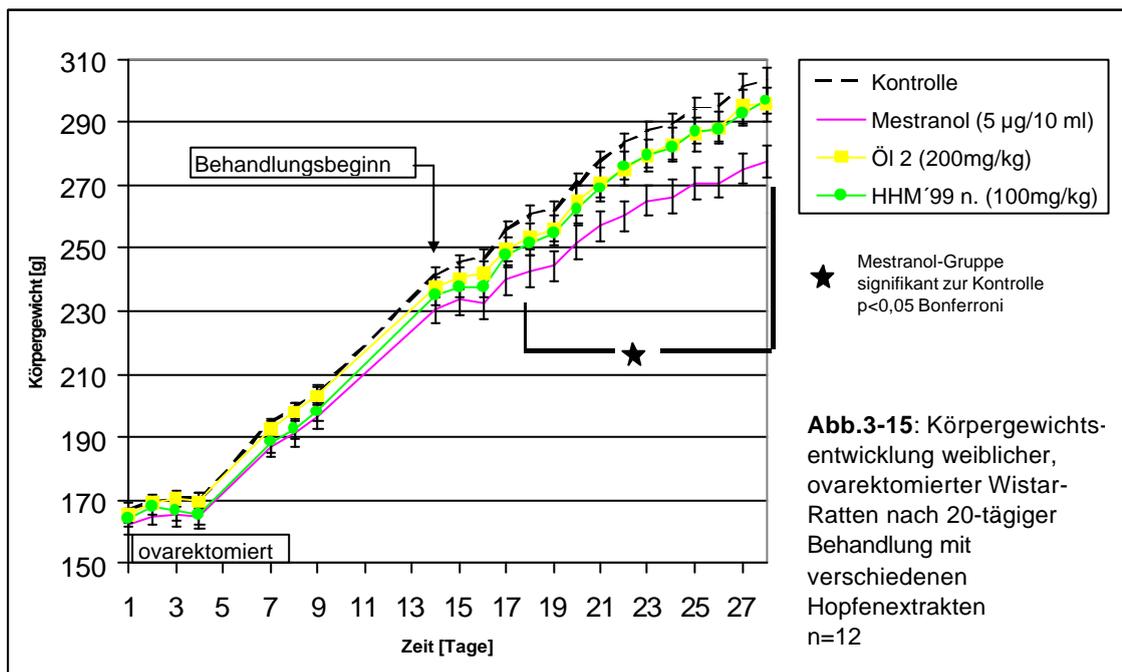
Die Körpergewichte der mit Öl 2 behandelten Tiere lagen in den ersten 12 Behandlungstagen leicht, aber nicht signifikant unter Kontrollniveau. Am folgenden Tag (Tag 18) wogen sie signifikant weniger (Tab.3-13, $p < 0,05$). Am gleichen Tag und Tag 19 sind 3 Tiere, die an den vorherigen Tagen stark abgenommen hatten, gestorben. Der Rest der Gruppe hat danach bis Versuchsende fast wieder das Kontrollniveau erreicht. Die Organgewichte der Öl 2 Gruppe lagen alle im Kontrollbereich und wiesen keine Besonderheiten auf.

Die Ergebnisse zeigen erneut, daß der Normalextrakt der Sorte Magnum (HHM '99 normal) toxische Eigenschaften besitzt, der alpha-Säuren reiche Extrakt Hum muß ebenfalls als toxisch eingestuft werden. Der beta-Säuren reiche Extrakt Lup wurde gut vertragen, allerdings könnten die erhöhten Lebergewichte ein Indiz für eine Lebertoxizität sein. Der ölreich

Extrakt Öl 2 verursachte keine Veränderungen an Körper- oder Organgewichten, jedoch starben 3 von 10 Tieren.

4.1.3.8 15-tägige Applikation der Extrakte Öl 2 und HHM'99 normal

Da in der Literatur von estrogenen Aktivität verschiedener Hopfenzubereitungen und des Inhaltsstoffes 8-Prenylnaringenin berichtet wurde (Liu et al.; Milligan et al.; Zierau et al.), sollte auf eine estrogenen Aktivität an weiblichen, ovariectomierten Wistar-Ratten geprüft werden. Die Extrakte wurden einmal täglich oral in einer Emulsion aus Wasser und 2,5 % Tween 80 zugeführt. Appliziert wurde Öl 2 in einer Dosierung von 200 mg/kg KG, der in anderen Versuchen toxisch gewesene Extrakt HHM'99 (siehe Abb.3-1) in einer niedrigeren Dosierung von 100 mg/kg KG und eine Vergleichsgruppe mit Mestranol. Zielparame-ter war das Körper- und Uterusgewicht der Tiere. Die Kontrolltiere erhielten Leitungswasser, die Positivkontrolle erhielt das Referenzestrogen Mestranol in einer Dosierung von 5 µg/kg KG



einmal täglich oral. Abb.3-15 zeigt die Entwicklung der Körpergewichte der einzelnen Gruppen über die Zeit in Tagen. Nach Entfernung der Ovarien wurden die Tiere auf eine estrogenfreie Hal- tungsdiaät umgestellt, um die externe Estrogenzufuhr zu minimieren. Alle Tiere nahmen in den folgenden Tagen stark an Gewicht zu (Tage 5-14), ein Hinweis auf eine erfolgreiche Operation. An Tag 15 wurde mit der Behandlung begonnen. Alle Tiere

nahmen an den nächsten zwei Tagen weniger stark zu, wahrscheinlich eine Folge der ungewohnten Sondierung, die zunächst Streß verursacht. Ab Tag 16 nahmen die Tiere aller Behandlungsgruppen wieder mehr zu, mit Ausnahme der Gruppe, die mit Mestranol behandelt war. Ab Tag 18 unterschieden sich die Körpergewichte dieser Gruppe von denen der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ Bonferroni), der Unterschied hielt bis Versuchsende an.

Tab.3-16 zeigt, daß nur in der Mestranolgruppe das Uterusgewicht als Indikator auf estrogenen Aktivität signifikant erhöht war (94 vs. 78 $p < 0,05$ Student-Newman-Keuls), die Uterus-Gewichte der beiden Hopfenextraktgruppen lagen auf Kontrollniveau. Bei diesen Gruppen waren die Lebergewichte signifikant erhöht ($p < 0,05$), obwohl das Körpergewicht

		Kontrolle		Mestranol (5 µg/10 ml)		Öl 2 (200mg/kg)		HHM '99 n. (100mg/kg)	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Gewicht	[g]	311,9	4,3	288,1	4,7	304,8	6,1	304,7	4,5
Leber	[g]	11,27	0,24	10,66	0,26	12,48	0,38	13,03	0,40
Nieren	[g]	2,02	0,03	1,88	0,05	1,96	0,03	1,92	0,02
Milz	[g]	0,929	0,05	0,884	0,02	0,904	0,04	0,965	0,04
Hypophyse	[mg]	12,4	0,32	11,6	0,46	12,6	0,40	12,2	0,65
Schilddrüse	[mg]	11,3	0,75	11,0	0,71	12,5	0,47	12,2	0,69
Nebenniere	[mg]	77,0	4,12	76,5	3,69	72,3	2,73	87,6	3,11
Thymus	[g]	1,2	0,07	1,1	0,06	1,2	0,07	1,1	0,08
Uterus	[mg]	77,8	4,77	94,2	7,71	76,9	4,73	76,5	5,29

Tab.3-16: Organgewichte weiblicher Wistar-Ratten nach 15-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte gelöst in Wasser/2,5% Tween 80. Unterlegte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls)

tendenziell niedriger war, ein möglicher Hinweis auf eine Lebertoxizität. Die mit HHM '99

normal behandelten Tiere wiesen außerdem ein signifikant erhöhtes Nebennierengewicht auf (87,6 vs. 77,0 $p < 0,05$), die übrigen Organgewichte lagen im Kontrollbereich.

4.1.3.9 37-tägige Applikation des Extraktes Lup und einer Mischung aus Lup und Ölrein

Der Extrakt Lup und eine Mischung aus Lup und Ölrein wurden über 5 Wochen verabreicht, um auf Beeinflussung von Organgewichten und estrogener Aktivität an weiblichen, ovariectomierten Ratten zu prüfen. Über den gesamten Versuchszeitraum erhielten die Tiere estrogenfreie Haltdiät. Die Extrakte wurden einmal täglich oral in einer Emulsion aus Wasser, Öl und Lecithin zugeführt. Der Extrakt Lup wurde in einer Dosierung von 200 mg/kg KG appliziert, die Mischung aus Lup und Ölrein in einer Dosierung von 83 mg/kg Lup plus 250 mg/kg KG Ölrein, das entspricht einem Verhältnis von 1 : 3. Die Positivkontrolle erhielt das Referenzestrogen Mestranol in einer Dosierung von 20 µg/kg KG einmal täglich oral, die Kontrollgruppe Leitungswasser. Die Anzahl in den Hopfenextraktgruppen betrug $n=10$ Tiere / Gruppe, in der Kontroll- und Mestranolgruppe $n=23$ Tiere / Gruppe. Da es sich um einen umfangreichen Versuch handelte, *in dem weitere Extrakte anderer Pflanzen getestet wurden*, konnten nicht alle Tiere gleichzeitig seziiert werden. Um bei allen Tieren innerhalb einer Gruppe eine gleichlange Behandlungszeit zu gewährleisten, wurde versetzt mit der Behandlung begonnen. Bei der Kontroll- und Mestranolgruppe wurden an Tag 1 und 2 nur 10 Tiere behandelt, an den Tagen 3 bis 5 12 Tiere, an Tag 6 und 7 18 Tiere, an Tag 8 20 Tiere und ab Tag 9 alle Tiere. Ab Tag 24 wurde der Versuch in umgekehrter Reihenfolge aufgelöst, so daß sich eine durchschnittliche Behandlungsdauer von 25 Tagen ergab. Die Hopfenextrakte wurden über den gesamten Versuchszeitraum von 37 Tagen appliziert. Abb.3-18 zeigt die Entwicklung der Körpergewichte der einzelnen Gruppen über die Zeit in Tagen. Die Ratten erreichten ovariectomiert das Labor, deshalb liegen zu vorherigen Zeitpunkten keine Daten vor. Tab.3-19 gibt die signifikanten Unterschiede an den einzelnen Tagen auf dem 1 %- und 5 %-Niveau an (Student-Newman-Keuls). An Tag 1 wogen die Tiere der Mestranolgruppe 19 g weniger als die Kontrolltiere, der Unterschied war signifikant ($p < 0,05$). Die Differenz blieb im Laufe des Versuches bestehen und vergrößerte sich

auf 26 g an den Tagen 23/23/24 ($p < 0,01$). An Tag 17 wurden einige Tiere der Kontrollgruppe nicht gewogen, daher erklärt sich der etwas höhere Mittelwert an diesem Tag. Die Tiere, die mit dem Extrakt Lup oder der Mischung aus Lup und Ölrein behandelt wurden, wogen ab Tag 4 bzw. 5 fast durchgehend bis Tag 23 signifikant weniger als die Kontrolltiere ($p < 0,05$). Danach war der Unterschied statistisch nicht mehr signifikant, da durch die Versuchsauflösung weniger Kontrolltiere vorhanden waren und an Tag 28 im Vergleich zum restlichen Kontrollkollektiv relativ schwere Tiere getötet wurden, so daß die Körpergewichtskurve nach unten knickte. Untereinander unterschieden sich die Gruppen Lup und Lup+Ölrein nicht, jedoch starben an Tag 10 und 25 je ein Tier, an Tag 13 zwei Tiere in der mit Lup behandelten Gruppe.

Die Organgewichte (Tab.3-20) wurden bei 14 Tieren aus der Kontroll-, 16 Tieren aus der Mestranol-, 9 Tieren aus der Lup+Ölrein- und 6 Tieren aus der Lup-Gruppe untersucht. Die Lebergewichte der beiden Hopfengruppen waren um über 35 % gegenüber der Kontrolle

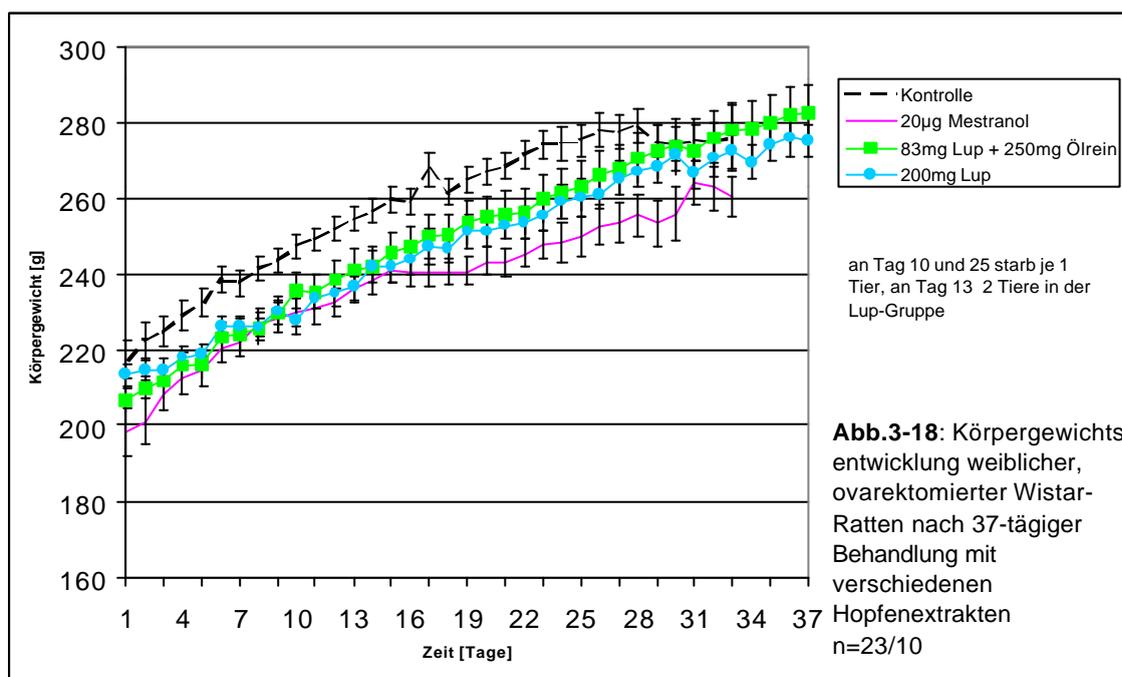


Abb.3-18: Körpergewichtsentwicklung weiblicher, ovariectomierter Wistar-Ratten nach 37-tägiger Behandlung mit verschiedenen Hopfenextrakten n=23/10

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Kontrolle vs. Mestranol	0,05	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Kontrolle vs. Lup+Ölrein				0,05	0,05	0,05		0,05	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05	
Kontrolle vs. Lup					0,05	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05	0,05	
Mestranol vs. Lup+Ölrein																								
Mestranol vs. Lup																								
Lup+Ölrein vs. Lup																								

Tab.3-19 Signifikante Unterschiede im Körpergewicht an den Versuchstagen, Student-Newman-Keuls Test, 1%- und 5%-Niveau

signifikant erhöht (11,7/11,85 vs. 8,5 $p<0,01$). In der Lup-Gruppe war das Thymusgewicht ($p<0,01$), in der Lup+Ölrein-Gruppe das Uterusgewicht signifikant erniedrigt ($p<0,05$). Die übrigen Organgewichte lagen im Bereich der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Mestranol führte zu einer signifikanten, wenn auch geringfügigen Erhöhung des Ute-

		Kontrolle		Mestranol 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Lup + Ölrein 83+250 mg/kg		Lup 200 mg/kg	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Leber	[g]	8,5	0,26	8,1	0,64	11,7 $p<0,01$	0,51	11,86 $p<0,01$	0,47
Nieren	[g]	1,97	0,43	1,50	0,04	1,63	0,06	1,44	0,05
Milz	[g]	0,698	0,02	0,655	0,02	0,697	0,05	0,693	0,03
Hypophyse	[mg]	12,0	0,53	11,0	0,47	10,3	0,65	10,5	0,91
Schilddrüse	[mg]	12,3	0,67	11,3	0,80	13,5	0,63	12,0	0,77
Nebenniere	[mg]	90,3	4,43	98,6	4,64	79,1	3,61	88,4	3,62
Thymus	[g]	0,9	0,04	0,7	0,03	0,8	0,04	0,638 $p<0,01$	0,05
Uterus	[mg]	62,7	1,77	78,72 $p<0,01$	3,29	51,45 $p<0,05$	3,10	61,7	1,58

Tab.3-20: Organgewichte weiblicher Wistar-Ratten nach 37-tägiger, 1xtägl., oraler Applikation verschiedener CO₂-Hopfenextrakte emulgiert in Wasser/Öl/Lecithin. Unterlegte Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (Student-Newman-Keuls Test)

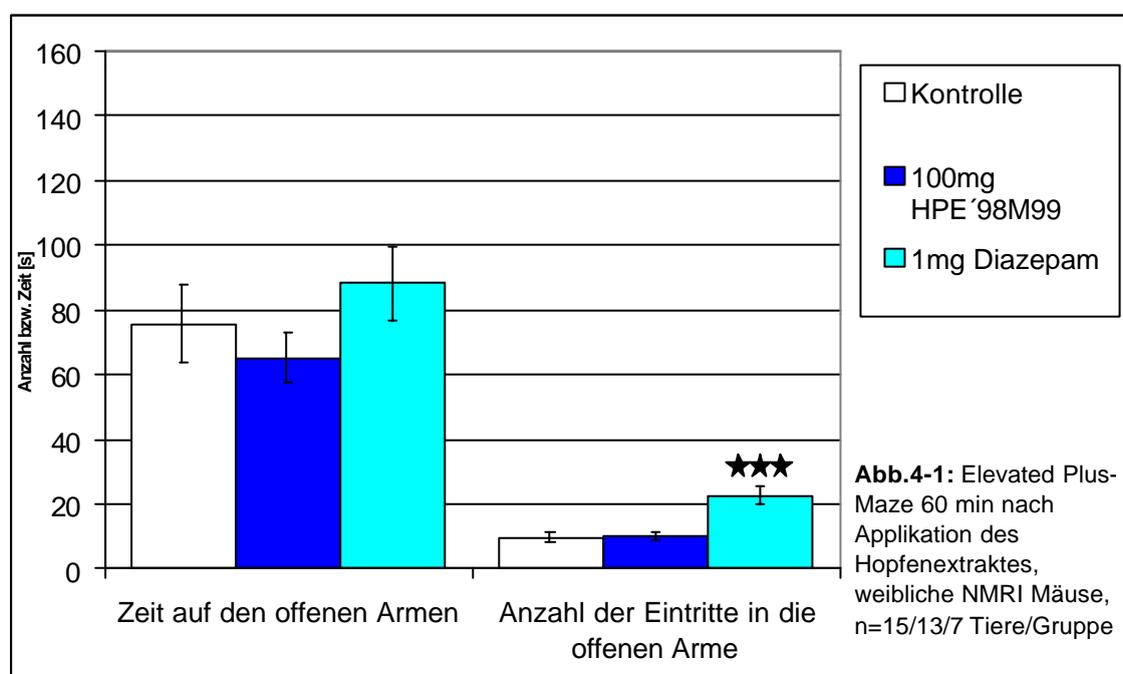
rusgewichtes (78,7 vs 62,7 $p<0,01$).

Eine estrogene Wirkung ist für den Extrakt Lup oder die Mischung aus Lup und Ölrein aufgrund des estrogenabhängigen Parameters Uterusgewicht nicht zu erkennen. Eine Dosis von 200 mg/kg KG Lup wirkte jedoch auf die weiblichen Ratten toxisch, da 4 von 10 Tieren starben.

4.1.4 Testung auf anxiolytische Aktivität

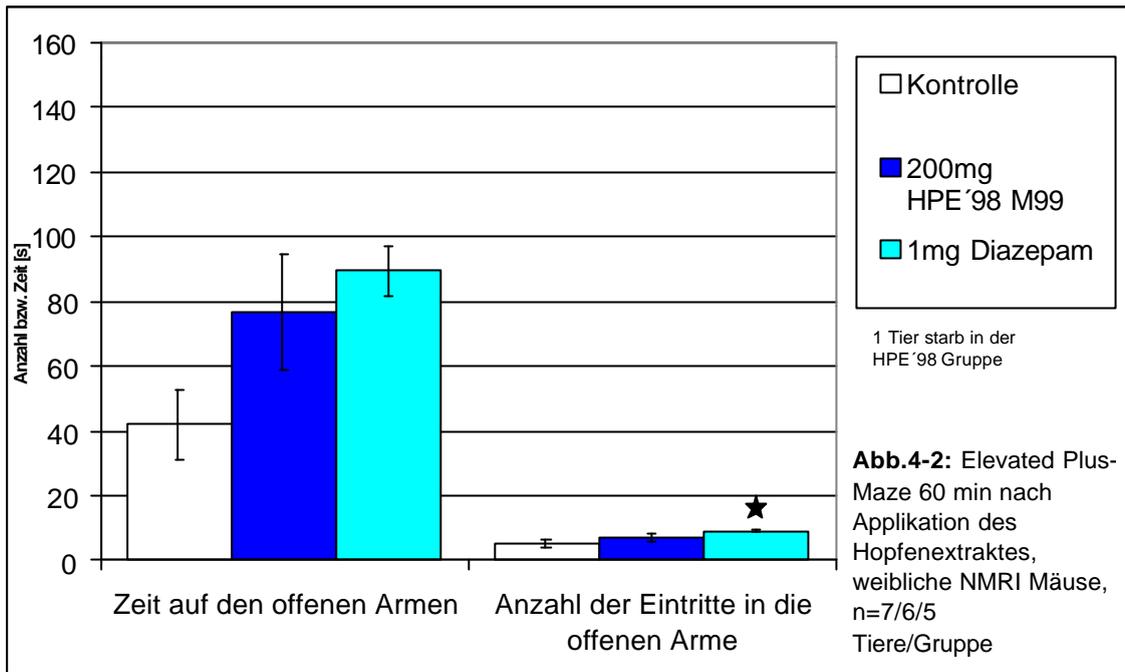
Hopfen-Extrakt HPE'98 März'99

Der Extrakt HPE'98 März'99 wurde in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlicher Latenzzeit auf anxiolytische Aktivität im Elevated Plus-Maze (im folgenden "EPM" genannt) getestet. Der Extrakt wurde mit der Methode "Lösung in Milch" emulgiert und weiblichen NMRI-Mäusen in einer Dosis von 100 mg/kg KG oral appliziert. Abb.4-1 zeigt das Ergebnis nach einer Latenzzeit von 60 Minuten. Die Ordinate besitzt eine doppelte Skala, für den linken Teil der Abbildung stellt sie die auf den offenen Armen verbrachte Zeit in Prozent der Gesamtzeit dar, für den rechten Teil die Anzahl der Eintritte in die offe-



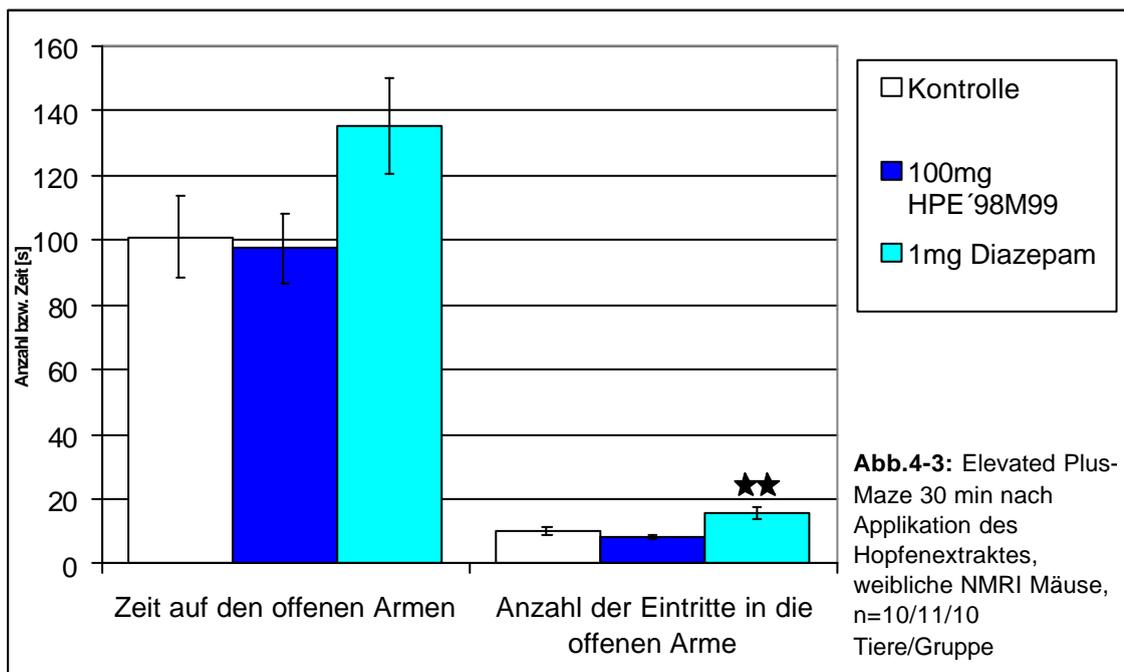
nen Arme. Als Positivkontrolle wurde Diazepam in einer Dosis von 1 mg/kg KG gegeben. Die Gabe des Hopfenextraktes beeinflusste keinen der beiden Testparameter, Diazepam erhöhte signifikant die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme ($p < 0,001$ Bonferroni). Der Extrakt HPE'98 März'99 zeigte in einer Dosierung von 100 mg/kg KG keine anxiolytische Aktivität, die Sensitivität des Tests war durch die Diazepam-Vergleichsgruppe gewährleistet.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde eine Dosis von 200 mg/kg KG getestet (Abb.4-2), nur war die n-Zahl geringer. In der mit HPE'98 behandelten Gruppe starb ein



Tier innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation, daher konnten nur noch 6 Tiere getestet werden, ein Tier saß teilweise regungslos auf dem Maze. Die übrigen Tiere dieser Gruppe zeigten beim Parameter "Zeit auf den offenen Armen" eine große Streuung zwischen 40 und 145 Sekunden.

In einer Dosierung von 200 mg/kg KG emulgiert mit Milch zeigte HPE'98 März'99 toxische Effekte, eine Aussage über die anxiolytische Aktivität konnte deshalb nicht getroffen werden.

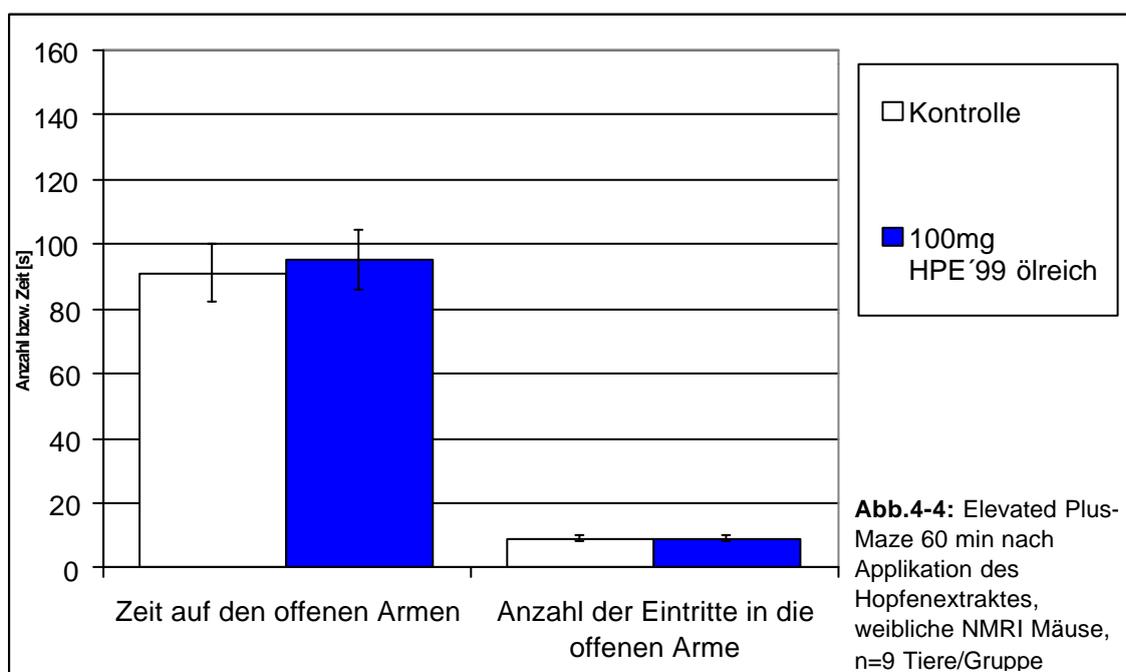


Um eine mögliche, kurz andauernde Wirkung nicht zu übersehen, wurde eine Gabe von 100 mg/kg KG mit der halben Latenzzeit von nur 30 Minuten untersucht. Abb.4-3 zeigt, daß unter gleichen Versuchsbedingungen die Tiere aller Gruppen nach einer Latenzzeit von 30 Minuten im Vergleich zu 60 Minuten mehr Zeit auf den offenen Armen verbrachten, während die Anzahl der Eintritte insgesamt nicht erhöht wurde. Wahrscheinlich waren die Tiere durch die kürzere Zeitspanne zwischen Applikation des Extraktes und Testbeginn aufgeregter. Die mit HPE'98 März'99 behandelte Gruppe lag bei beiden Versuchsparametern auf Kontrollniveau, die Positivkontrolle deutlich darüber, die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme war signifikant erhöht (16 vs. 10 $p < 0,01$ Student-Newman-Keuls).

Das Ergebnis zeigt, daß HPE'98 März'99 (100 mg/kg KG) auch nach einer Latenzzeit von 30 Minuten keinen anxiolytische Effekt bewirkte.

Hopfen-Extrakt HPE'99 ölreich

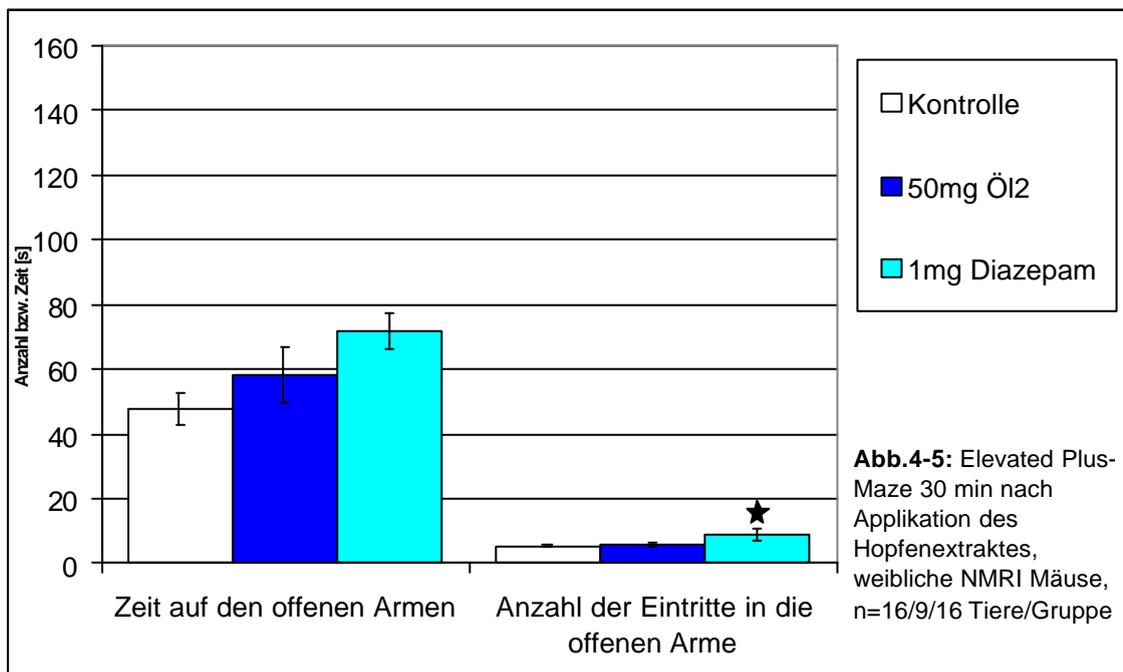
Bei vorherigen Versuchen befanden sich die Tiere im Vergleich zur gesamten Versuchsdauer von 5 Minuten relativ kurz auf den offenen Armen, 25 % der Gesamtzeit bei Versuch Abb.4-1 und 14 % bei Versuch Abb.4-2. Um die Verweildauer auf den offenen Armen zu erhöhen, wurde bei diesem Versuch die normale Raumbeleuchtung durch Rotlicht ersetzt,



da Mäuse nachtaktive Tiere sind und unter diesen Bedingungen eine erhöhte Aktivität aufweisen. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wie bei HPE'98 März'99 wurde der Extrakt in Milch emulgiert und an Mäusen getestet. Abb.4-4 zeigt, daß nach der Gabe von 100 mg/kg KG kein anxiolytischer Effekt erkennbar ist, bei beiden Versuchsparametern befanden sich Kontroll- und Extraktgruppe auf einem Niveau. Die auf den offenen Armen verbrachte Zeit der Kontrolle war unter der Rotlichtbeleuchtung mit 30 % nur wenig höher als bei den vorherigen Versuchen nach einer Latenzzeit von 60 Minuten.

Hopfen-Extrakt Öl 2

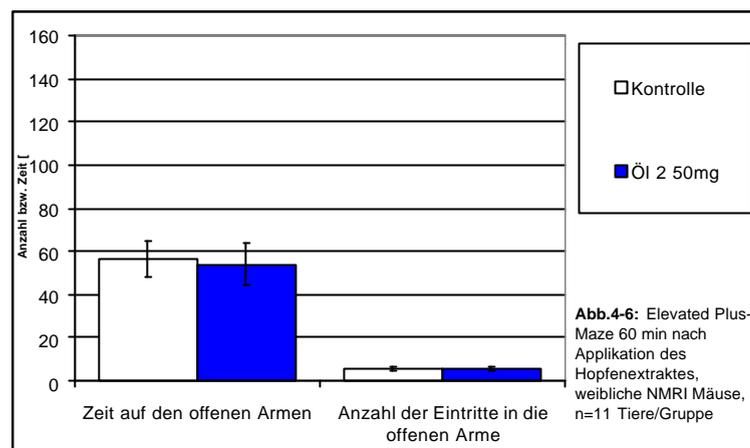
Der Extrakt wurde in einer Dosierung von 50 und 100 mg/kg KG im EPM getestet. Zur Applikation wurde aus dem Extrakt eine Emulsion mit der Methode "Tween 80 und Ultra-Turrax" hergestellt und den Mäusen oral appliziert. Der Beobachtungsraum wurde mit gedämpften Licht aus Energiesparlampen ausgeleuchtet. Abb.4-5 zeigt das Ergebnis nach



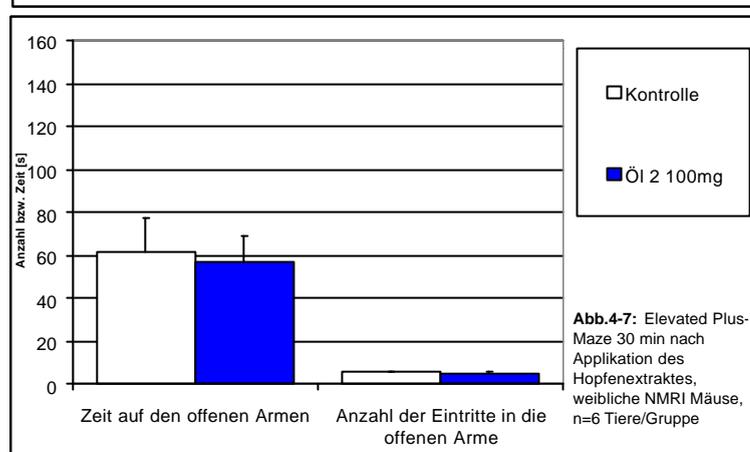
einer Gabe von 50 mg/kg KG nach einer Latenzzeit von 30 Minuten. Die auf den offenen Armen verbrachte Zeit war in der Öl 2-Gruppe nicht signifikant um 11 Minuten erhöht, die Anzahl der Eintritte unverändert. Bei der Positivkontrolle, die 1 mg/kg KG Diazepam erhielt, war die Zeit auf den offenen Armen um 24 Sekunden verlängert. Der Unterschied

war nur bei Verwendung des schwächeren Fisher-PLSD Tests signifikant ($p < 0,05$). Die Anzahl der Eintritte war signifikant erhöht ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls).

Die gleiche Dosis wurde nach einer Latenzzeit 60 Minuten unter sonst gleichen Versuchsbedingungen untersucht. Abb.4-6 zeigt, daß die mit Öl 2 behandelte Gruppe in beiden Versuchsparametern auf Kontrollniveau lag.



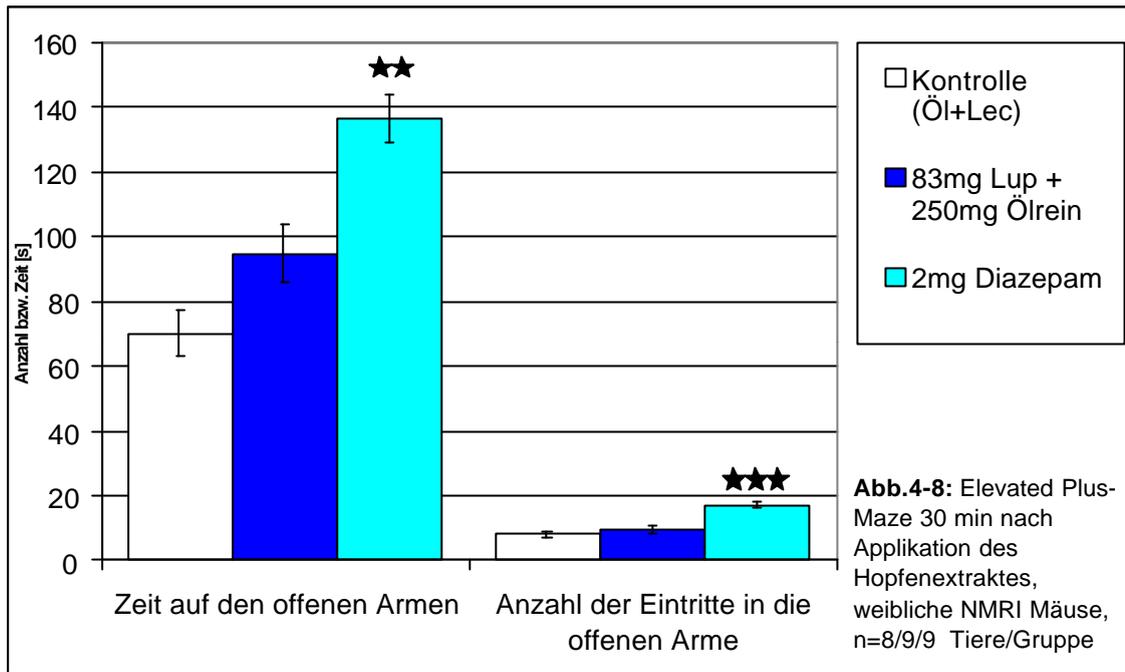
Eine Steigerung der Dosis auf 100 mg/kg KG (Abb.4-7) bei einer Latenzzeit von 30 Minuten führte zu keiner Verlängerung der auf den offenen Armen verbrachten Zeit, die Anzahl der Eintritte lag ebenfalls auf Kontrollniveau.



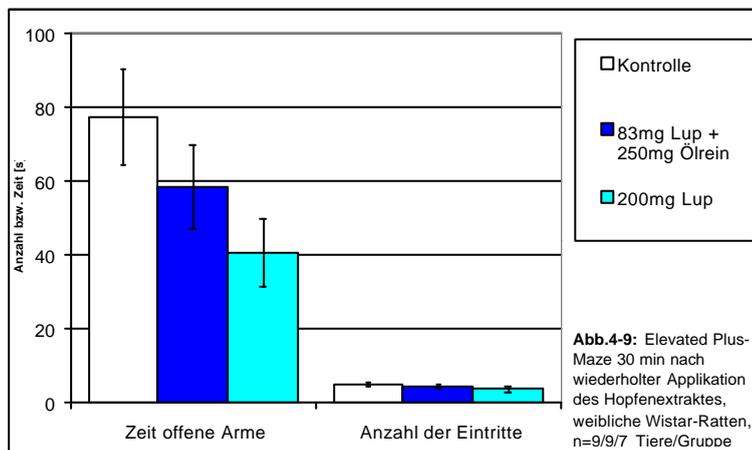
Der Extrakt Öl 2 zeigte in den Dosierungen 50 und 100 mg/kg KG keine anxiolytische Aktivität im EPM.

Mischung aus den Hopfenextrakten Lup und Ölrein

Eine Mischung aus den Extrakten Lup und Ölrein wurde im Verhältnis 1:3 untersucht. Die Dosierung betrug 83 mg/kg Lup + 250 mg/kg KG Ölrein, appliziert in einer Emulsion aus Wasser/Öl/Lecithin, hergestellt mit dem UltraTurrax. Die Beleuchtung des Beobachtungsraumes erfolgte mit Sparlampen. Die Diazepam-Dosis der Positivkontrolle wurde auf 2 mg/kg KG erhöht, da in vorherigen Versuchen 1 mg/kg KG keine signifikante Verlängerung der auf den offenen Armen verbrachten Zeit bewirkte. Abb.4-8 zeigt, daß nach einer Latenzzeit von 30 Minuten die Gabe der Extraktmischung eine nicht signifikante Verlänge-



Die auf den offenen Armen verbrachte Zeit um 25 Sekunden bewirkte, die Diazepam Gabe eine signifikante Verlängerung um 66 Sekunden ($p < 0,01$ Bonferroni). Die mit der Extraktmischung behandelten Tiere betraten durchschnittlich 9 mal die offenen Arme, die Kontrollen 8 mal und die mit Diazepam behandelten Tiere 17 mal (17 vs. 8 $p < 0,001$ Bonferroni).



Die Extraktmischung wurde auch an weiblichen, ovariectomierten Wistar-Ratten nach mehrtägiger Applikation auf anxiolytische Aktivität untersucht. Dabei handelte es sich um die Tiere aus dem unter 3.1.3.9 besprochenen Versuch. Eine Gruppe erhielt die

Extraktmischung, die andere den Extrakt Lup in einer Dosierung von 200 mg/kg KG. Das EPM wurde an Tag 17 des Versuches nach der Applikation des Extraktes mit einer Latenzzeit von 30 Minuten durchgeführt. Der Beobachtungsraum war mit Sparlampen beleuchtet. Abb.4-9 zeigt, daß keiner der Meßparameter erhöht war. Die auf den offenen Armen ver-

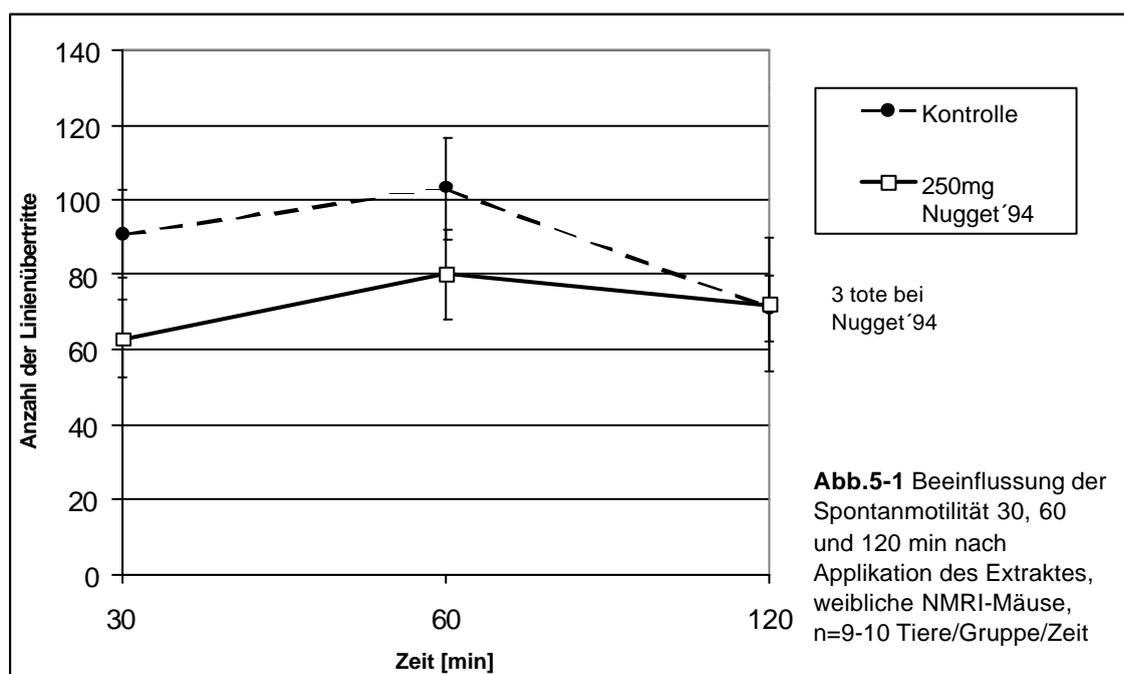
brachte Zeit war in den mit Hopfenextrakten behandelten Gruppen sogar erniedrigt, wenn auch nicht signifikant.

Die Gabe der Extraktmischung verursachte keine anxiolytische Wirkung, die untersuchten Testparameter unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollwerten.

4.1.5 Testung auf Beeinflussung der Spontanmotilität

Hopfen-Extrakt Nugget '94

Der Extrakt Nugget '94 wurde in einer Dosierung von 250 mg/kg KG im Open Field untersucht. Der Extrakt wurde weiblichen NMRI-Mäusen in einer Emulsion aus Milch oral appliziert, jeweils eine Extrakt- und eine Kontrollgruppe wurde nach 30, 60 und 120 Minuten getestet. Die Gruppenstärke betrug 9 bis 10 Tiere pro Gruppe. In Abb.5-1 ist die Anzahl der Linienübertritte nach 5 Minuten Beobachtungszeit gegen die Latenzzeit aufgetragen. 30 Minuten nach der Applikation war die Anzahl der Linienübertritte in der mit Extrakt behandelten Gruppe nicht signifikant um 30 % erniedrigt, nach 60 Minuten tendenziell gesenkt



und nach 120 Minuten befanden sich Kontroll- und Extraktgruppe auf einem Niveau. In den drei mit Extrakt behandelten Gruppen starb je ein Tier innerhalb von 3 Stunden nach der Applikation. Tab.5-2 gibt die zusätzlichen Parameter Rearing und Anzahl der Blicke durch die äußeren und inneren Löcher an. Im oberen Teil sind die Mittelwerte angegeben, im unteren Teil die dazugehörigen Standardfehler. Nach 30 Minuten war die Anzahl der Blicke durch die äußeren Löcher signifikant gesenkt ($p < 0,05$ T-Test), alle anderen Werte unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle.

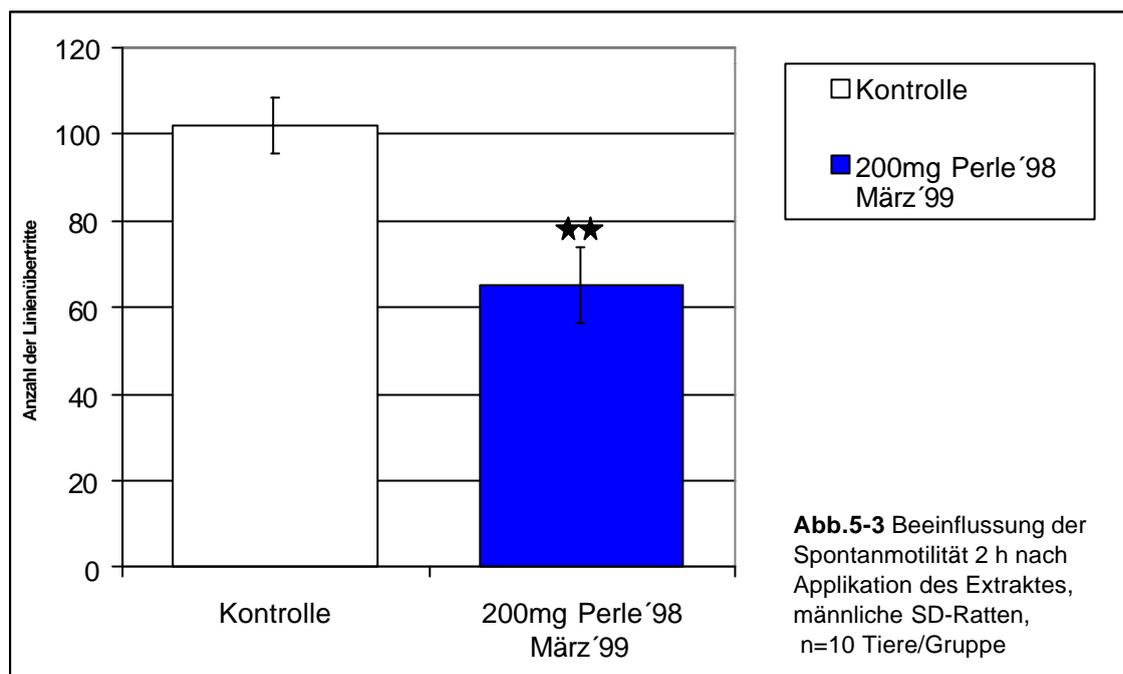
	30 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	Nugget´94	Kontrolle	Nugget´94	Kontrolle	Nugget´94
Linien	91	63	103	80	71	72
Rearing	12	7	11	10	9	8
Löcher außen	22	12	21	16	15	20
Löcher innen	3	2	4	2	2	2
Standardfehler	11,7	10,4	13,6	12,1	8,6	17,6
	2,4	1,8	1,5	1,2	1,5	1,4
	2,9	3,0	2,8	2	2,5	2,8
	0,4	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7

Tab.5-2 Open Field nach Gabe von 250 mg/kg KG Nugget´94, weibliche NMRI, n=9-10 Tiere/Gruppe

Der Extrakt Nugget´94 senkte in der getesteten Dosis tendenziell oder signifikant 30 Minuten nach der Applikation die untersuchten Meßparameter, der Effekt war nach 2 Stunden nicht mehr nachweisbar.

Hopfen-Extrakt HPE´98 März´99

Der Extrakt HPE´98 wurde in einer Dosierung von 200 mg/kg KG an männlichen SD-Ratten getestet. Der Extrakt wurde mit Milch emulgiert und oral appliziert. Die Latenzzeit bis zum Einsetzen in das Open Field betrug zwei Stunden. Der Beobachtungsraum wurde durch einen gedimmten Deckenfluter ausgeleuchtet. Abb.5-3 zeigt, daß die Spontanmotilität durch Gabe des Extraktes signifikant um 36 % gesenkt wurde (65 vs 102 $p < 0,01$ T-Test). Der Extrakt HPE´98 März´99 bewirkte eine deutliche Sedierung.



Hopfen-Extrakt Öl 2

Der Extrakt wurde in einer Dosierung von 200 mg/kg KG an weiblichen NMRI-Mäusen getestet. Mit der Methode "Lösung in Tween 80 mit UltraTurrax" wurde eine Emulsion hergestellt und den Tieren oral appliziert. Nach einer Latenzzeit von 30, 60 oder 120 Minuten wurden die Mäuse in das Open Field gesetzt, Tab.5-4 zeigt die Ergebnisse. Der Versuch

	30 min		60 min		120 min	
	Kontrolle	Nugget '94	Kontrolle	Nugget '94	Kontrolle	Nugget '94
Linien	97	64	115	75	69	63
Löcher außen	15	14	28	20	17	16
Löcher innen	2	2	4	2	2	2
Stanfardfehler	10,4	7,2	12,6	4,5	4,8	7,9
	2	2	3,6	2,7	0,6	1,0
	0,5	0,5	0,6	0,4	2,5	2,9

Tab.5-4 Open Field nach Gabe von 200 mg/kg KG Öl 2, weibliche NMRI, n=16/10/10 Tiere/Gruppe

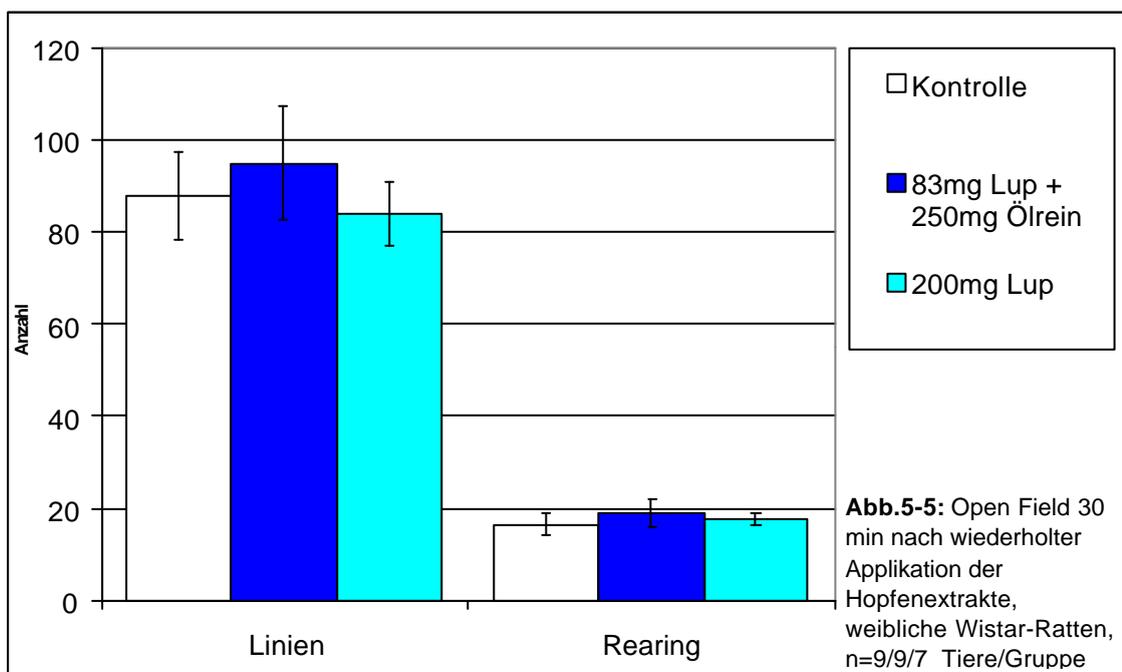
nach 30 Minuten wurde mit je 16 Tieren pro Gruppe durchgeführt, die anderen mit je 10 Tieren pro Gruppe. Bei einer Latenzzeit von 30 Minuten war nur die Anzahl der Linienüberschreitungen bei den mit Öl 2 behandelten Tieren erniedrigt (64 vs 97 $p < 0,05$ T-Test),

bei einer Latenzzeit von 60 Minuten waren alle gemessenen Parameter signifikant erniedrigt ($p < 0,01$ T-Test). Die Extraktgruppe, die erst nach zwei Stunden ins Open Field gesetzt wurde, bewegte sich auf Kontrollniveau.

Die Gabe einer Dosis von 200 mg/kg KG Öl 2 bewirkte bei weiblichen NMRI Mäuse eine deutliche Senkung der Spontanmotilität, die nach einer Stunde ihr Maximum erreichte und nach zwei Stunden nicht mehr nachweisbar war.

Hopfen-Extrakte Lup und Ölrein

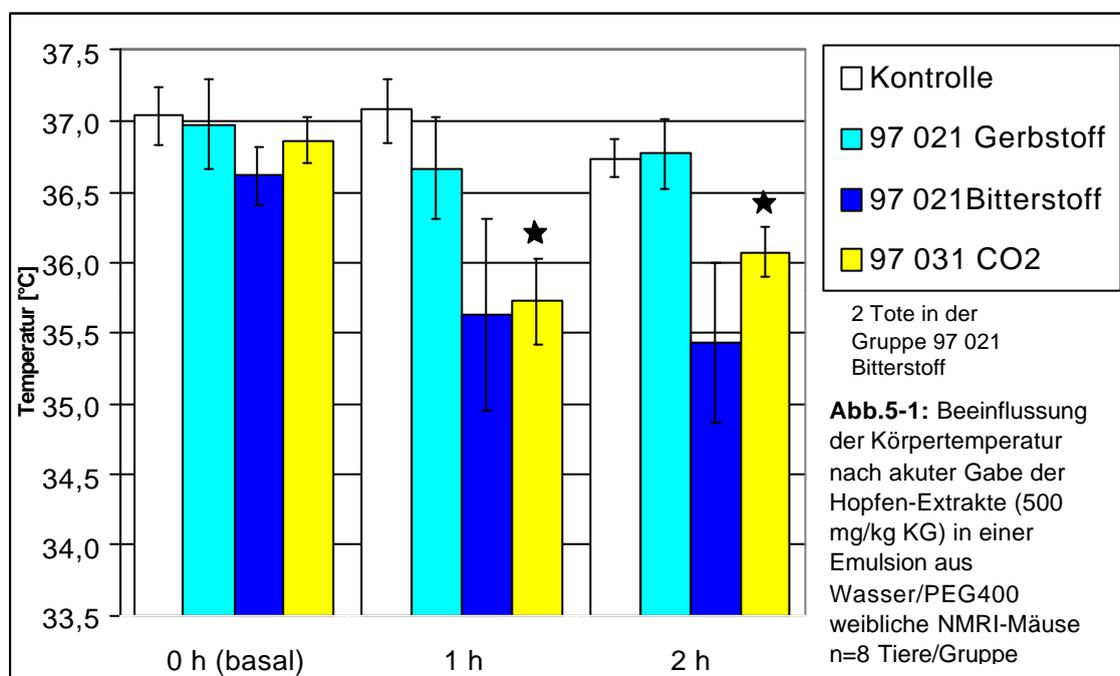
Der Extrakt Lup und eine Mischung aus Ölrein und Lup wurde an weiblichen, ovariectomierten Wistar-Ratten getestet. Dabei handelte es sich um die Tiere aus dem unter 4.1.3.9 besprochenen Versuch. Eine Gruppe erhielt die Extraktmischung aus 83 mg/kg Lup + 250 mg/kg KG Ölrein, die andere den Extrakt Lup in einer Dosierung von 200 mg/kg KG. Das Open Field wurde an Tag 18 des Versuches nach der Applikation des Extraktes mit einer Latenzzeit von 30 Minuten durchgeführt. Abb.5-5 zeigt, daß die Spontanmotilität der Tiere durch die Gabe der Extrakte nicht beeinflusst wurde. Kontroll- und mit Extrakt behandelte Tiere befanden sich bei sowohl bei der Anzahl der Linienüberschreitungen als auch bei der Anzahl der Rearings auf einem Niveau.



4.1.6 Testung auf Beeinflussung der Körpertemperatur

Hopfen-Extrakte 97 031 CO₂, 97 021 Bitterstoffphase und 97 021 Gerbstoffphase

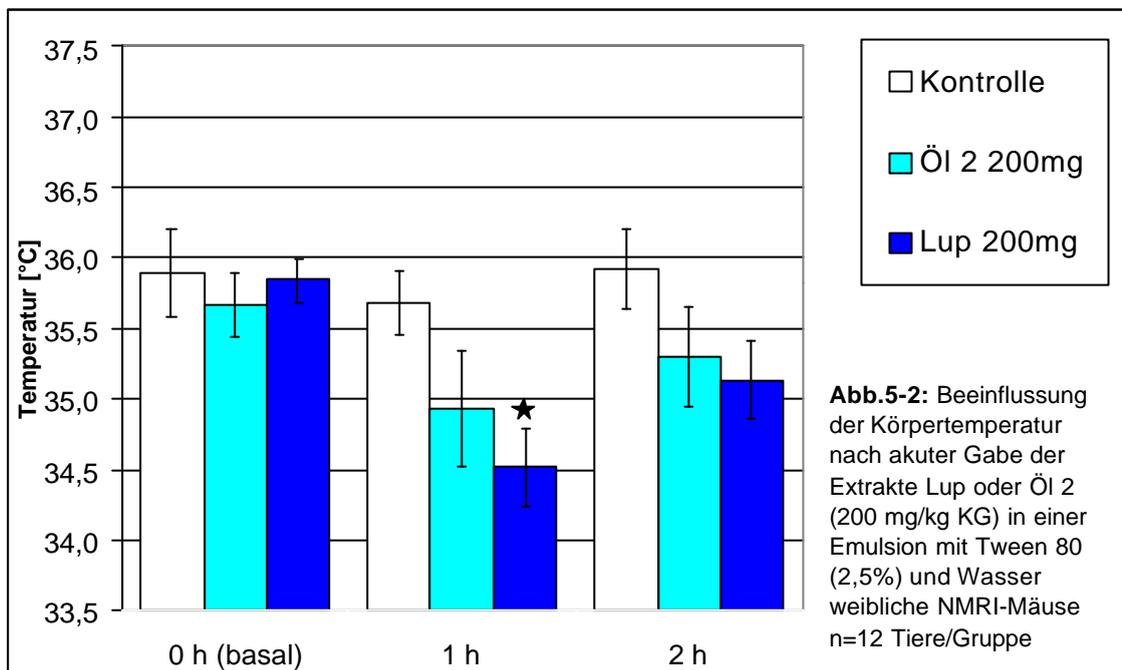
Die drei Extrakte aus dem gleichen Rohhopfenmaterial wurden weiblichen NMRI-Mäusen in einer Dosierung von 500 mg/kg KG oral verabreicht. Die Gruppenstärke betrug jeweils n=8 Tiere pro Gruppe. Die rektale Körpertemperatur wurde vor der Behandlung (basal) sowie eine und zwei Stunden nach der Applikation der Testlösungen bestimmt. Die Extrakte wurden zuvor mit der Methode „Lösung in PEG 400 und Ultraschall“ emulgiert. Wie Abb.5-1 zeigt, senkte die Gabe des Extraktes und 97 031 CO₂ die Körpertemperatur



nach einer und zwei Stunden ($p < 0,05$ Student-Newman-Keuls), der Effekt war nach einer Stunde ausgeprägter als nach zwei Stunden. In der mit 97 021 Bitterstoffphase behandelten Gruppe starben zwei Tiere, die übrigen wiesen im Gegensatz zur basalen Messung nach der Applikation eine große Inhomogenität innerhalb der Gruppe auf, daher erklärt sich der große Fehlerbalken. Die Gabe des Extraktes 97 021 Gerbstoffphase führte zu keiner Beeinflussung der Körpertemperatur.

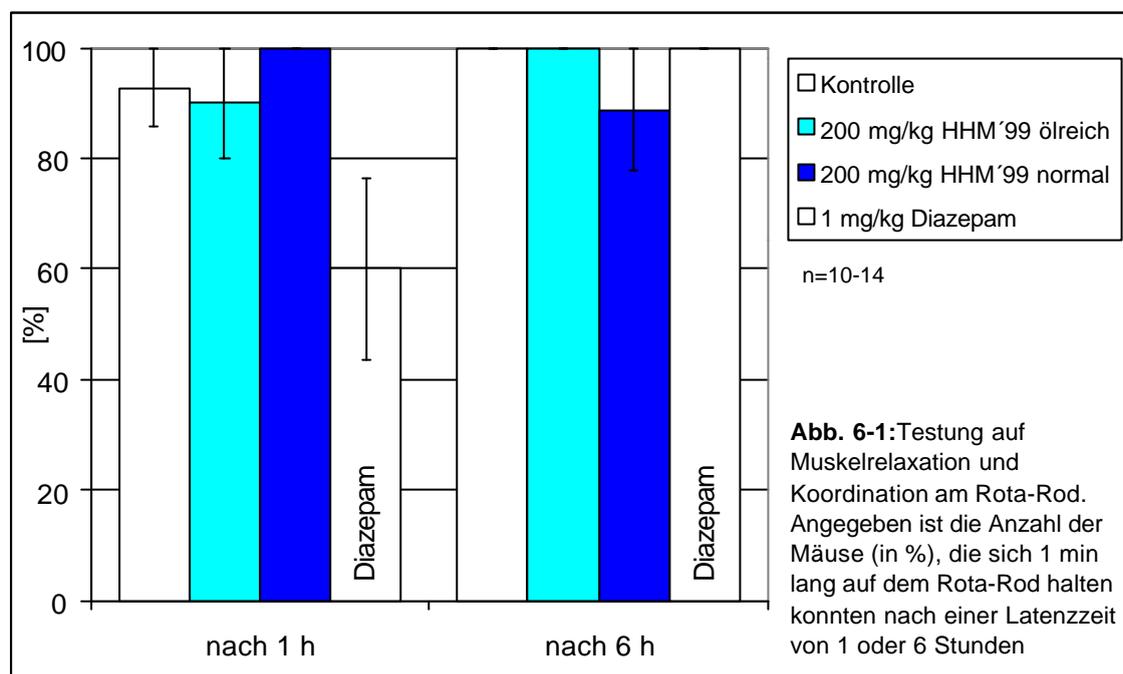
Hopfen-Extrakte Öl 2 und Lup

Die Extrakte wurden mit der Methode „Lösung mit Tween 80 und UltraTurrax“ emulgiert und in einer Dosierung von 200 mg/kg KG getestet. Die Gruppenstärke betrug n=12 Mäuse pro Gruppe. Abb.5-2 zeigt, daß die Gabe von Lup eine Stunde nach der Applikation eine signifikante Senkung der Körpertemperatur um 1,3 °C bewirkte ($p < 0,05$), der Effekt war nach zwei Stunden geringer und nicht mehr signifikant. Die Gabe des Extraktes Öl 2 senkte die Körpertemperatur, jedoch war der Effekt weniger stark ausgeprägt und zu keiner Zeit signifikant.



4.1.7 Testung auf Muskelrelaxation und Muskelkoordination

Zur Bestimmung der Muskelrelaxation und Beeinflussung der Muskelkoordination wurde den Tieren der Extrakt oral appliziert und nach einer Latenzzeit von 1 und 6 Stunden auf dem Rota-Rod getestet. Die Extrakte wurden in Milch emulgiert, die Kontrolle erhielt reine Milch. Die Positivkontrolle erhielt 1 mg/kg KG Diazepam oral. In Abb. 6-1 ist die Anzahl der Mäuse, die sich 1 Minute auf dem Rota-Rod halten konnten, in Prozent aller Mäuse der jeweiligen Gruppe dargestellt.



Weder nach einer Latenzzeit von 1 noch nach 6 Stunden beeinflusste die Gabe der Hopfenextrakte die Muskelkoordination oder führte zu einer Muskelrelaxation. Die unterschiedlichen Prozentangaben bei Kontrolle und HHM'99 öereich Gruppe kommen durch die unterschiedliche Gruppengröße zustande (Kontrolle n=14, HHM'99 öereich n=10), pro Gruppe fiel nur jeweils eine Maus herunter.

Der Extrakt Perle'98 März'99 wurde in einer Dosis von 400 mg/kg KG im Rota-Rod Test geprüft. Der Extrakt wurde in Milch emulgiert und oral appliziert. Ein Tier starb in der mit Extrakt behandelten Gruppe, die übrigen konnten sich nach Latenzzeiten von 2 und 5 Stunden 1 Minute lang auf dem Rota-Rod halten und wiesen keine sonstigen Verhaltensauffälligkeiten auf.

5 DISKUSSION

Zubereitungen aus *Humulus lupulus* werden angewendet bei Unruhe, Angstzuständen und Schlafstörungen (Monographie der Kommission E, 1990), in den meisten Fällen kombiniert mit Extrakten aus *Valeriana*, gelegentlich auch mit *Passiflora*. Untersuchungen zu den beanspruchten Indikationsgebieten liegen zu den Kombinationen vor, während die Wirkung des Humulusextraktes nur in geringem Umfang untersucht wurde. Deshalb war es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, verschiedene Zubereitungen aus *Humulus lupulus* im Tierexperiment auf sedierende Effekte zu prüfen.

Sedierende wie auch stimulierende zentrale Effekte lassen sich an Hand von Veränderungen der Spontanmotilität erfassen. Zum Erfassen der Motilität wurde ein System mit Lichtschrankenkäfigen gebaut, das die Aktivität kontinuierlich registriert und damit erlaubt, den Wirkeintritt und die Wirkdauer einer Substanz zu erkennen.

In dem Modell wurden verschiedene Konzentrationen von Diazepam und Coffein als Standard-Sedativa bzw. Stimulantien geprüft. So ließ sich nach oraler Gabe für Coffein eine schnelle und langanhaltende Stimulation nachweisen, für Diazepam wurde eine Sedierung ab einer Gabe von 2 mg/kg KG deutlich, bei Dosissteigerung war der Effekt ausgeprägter und hielt länger an. Die Ergebnisse der Testung eines Hopfenextraktes in diesem Modell wurden mit denen in einem „klassischen“ Open Field verglichen, bei dem die Zahl der Linienübertritte über einen Zeitraum von fünf Minuten registriert werden. Das Ergebnis zeigte eine gute Übereinstimmung. Deshalb schien das Modell geeignet, verschiedene Hopfenzubereitungen vergleichend auf sedierende Effekte zu untersuchen.

Da Zubereitungen aus *Humulus lupulus* auch bei Schlafstörungen eingesetzt werden, sollte zusätzlich auf die Verlängerung einer Narkotika-induzierten Schlafzeit geprüft werden. Eine solche Testung zeigt neben Hypnotika auch Sedativa und Tranquillantien an.

Als weitere Wirkqualität wurde auf eine anxiolytische Wirkung im Elevated Plus Maze geprüft.

Die Untersuchung verschiedener Hopfenzubereitungen auf sedierende Wirkung in pharmakologischen Modellen führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den eigenen

Untersuchungen wurde für unterschiedliche Extrakte nach oraler Zufuhr eine dosisabhängige Reduktion der Spontanmotilität und eine Verlängerung der Ketamin induzierten Schlafzeit gefunden. Entsprechend beobachteten Lee et al. nach intraperitonealer Injektion eines Hopfenextraktes an Mäusen eine Verlängerung der Pentobarbital-Narkose-Dauer und eine Reduktion der Spontanmotilität. Die Koordination der Tiere, am Rotarod geprüft, war beeinträchtigt. Als Indiz für eine sehr ausgeprägte sedierende Wirkung ist der Befund zu sehen, dass das Auftreten von Pentylentetrazol-induzierten Krämpfen hinausgeschoben und die Überlebenszeit verlängert wurde (Lee et al., 1993).

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen fanden Hänsel und Wagener keine sedierende Wirkung an Mäusen und Ratten. Getestet wurde auf eine Verlängerung der Barbiturat-induzierten Schlafzeit, eine Beeinträchtigung der motorischen Aktivität und auf Beeinträchtigung der Koordination am Rotarod (Hänsel and Wagener, 1967). Getestet wurde 30-60 Minuten nach Sondierung, Dosierungen zwischen 50 und 200 mg/kg ergaben keinen Effekt, Dosierungen von 500 mg/kg bewirkten eine leichte, nicht signifikante Sedierung.

Als Ursache für die abweichenden Ergebnisse von Hänsel und Wagener kommen in Frage:

1. Das verwendete Ausgangsmaterial: Aus den Angaben der Autoren geht nicht hervor, welche Hopfensorten verwendet wurden, ob nur eine Sorte oder ein Sortengemisch vorlag. In den eigenen Untersuchungen wurde vor allem sortenreines Ausgangsmaterial, daneben ein Gemisch aus verschiedenen Sorten untersucht und bei gleichem Extraktionsverfahren erhebliche Unterschiede in der Wirkung gefunden.
2. Die Behandlung des Ausgangsmaterials bis zur Extraktion: Hänsel und Wagener geben an, für einen Extrakt frische, etwa drei Wochen zuvor geerntete Droge verwendet zu haben, für einen anderen 10 Monate gelagertes Material. Nähere Angaben zur Behandlung des Pflanzenmaterials nach der Ernte und den Lagerungsbedingungen fehlen. In den eigenen Untersuchungen wurde Rohhopfen verwendet, der direkt nach der Ernte auf einer Darre bei Heißluft von 65 °C etwa fünf bis sechs Stunden getrocknet, bis der Feuchtigkeitsgehalt von 80 bis 85 % auf 12 % abgesunken war. Danach wurde der Hopfen kühl bei 0 bis 5 °C bis zur Extraktion bei der Firma NATECO₂ gelagert. Die Einhaltung solcher Bedingungen erscheint wichtig, da ein höherer Wassergehalt oder höhere Lagertemperaturen des Rohhophens dessen Lagerstabilität, d.h. sein Gehalt an alpha- und beta-Säuren erheblich

verringern (Forster and Beck, 1984), bei solch ungünstigen Lagerbedingungen oxidieren die Hopfenbittersäuren zu den sogenannten „Hartharzen“.

3. Die Art des Extraktionsmittels: Hänsel und Wagener verwendeten entweder sauerstofffreien Ethanol oder Methylisobutylketon. Die Konzentration des verwendeten Ethanols wird nicht genannt. In den eigenen Untersuchungen wurde das Rohmaterial entweder mit 90 %igem Ethanol oder überkritischem CO₂ extrahiert. Der Ethanol-Extrakt wurde eingengt und danach mit Wasser extrahiert. Der in Wasser lösliche Teil (Gerbstoffphase) und der unlösliche Rest (Bitterstoffphase) wurden getrennt getestet. Mit überkritischem CO₂ wurden aus dem Drogenmaterial sowohl Gesamtextrakte als auch einzelne Fraktionen hergestellt.

4. Die Zubereitung der Applikationslösungen: Hänsel und Wagener nahmen die eingengten Extrakte in reinem Olivenöl auf und applizierten sie den Tieren. In den eigenen Untersuchungen wurden die Extrakte mit verschiedenen Emulgatoren zum Teil zusätzlich mit Ölen oder Milch emulgiert. Die Verwendung von Öl als Lösemittel kann Resorptionsstörungen bei Labornagern verursachen und die Bioverfügbarkeit reduzieren (Winterhoff, persönliche Mitteilungen).

Als wichtige methodische Vorarbeit erwies sich das Herstellen von stabilen Emulsionen, die für die orale Zufuhr geeignet waren. Geprüft wurden Emulsionen mit Mischungen aus PEG 400, Tween 80, Lecithin, BSA, Wasser und Pflanzenöl oder Milch. Als besonders geeignet erwies sich eine Mischung aus Öl, Lecithin und Wasser. Diese Mischung ergab eine gute Emulsion mit allen geprüften Extrakten, eine Zunahme von erhöhte Toxizität, wie sie beim Verwenden von Tween 80 bei einzelnen Extrakten auftrat, wurde bei dieser Mischung weniger beobachtet. Eine verstärkte Absorption vieler Arzneistoffe durch Zusatz von Tween 80 wurde bereits von Gibaldi und Feldmann berichtet (Gibaldi and Feldmann, 1970). Neuere Untersuchungen zeigen, daß der Effekt vermutlich über eine Inhibierung der Rückresorption über das P-Glykoprotein im Darm (Nerurkar, Burton, and Borchardt, 1996) und/oder eine Hemmung des Cytochrom P450 (CYP3A) zustande kommt (Mountfield et al., 2000). Damit würden bei Verwenden dieses Emulgators für einzelne Substanzgruppen vergleichsweise höhere Spiegel erreicht als bei der geplanten Gabe eines Extraktes ohne einen solchen Zusatz. Um die Wirkung verschiedener Extrakte unter „realistischen“, d.h.

therapielevanten Bedingungen vergleichen zu können, wurde deshalb von der weiteren Verwendung von Tween 80 zur Herstellung von Prüfzubereitungen abgesehen.

Zusätzlich beeinflusste die Emulgiermethode die Wirkstärke. Anhand des Extraktes Öl 2 wurde gezeigt, daß Emulsionen, die mit dem UltraTurrax hergestellt wurden, die Narkosedauer stärker verlängerten, als solche mit dem Sonicator hergestellten. Da der Effekt sowohl bei Tween 80 als auch Lecithin meßbar war, wird vermutet, daß der Unterschied durch ein Verdampfen des Extraktes bei der Herstellung mit dem Sonicator hervorgerufen wird. Eine andere Erklärung könnte der Abbau von thermolabilen Wirksubstanzen im Extrakt sein, da beim Sonicator lokal hohe Temperaturen entstehen. Ein solcher Abbau durch Einsatz eines Sonicators wurde für Benzylalkohol von Urakami et al. beschrieben (Urakami et al., 2000). Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb auf die Herstellung von Emulsionen mit Hilfe des Sonicators verzichtet.

In den eigenen Untersuchungen erwiesen sich CO₂-Extrakte unterschiedlicher Sorten als sedierend. Nach oraler Gabe an Mäuse reduzierten sie die Spontanmotilität sehr deutlich und über einen Zeitraum bis zu 13 Stunden. Dabei erwiesen sich Dosierungen von 400 mg/kg KG der Sorten Hallertauer Perle, Magnum und Hersbrucker als wirksam, andere Sorten wie z.B. Spalter Select oder Northern Brewer waren wenig aktiv bis inaktiv.

Die in diesem Modell beobachtete sedierende Wirkung wurde auch in anderen Modellen überprüft. Bei dem Extrakt der Sorte Perle wurde eine gute Übereinstimmung zwischen der motilitätshemmenden Wirkung und der Verlängerung der Narkosedauer bei NMRI-Mäusen gefunden. Der Effekt scheint nicht stamm- oder speziesspezifisch zu sein, da sowohl BL/6-Mäuse als auch SD-Ratten auf die Gabe des Extraktes mit einer ausgeprägten und langandauernden Motilitätshemmung reagierten.

Der Befund, daß Ölextrakte die Schlafzeit signifikant verlängerten, ohne die Motilität zu verändern, muß keinen zentralen Effekt anzeigen, sondern könnte auch durch eine Hemmung des Ketaminabbaus, also durch eine pharmakokinetische Interaktion zustande kommen. Solche Effekte wurden für Hexobarbital beschrieben (Fujimori, 1965). Die Spezifität der beobachteten Narkoseverlängerung wurde überprüft im Modell der Ether induzierten Schlafzeit bei Mäusen, da dieses Narkotikum nicht metabolisiert, sondern pulmonal eliminiert wird. Da der Extrakt Ölrein wie auch der Lupulon-Extrakt die Etherschlafzeit verlängerten, dürfte die Verlängerung der Schlafzeit einen zentral sedierenden Effekt anzeigen.

Die sedierende Wirkung sollte einzelnen Inhaltsstoffen oder Inhaltsstoffgruppen zugeordnet werden. Eine Anreicherung an Hopfenöl bewirkte eine leichte Zunahme der sedierenden Wirkung bei der Sorte Perle. In der Folge wurden zwei Ölextrakte unterschiedlichen Reinheitsgrades, zwei Lupulon angereicherte sowie ein Humulon angereicherter Extrakt vergleichend untersucht. Die beiden Ölextrakte ließen bis zu einer Dosierung von 400 mg/kg KG die Motilität weitgehend unverändert, während sie zu einer signifikanten Verlängerung der Ketamin-induzierten Schlafzeit führten. Ein leichter, aber signifikanter Effekt wurde bereits bei 50 mg Öl₂/kg KG beobachtet, der Effekt war bereits bei 100 mg/kg KG maximal.

Der höher gereinigte Extrakt verlängerte ebenfalls die Ketamin-induzierte Schlafzeit.

Zwei Lupulon-Extrakte gaben unterschiedliche Ergebnisse in niedrigen Dosierungen, der eine war wirkungslos, der andere wirkte in einer Dosis von 100 mg/kg sogar stimulierend. In höheren Konzentrationen wurde dosisabhängig die Spontanmotilität der Mäuse reduziert. Derselbe Extrakt bewirkte eine signifikante Verlängerung der Narkosedauer. Der Effekt scheint vergleichsweise kurz zu dauern: eine Stunde nach Sondierung waren 200 mg/kg KG nötig für eine signifikante Verlängerung der Schlafzeit, während nach 30 Minuten 50 mg/kg ausreichten.

Der Humulon-Extrakt senkte in einer Dosis von 250 mg/kg KG die Motilität der Versuchstiere, die Narkose war signifikant verlängert ab einer Dosierung von 50 mg/kg KG 30 Minuten nach Sondierung.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß sedierende Effekte von Humulus-Zubereitungen auf verschiedene Inhaltsstoffgruppen zurückzuführen sind. Die getesteten Extrakte enthalten zwar als Hauptbestandteil eine Inhaltsstoffgruppe, daneben aber auch andere Bestandteile. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich eine Inhaltsstoffgruppe allein für die Wirkung verantwortlich machen läßt. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst drei verschieden zusammengesetzte Extrakte so dosiert, daß jeweils gleich viel Hopfenöl appliziert wurde, in einem weiteren Versuch wurde auf den Gehalt an Lupulon „standardisiert“. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß eine narkoseverlängernde Wirkung nicht nur von Hopfenöl, sondern auch von den Hopfenbittersäuren ausgeht: die narkoseverlängernde Wirkung von Perle'99 ölreich war wesentlich stärker, als es ihrem Ölgehalt entspricht. Eine weiter gereinigte „Ölfraktion“, der Extrakt Ölrein, der nur noch 0,7 Gew.% Bittersäuren enthält, verlängerte

in ähnlichem Umfang die Narkosedauer und bestätigt damit die sedierende Wirkung des Ölanteils.

In Untersuchungen zur sedativen Wirkung von Hopfen wurde postuliert, daß 2-Methyl-3-buten-2-ol für die sedierende Wirkung von *Humulus lupulus* verantwortlich ist (Hänsel, 1982). Dieser Stoff bewirkt ab einer Dosis von 300 mg/kg KG, i.p. verabreicht, eine signifikante Senkung der Motilität (Wohlfart, Hänsel, and Schmidt, 1983). Allerdings ist die Verbindung nur in sehr geringer Menge in Hopfenzubereitungen zu finden, bei frischem Hopfen nur in Spuren, nach zweijähriger Lagerung des Hopfens bei Raumtemperatur (d.h. nach nicht sachgemäßer Lagerung) wurden maximal Konzentrationen von 0,15 % nachgewiesen. Damit kann diese Verbindung nicht für die in den eigenen Versuchen beobachteten sedierenden Effekte verantwortlich sein. Selbst wenn nicht sachgemäß gelagerter Hopfen zur Herstellung von Hopfenpräparaten verwendet würde, wäre bei einem Gehalt in der Droge von 0,15 % und einer Wirkdosis von 300 mg/kg 2-Methyl-3-buten-2-ol eine Menge an Hopfen von 200 g erforderlich. Bei einem DEV von 4:1 und bei Annahme einer vollständigen Extraktion wären das immer noch 50 g eines Hopfenextraktes. Allerdings spekulierten Wohlfart et al. auch, daß Methylbutenol sowohl während der Lagerung von Hopfen als auch im menschlichen Körper aus den Hopfenbittersäuren gebildet werden könnte (Wohlfart et al., 1983).

Der Hypothese von Methylbutenol als **der** einzigen Wirksubstanz in Hopfen widersprechen auch die eigenen Ergebnisse. Bei oralen Zufuhr verschiedener Extrakte und Fraktionen wurden sedierende Effekte nach Dosierungen von 200-250 mg/kg beobachtet, also in einem Dosisbereich, in dem der geringe Anteil an Methylbutenol, der in der Probe vorhanden sein könnte, sicher ineffektiv ist.

Darüber hinaus wurden sedierende Effekte auch von Hopfenfraktionen ausgeübt, die Hopfenbittersäuren nur in Spuren enthielten. Für diese Zubereitungen kann eine Entstehung von Methylbutenol aus Bittersäuren *in vivo* als verantwortlich für sedierende Effekte ausgeschlossen werden.

Die Testung auf additive Effekte verschiedener, niedrig dosierter Inhaltsstoffgruppen im Modell der Ketaminnarkose ergab eine verstärkte Wirkung der Kombination aus Humulon und Lupulon, während die Kombination aus Öl 2 und Humulon keine verstärkte Wirkung zeigte, Öl 2 und Lupulon in Kombination eher antagonistisch wirkten. Im gleichen Modell

hatten verschiedene Mischungen aus dem Lupulon-Extrakt und reinem Hopfenöl ebenfalls keine additiven Wirkungen.

Am Modell der Ketaminnarkose wurde auch untersucht, über welchen Mechanismus die Effekte von Humulus-Extrakten vermittelt sein könnten. Untersucht wurden zunächst das dopaminerge-System, da Dopaminerge-Agonisten dafür bekannt sind, daß sie eine Senkung der Körpertemperatur bewirken (Zarrindast and Tabatabai, 1992) und dosisabhängig zu einer Senkung der Motilität führen (Bradbury et al., 1984). Beide Effekte wurden auch bei den meisten der untersuchten Hopfenextrakte gefunden, deshalb wurde versucht, die Verlängerung der Ketaminnarkosedauer durch Gabe eines Dopamin-Rezeptorantagonisten aufzuheben. Weder Injektionen des relativ spezifischen D_2/D_1 -Antagonisten Haloperidol noch des D_2/D_3 -Antagonist Sulpirid führten in Kombination mit dem Hopfenextrakt zu Veränderung der Narkosedauer gegenüber dem Extrakt alleine. Somit scheint der Effekt der Hopfenextrakte nicht dopaminerg vermittelt zu sein. Gegen einen dopaminergen Wirkmechanismus spricht auch das Fehlen von Stereotypen nach Gabe von Hopfenextrakten, die für Dopamin-Agonisten typisch sind.

In demselben Testmodell wurde auf eine Interaktion mit Benzodiazepinrezeptoren geprüft, die von Blattler und Schoch für einen nicht näher spezifizierten Hopfenextrakt beschrieben wurde. So sollen Wirkstoffe aus *Humulus lupulus* *in vitro* die Bindung des spezifischen Antagonisten Flumazenil an den Diazepam-Rezeptor hemmen. *In vivo* dagegen konnte keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Blattler and Schoch, 1994). In den eigenen Untersuchungen konnte die Narkose-verlängernde Wirkung des untersuchten Hopfenextraktes durch Flumazenil nicht antagonisiert werden. Der Effekt war mit und ohne Flumazenil gleichstark ausgeprägt. Eine Vermittlung der Humulus-Zubereitungen über den Benzodiazepinrezeptor scheint deshalb unwahrscheinlich. Gegen eine über Benzodiazepin Rezeptoren vermittelte Wirkung spricht auch die fehlende anxiolytische Wirkung von Hopfenextrakten, die für Benzodiazepine typisch ist. Bei vergleichenden Untersuchungen mit Diazepam konnte bei keinem der untersuchten Hopfenextrakte eine anxiolytische Aktivität nachgewiesen werden.

Die estrogene Aktivität von *Humulus lupulus* ist in der Vergangenheit mehrfach untersucht worden. Aufmerksam auf eine mögliche estrogene Wirkung wurde man durch Erzählungen über Hopfenpflückerinnen, die nach Beginn der Ernte über Menstruationsbeschwerden klagten (Verzele, 1986). Einige Autoren fanden keine estrogene Aktivität der untersuchten

Zubereitungen (Feneselau and Talalay, 1973), andere Untersuchungen belegen die estrogenen Wirkung von Hopfeninhaltsstoffen (Liu et al., 2001; Milligan et al., 2002; Zierau et al., 2002). Zur Zeit befinden sich Hopfen-basierte Nahrungsergänzungsmittel mit der Anwendung „Vergrößerung der weiblichen Brust“ auf dem Markt, deren Wirksamkeit jedoch wissenschaftlich nicht belegt ist. Um die Sicherheit eines möglichen, neues Schlafmittels zu gewährleisten, wurde deshalb in den eigenen Untersuchungen auf estrogenen Aktivität eines sortenreinen CO₂-Extraktes, einer Öl-Fraktion, einer Lupulon-Fraktion sowie einer Mischung Öl- und Lupulon-Fraktion überprüft. Als Modell diente die Uterusgewichtsentwicklung ovariectomierter Ratten. Nach 15- bzw. 37-tägiger oraler Applikation konnte bei keiner der untersuchten Zubereitungen eine estrogenen Wirkung an Hand einer Zunahme des Uterusgewichtes festgestellt werden. Damit entsprechen die Ergebnisse den Untersuchungen von Feneselau und Talalay, die auf eine Zunahme des Uterusgewichtes juveniler Mäuse prüften.

Dagegen berichteten Milligan et al. über ausgeprägte Estrogeneffekte eines Hopfeninhaltsstoffes, des 8-Prenylnaringenin. Sie beschrieben eine Bindung an den α und β Rezeptor in etwa gleichem Ausmaß, eine Vermehrung der Gefäßpermeabilität des Uterus und eine Zunahme der mitotischen Aktivität des Vaginalepithels. Die Wirkstärke der Verbindung entsprach etwa 1/1000 des Standardestrogens 17 β -Estradiol und erwies sich damit als vergleichsweise potentes Phytoestrogen.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die negativen Ergebnisse in den eigenen Untersuchungen könnte sein, daß das Flavanon 8-Prenylnaringenin, das für die estrogenen Wirkung verantwortlich gemacht wird (Milligan et al., 2002; Zierau et al., 2002), bei der Extraktion mit CO₂ im Rohmaterial zurückbleibt und im Extrakt nur in geringen Mengen vorhanden ist (Rong et al., 2000). Die von uns verwendeten Extrakte wurden unter Bedingungen hergestellt, wie sie auch Rong et al. verwendeten, die unter diesen Bedingungen Werte von weniger als 10 mg 8-Prenylnaringenin/kg Extrakt fanden (pers. Mitteilung Dr. Adrian Forster, Firma NATECO₂). Damit wird klar, daß die durch diesen Extrakt aufgenommene Menge an 8-Prenylnaringenin zu niedrig sein dürfte, um biologische Effekte zu verursachen. Die Autoren fanden in vivo eine estrogenen Wirkung nach Gabe von 15,9 mg 8-Prenylnaringenin/kg KG/d. Um eine solche Menge mit einem Extrakt zu applizieren, müßte man mindestens 1590 g Extrakt/kg KG verabreichen.

Die Angaben von Hänsel et al. zu DL 50 Werten von 3500 mg/kg für einen ethanolischen Hopfenextrakt sowie eigene Beobachtungen zu akuter Letalität waren Anlaß, die Toxizität solcher Extrakte nach akuter wie auch nach wiederholter Gabe zu prüfen. Die akute Toxizität der untersuchten Extrakte unterschied sich je nach Art der Extraktion, Sorte, Lösungsmittel und Spezies. So wurde der in Wasser lösliche Teil eines Ethanol-Auszuges (Gerbstoffphase) gut vertragen, der unlösliche Rest (Bitterstoffphase) dagegen schlecht. Nach einer Gabe von 400 mg/kg KG emulgiert in Milch starben 6 von 24 Mäusen. Eine unspezifische Aufkonzentration bedingt durch die Herstellungsart kann nicht die Ursache sein, da die Gerbstoffphase ein höheres Drogen-Extrakt-Verhältnis als die Bitterstoffphase hat (9,1:1 gegenüber 3,8:1). Die Inhaltsstoffe, die für die toxische Wirkung verantwortlich sind, scheinen demnach lipophil und in Wasser nicht löslich zu sein. Deren Resorption läßt sich außerdem durch das Lösungsmittel beeinflussen, da die Bitterstoffphase als Emulsion appliziert deutlich toxischer war als suspendiert in Wasser. Welche Inhaltsstoffe für die von Hänsel et al. beobachteten toxischen Effekte verantwortlich sind, wurde nicht untersucht (Hänsel and Wagener, 1967). Verantwortlich für die toxischen Effekte könnte der Gehalt an Bittersäuren (Humulon/Lupulon) sein, die in der Bitterstoffphase zu 67 % angereichert sind, in der Gerbstoffphase dagegen nicht vorkommen. In der Literatur werden sie für die antibakterielle Wirkung von *Humulus lupulus* verantwortlich gemacht (Langezaal, Chandra, and Scheffer, 1992; Larson et al., 1996; Simpson and Smith, 1992). Außerdem besitzen sie einen extrem bitteren Eigengeschmack.

Nach Gabe von reinem Hopfenöl dagegen und einer Lupulon-reichen Fraktion traten bis zu Dosierungen von 500 mg/kg KG keine toxischen Effekte auf. Chin und Anderson fanden für Lupulon mit einer LD₅₀ von 1500 mg/kg KG bei oraler Zufuhr an Mäusen deutlich höhere Werte als Hänsel und Wagner mit 525 mg/kg bei Mäusen und 100 mg/kg bei Ratten nach oraler Zufuhr. Die in den eigenen Untersuchungen verwendete Lupulon-Fraktion war bis zu einer Dosierung von 500 mg/kg gut verträglich, allerdings bestand sie nur zu 66.5 % aus Lupulon. Ob die übrigen Bestandteile, hauptsächlich Weichharze, die Verträglichkeit des Extraktes beeinflussen, konnte nicht geklärt werden. Darüberhinaus ist zu bedenken, dass sich der Lupulon Anteil in Co-, n-, und Ad-Lupulon aufteilen lässt. Bei beiden oben angeführten Untersuchungen wird keine Unterscheidung in Co-, n-, und Ad-Lupulon vorgenommen, so daß sich nicht entscheiden läßt, ob Unterschiede in der Toxizität auf solche Unterschiede in der Lupulon-Zusammensetzung zurückzuführen sein könnten. Bei

der Untersuchung zweier Extrakte mit unterschiedlichem Verhältnis von Co- zu n- + Ad-Lupulon deutete sich eine stärkere Wirkung des Extraktes mit höherem n- + Ad-Lupulon Anteil an, Unterschiede in der Toxizität waren nicht eindeutig festzustellen.

Hänsel und Wagener beschrieben weiterhin, daß sich die Tiere bis kurz vor dem Tod unauffällig verhielten und keine Zeichen von Sedierung zeigten. In den eigenen Untersuchungen hingegen waren die Tiere deutlich sediert. Chin und Anderson beschrieben den Zustand der Tiere nach Gabe von 1500 mg/kg KG Lupulon als „depressed“. Unterschiedliche Lösungsmethoden mit dem ethanolschen Extrakt zeigten, daß die sedierenden Eigenschaften nicht an die toxischen gekoppelt sind. Extrakt-Suspensionen besaßen gegenüber Extrakt-Emulsionen fast kein toxisches Potential, senkten aber trotzdem die Motilität. Hänsel und Wagener applizierten ihre Extrakte digeriert in Olivenöl, Chin und Anderson dagegen suspendierten das Lupulon in Gummi arabicum. Die Ergebnisse deuten ebenfalls auf einen Einfluß des Lösemittels hin, sind aber durch die fehlenden Daten zur exakten Spezifikation des untersuchten Lupulons nicht eindeutig belegbar.

An Beagle Hunden wurden prä-isomerisierte alpha-Säuren auf akute Toxizität getestet. Diese Verbindungen entstehen während des Brauvorganges aus den genuinen alpha-Säuren und weisen einen höheren Bitterwert auf. Auf dem Markt sind auch Extrakte mit prä-isomerisierten alpha-Säuren erhältlich. Bis zu einer Dosis von 50 mg/kg wurden keinerlei toxische Symptome beobachtet, ab 100 mg/kg (in einem weiteren Versuch ab 150 mg/kg) wurden Erbrechen und Diarrhoe beobachtet (Chappel, Smith, and Chagnon, 1998). Die Futteraufnahme und die Körpergewichtszunahme waren geringfügig beeinträchtigt.

In den eigenen Untersuchungen wurden unterschiedliche Extrakte auf die Beeinflussung von Körpergewichtszunahme und Organgewichte nach wiederholter Gabe geprüft. Dabei ergaben sich Unterschiede in der Toxizität, abhängig von der Dosis, der Hopfensorte, der Extraktionsart, der Tierspezies und dem Geschlecht. Ein CO₂-Extrakt der Sorte Magnum (65 mg/kg KG) bewirkte nach 14-tägiger Gabe bei männlichen Ratten eine signifikante Senkung des Körper-, Leber-, Nieren- und Samenblasengewichtes. In einer höheren Dosierung (200 mg/kg KG) starben mehrere Tiere. Ein unter gleichen Bedingungen hergestellter CO₂-Extrakt der Sorte Perle (200 mg/kg KG) wurde dagegen gut vertragen, nach 12-tägiger Behandlung starb kein Tier oder wies signifikante Organgewichtsveränderungen auf. Welche Inhaltsstoffe für die Toxizität des Extraktes der Sorte Magnum verantwortlich sind, ist unklar. Den größten Unterschied in der

Zusammensetzung der Extrakte stellt der etwa 10 % höhere Humulon Gehalt (46,3 vs 36,0) im Extrakt der Sorte Magnum dar. Der Extrakt der Sorte Perle enthält dagegen jeweils 3 % mehr Lupulon (30,2 vs 27,2) und Hopfenöl (10,0 vs. 7,0). Die Toxizität könnte auch vom Verhältnis dieser drei Inhaltsstoffgruppen zueinander abhängen.

Vergleichende Untersuchungen mit einer ölreichen- und einer ölarmer Fraktion der Sorte Perle ergaben ausgeprägte Unterschiede in der Toxizität: Die ölarmer Fraktion (200 mg/kg KG) erwies sich als toxisch und verursachte nach 17-tägiger Behandlung bei männlichen Ratten signifikante Organgewichtsveränderungen, 3 von 8 Tieren starben. Diese Fraktion enthält im Vergleich zum untoxischen Gesamtextrakt jedoch nur wenig mehr Humulon (39,2 vs 36,0) und Lupulon (31,8 vs 30,2), der Anteil an Hopfenöl ist auf etwa die Hälfte gesenkt (5,5 vs 10,0). Die ölreiche Fraktion dagegen, die jeweils etwa 30 % weniger Humulon und Lupulon sowie fünf mal soviel Hopfenöl wie der Gesamtextrakt enthält, war genauso gut verträglich wie der Gesamtextrakt. Auch eine spezifische Anreicherung nicht analysierter Inhaltsstoffe in der ölarmer Fraktion scheint unwahrscheinlich, da die ölarmer Fraktion fast 85 % des Gesamtextraktes darstellt. Gegen die Annahme einer nicht lipophilen Verbindung als verantwortlich für die toxischen Effekte spricht auch der Befund, daß bei Untersuchungen der Sorte Magnum sowohl der Gesamtextrakt als auch die ölreiche Fraktion toxisch waren, wenn letztere auch nicht so ausgeprägt.

Bei weiteren Untersuchungen des Extraktes HHM'99 wurden geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Toxizität gefunden. Im Gegensatz zu Männchen wurde der HHM'99 von weiblichen, ovariectomierten Ratten (100 mg/kg KG) nach 15-tägiger Behandlung gut vertragen, die Leber- und Nebennierengewichte waren jedoch signifikant erhöht. Die Ergebnisse könnten durch einen unterschiedlichen Metabolismus von männlichen und weiblichen Tieren zustande gekommen sein. Solche Unterschiede sind in der Literatur z.B. für die Regulation des Cytochrom P-450 Systems durch DDT beschrieben. Sierra-Santoyo et al. fanden nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG DDT einen signifikanten, 18-fachen Anstieg des CYP3A2 bei weiblichen Ratten, bei Männchen lagen keine entsprechenden Veränderungen vor (< 3-fach, n.s.) (Sierra-Santoyo et al., 2000).

Ein inhibitorischer Effekt auf das P-450 System ist für die Flavonoide Xanthohumol, Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin aus *Humulus lupulus* beschrieben worden (Henderson et al., 2000), diese Stoffe kommen im untersuchten Extrakt jedoch nur in Spuren vor, die pharmakologisch nicht von Bedeutung sein dürften. Theoretisch käme auch

eine Enzyminduktion durch Co-Lupulon in Frage, für das eine Induktion des hepatischen Cytochrom P-450 3A bei der männlichen Maus beschrieben worden ist (Mannering, Shoeman, and Deloria, 1992; Mannering, Shoeman, and Shoeman, 1994). Die Mäuse erhielten mit der Diät 0,24 % Co-Lupulon. Geht man von einer maximalen Nahrungsaufnahme von 3 g Futter pro Tag und einem Körpergewicht von 30 g aus, wäre eine Dosis von 240 mg/kg KG Co-Lupulon aufgenommen worden. Bei einer Dosis von 200 mg/kg KG des Extraktes HHM'99 werden jedoch nur 25 mg/kg KG Co-Lupulon appliziert. Ob diese Dosis noch einen pharmakologischen Effekt ausübt, ist unklar. Für die toxische Wirkung des Extraktes ist diese Verbindung wahrscheinlich nicht verantwortlich, da Mannering et al. keine toxischen Effekte beobachteten, obwohl die Tiere eine fast 10-fach höhere Dosis über einen Zeitraum von 7 Tagen erhielten. Auch in den eigenen Untersuchungen erwies sich Lupulon als wenig toxisch an weiblichen Mäusen: Bei vergleichender Prüfung einer Lupulon-, einer Humulon- und einer Hopfenöl-angereicherten Fraktion sowie des Extraktes HHM'99 (jeweils 200 mg/kg KG) war die Lupulon-Fraktion am besten verträglich. Von jeweils 10 Tieren pro Gruppe starben in der HHM'99 Gruppe 6 Tiere, in der Humulon- bzw. Hopfenöl-Fraktion Gruppe jeweils 3 Tiere und in der Lupulon-Fraktion Gruppe 1 Tier.

Andere Autoren fanden bei Untersuchungen mit Lupulon eine geringe Toxizität. Chin und Anderson mischten dem Futter von Mäusen 1, 2 oder 4 % Lupulon bei und untersuchten die Überlebensrate und Körpergewichtsentwicklung unter 40-tägiger Behandlung (Chin and Anderson, 1950). Sie stellten einen dosisabhängigen Effekt fest: Während bei einer Dosis von 4 % Lupulon die Hälfte der Tiere innerhalb der ersten 20 Tage starb, überlebten 90 % der Tiere eine Dosis von 1 % über 40 Tage. Umgerechnet in mg/kg KG sind dabei selbst in der geringsten Dosierung vielfach höhere Dosen an Lupulon verabreicht worden als in den eigenen Untersuchungen. Chin und Anderson geben die tägliche Nahrungsaufnahme mit 5 g Futter pro Tier an bei einem Körpergewicht von etwa 27 g. Daraus ergibt sich eine Dosis von 7407 mg/kg KG Lupulon in der höchsten Dosierung und 1852 mg/kg KG Lupulon in der niedrigsten Dosierung. In den eigenen Untersuchungen wurden bei einer Dosis von 200 mg/kg Lupulon-Fraktion (66,5 % Lupulon) nur 133 mg/kg KG Lupulon appliziert.

Speziesspezifische Unterschiede ergaben sich aber auch bei der Lupulon-Fraktion. Im Gegensatz zu weiblichen Mäusen vertrugen weibliche, ovariectomierte Ratten die Lupulon-Fraktion (200 mg/kg KG) schlecht. Nach 37-tägiger Behandlung starben 4 von 10 Tieren,

die übrigen wiesen ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht auf. Das Thymusgewicht war ebenfalls signifikant erniedrigt, das Lebergewicht dagegen signifikant erhöht. Chin und Anderson fanden bei Ratten dagegen keine toxischen Effekte von reinem Lupulon (150 mg/kg KG) nach 12 tägiger Behandlung (Chin and Anderson, 1950). Bei der doppelten bzw. dreifachen Dosis starb ein Tier. Leider ist von den Autoren nicht angegeben, ob an Weibchen oder Männchen getestet wurde, so daß nicht geklärt werden kann, ob die geringe Toxizität in dieser Untersuchung einen geschlechtsspezifischen Effekt darstellt.

Die Untersuchung einer Hopfenöl-Fraktion (200 mg/kg KG) ergab ein konträres Ergebnis in Abhängigkeit von der verwendeten Tierart, da sie von Mäusen schlecht vertragen wurde, 3 von 10 Tieren starben, von Ratten dagegen gut. Daher scheint die Interpretation und Übertragbarkeit dieser toxikologischen Daten von Nagern auf den Menschen fraglich.

Untersuchungen an Beagle Hunden über 13 Wochen mit prä-isomerisierten alpha-Säuren zeigten eine niedrige Toxizität. Die Tiere erhielten oral eine Dosis von 50 bzw. 100 mg/kg KG pro Tag, weicher Stuhl und gelegentlich Erbrechen wurden als einzige klinische Befunde beobachtet, aber weder eine Beeinträchtigung der Körpergewichtszunahme noch des Futter- oder Wasserverbrauchs traten auf.

Eine geringe Toxizität von Lupulon berichteten Chin und Anderson bei Untersuchungen an Kaninchen und Affen. In subakuten Versuchen über 12 bis 14 Tagen wurden bei den Kaninchen 300 mg/kg und bei Affen 200 mg/kg/d appliziert und ohne klinische Befunde vertragen. Als wesentlich empfindlicher erwiesen sich Meerschweinchen, bei denen eine DL50 von 130 mg/kg ermittelt wurde, und die 14 Tage lang täglich mit 30 mg/kg Lupulon behandelt wurden. Bei dieser Dosis zeigten Meerschweinchen keine toxischen Symptome.

In der Literatur sind Untersuchungen mit Lupulon am Menschen beschrieben (Chin and Anderson, 1950). Dabei erhielten 10 Personen 5 g Lupulon pro Tag über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen. Ein Mann brach die Behandlung wegen epigastrischer Beschwerden ab, eine Frau wegen Übelkeit und Erbrechen. Als Nebenwirkung wurden bei den übrigen Probanden nur in der Initialphase Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall beschrieben.

Sedierende Eigenschaften von Hopfen und Hopfenzubereitungen werden in Übersichtsartikeln und Lehrbüchern angezweifelt. So schreibt z.B. R. Hänsel in seinem Buch „Phytopharmaka“, daß es für die berichtete müdigkeits- und schlafbringende Wirkung von Hopfenharz auf Hopfenpflückerinnen keine Anhaltspunkte gäbe, zumal keine Hinweise auf

zentrale Wirkungen nach oraler Applikation vorhanden seien. Er diskutiert eine mögliche sedierende Wirkung ätherischen Hopfenöls bei den Hopfenpflückerinnen nach Inhalation. Allerdings kommt in den meisten Hopfenextrakten und Fertigarzneimitteln kein Hopfenöl vor und kann somit für eine schlaffördernde Wirkung von solchen Hopfenpräparaten kaum verantwortlich sein. Hänsel hält eine sedierende Wirkung von Hopfen-Zubereitungen überhaupt für unwahrscheinlich und führt zur beschriebenen Sedierung bei Hopfenpflückerinnen aus: „Viel wahrscheinlicher ist es, daß eine Art von Konditionierung vorlag, eine Verknüpfung von Müdigkeit, bedingt durch die ungewohnte Tätigkeit des Hopfenzupfens...“.

„Lupulon und ethanolischer Hopfenextrakt erwiesen sich in allen gängigen Versuchsanordnungen zur tierexperimentellen Prüfung auf ZNS-Sedation als unwirksam“ (Hänsel, 1991). Diese Auffassung von einem Fehlen der Wirksamkeit von Hopfenzubereitungen wird auch in einem neueren Werk vertreten (Schulz, 2001). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben allerdings ausgeprägte sedative Wirkungen sowohl für einen ethanolischen als auch für verschiedene, mit überkritischem CO₂ hergestellte Hopfenextrakte nach oraler Gabe. Die Meinung von einer Unwirksamkeit von Hopfenzubereitungen muß zum Teil revidiert werden. Die sogenannten „Heißwasserextrakte“, die auch in einigen Hopfenpräparaten verwendet werden, waren allerdings auch in den eigenen Untersuchungen unwirksam. Hersteller von Hopfenpräparaten sollten deshalb keine „Heißwasserextrakte“ verwenden. Für zukünftige Präparate sollte über die Verwendung von CO₂-Hopfenextrakten nachgedacht werden, die in der Brauereiindustrie bereits Standard sind. Sie bieten gegenüber der Roh-Droge und ethanolischen Extrakten eine bessere Stabilität und können so eine gute pharmazeutische Qualität gewährleisten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zubereitungen aus den getrockneten Fruchtständen von *Humulus lupulus* L. werden angewendet bei Unruhe, Angstzuständen und Schlafstörungen. Meistens werden Kombinationspräparate mit anderen Sedativa eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im Tierexperiment verschiedene Hopfen-Extrakte auf ihre sedierenden Effekte untersucht werden.

Zur Bestimmung der Motilität als Indiz sedierender Effekte wurde ein computergestütztes Lichtschrankensystem entwickelt, das beim Vergleich zu den Ergebnisse in klassischen Modellen eine gute Übereinstimmung zeigte. Es erlaubte, den Wirkeintritt und die Wirkdauer der Prüfsubstanzen zu erkennen.

Extrakte aus verschiedenen Hopfensorten wurden vergleichend auf eine Beeinträchtigung der Spontanmotilität getestet, als wirksam erwiesen sich Extrakte der Sorten Perle, Magnum und Hersbrucker Spät, während die Sorten Spalter Select und Northern Brewer keinen sehr ausgeprägten Effekt ausübten. Die unterschiedlichen Wirkstärken konnten aber nicht dem Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffgruppen zugeordnet werden, da es sich bei den Sorten Magnum und Northern Brewer um Bitterstoffsorten handelt, bei den übrigen um Aromasorten mit einem höheren Gehalt an Hopfenöl und einem geringeren Anteil an alpha-Säuren.

Hinweise auf wirksame Inhaltsstoffe sollten aus einer vergleichenden Testung von drei verschiedenen Extrakten, hergestellt aus demselben Drogenmaterial, gewonnen werden. Ein ethanolischer Extrakt, aus dem die hydrophilen Komponenten entfernt worden waren, bewirkte in einer Dosis von 250 mg/kg KG oral eine schnell einsetzende und kurz andauernde Senkung der Motilität, die dem Effekt einer Dosis von 2 mg/kg KG Diazepam entsprach. Die entsprechende hydrophile Fraktion, der sog. „Heißwasserextrakt“ zeigte in der gleichen Dosierung keine Wirkung. Der entsprechende CO₂-Extrakt bewirkte erst in einer Dosierung von 400 mg/kg KG einen mäßigen, nach 5 Stunden einsetzenden Effekt.

Damit können hydrophile Inhaltsstoffe nicht für die sedierende Wirkung verantwortlich sein.

Die Untersuchung Lupulon-reicher Fraktionen sollte Hinweise auf eine Wirkung der Bittersäuren geben. In Dosierungen zwischen 250 und 500 mg/kg KG bewirkten sie eine dosisabhängige Senkung der Motilität, die einer Dosis zwischen 2 und 5 mg/kg KG Diazepam entsprachen. Bei der höchsten Dosierung hielt der Effekt etwa 1 Stunde an, in niedrigen Dosierungen kürzer. Der Effekt einer Humulon-reichen Fraktion war wesentlich ausgeprägter, sie bewirkte in einer Dosierung von 250 mg/kg KG eine langanhaltende Senkung der Motilität über 9 Stunden. Reines Hopfenöl zeigte in Dosierungen zwischen 100 und 500 mg/kg KG keine Effekte. Muskelrelaxierende Effekte (Rotarod Test) wurden in Extrakt-Dosierungen bis zu 200 mg/kg KG nicht gefunden.

Auf sedierende Effekte wurde zusätzlich im Modell der Verlängerung einer Narkotika induzierten Schlafzeit geprüft. Lupulon- und Humulon-Fraktionen bewirkten ab einer Dosis von 50 mg/kg KG eine Verlängerung der Ketamin-induzierten Schlafzeit. Eine metabolische Interaktion mit dem Ketaminabbau wurde ausgeschlossen, da auch eine Ether-induzierte Narkose verlängert wurde. In diesem Modell wirkte auch Hopfenöl in Dosierungen ab 50 mg/kg sedierend. Diese Ergebnisse zeigen, daß der sedierende Effekt von Hopfenzubereitungen durch verschiedene Inhaltsstoffgruppen zustande kommt.

Ein methodisches Problem ergab sich bei der Zubereitung von Applikationslösungen aus den zähen CO₂-Extrakten. Das Ausmaß der biologischen Wirkung war abhängig von der Wahl des Emulgators sowie des Homogenisierungsprozesses. Emulsionen mit Tween 80 und Ultraturrax ergaben zwar die ausgeprägtesten Ergebnisse, bei einzelnen Extrakten erwiesen sich solche Emulsionen aber als toxischer. Deshalb wurde bevorzugt eine Emulsion aus Lecithin/Pflanzenöl/Wasser verwendet.

Um Hinweise auf den Wirkmodus zu erhalten, wurde versucht, den Effekt eines Hopfen-Extraktes auf die Narkosedauer mit Rezeptor-Antagonisten zu beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, daß die narkoseverlängernde Wirkung der Hopfenextrakte weder über Dopamin- noch Bezodiazepin-Rezeptoren vermittelt wird.

Die subakute Gabe zeigte toxische Effekte einzelner Extrakte, diese waren aber spezie- und geschlechtsspezifisch. Die bereits in der Literatur beschriebene wesentlich höhere Toxizität von Hopfenextrakten bei kleinen Nagern im Vergleich zu Hunden und Affen läßt eine Übertragbarkeit auf den Menschen nicht ohne weiteres zu.

Im Gegensatz zu Lehrbuchmeinungen, daß Hopfenzubereitungen keine nachweisbare sedative Wirkung zukommt, ergaben die eigenen Untersuchungen eine reproduzierbare sedierende Wirkung für einen ethanolschen Hopfenextrakt sowie für mehrere, mit überkritischem CO₂ hergestellte Extrakte. Dabei scheinen Humulon, Lupulon und Hopfenöl zum Gesamteffekt beizutragen. Als unwirksam erwies sich ein sogenannter „Heißwasserextrakt“, der auch in einigen Pharmaka eingesetzt wird. Die verallgemeinernde Einschätzung von einer Unwirksamkeit von Hopfenzubereitungen müßte demnach revidiert werden. Für zukünftige Präparate bietet die Verwendung von CO₂ Extrakten aus Hopfen, wie sie bereits in der Bierbrauerei Standard ist, infolge ihrer guten Stabilität erhebliche Vorteile.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Auerbach, R. H., D. Kenan, and G. Davidson.** 2000. Characterization of varietal differences in essential oil components of hops (*Humulus lupulus*) by SFC-FTIR spectroscopy. *J.AOAC Int.* **83**:621-626.
2. **Benitez, J. L., A. Forster, D. De Keukeleire, M. Moir, F. R. Sharpe, L. C. Verhagen, and K. T. Westwood.** 2002. *EBC-Manual of good practice: Hops and Hop Products.* Hans Carl-Verlag, Nürnberg.
3. **Bertsch, K. u. F.** 1947. *Geschichte unserer Kulturpflanzen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
4. **Blattler, W. and P. Schoch.** 1994. Potential psychotropic activity of phlebotropic drugs: Weak interactions with brain benzodiazepine receptors. *Phlebology* **9**:32-36.
5. **Bradbury, A. J., J. G. Cannon, B. Costall, and R. J. Naylor.** 1984. A comparison of dopamine agonist action to inhibit locomotor activity and to induce stereotyped behaviour in the mouse. *European Journal of Pharmacology* **105**:33-47.
6. **Bravo, L., J. Cabo, A. Fraile, J. Jimenez, and A. Villar.** 1974. Estudio farmacodinamico del lupulo (*Humulus lupulus* L.). accion tranquilizante [Pharmacodynamic study of the lupulus' (*Humulus lupulus* L.) tranquilizing action]. *Boll.Chim.Farm.* **113** :310-315.
7. **Burdette, J. E., J. Liu, L. Chadwick, Y. K. Sun, [a], R. van Breeman, J. M. Pezzuto, N. R. Farnsworth, and J. L. Bolton.** 2001. Evaluation of *Humulus lupulus* extracts for estrogenic properties. *Abstracts of Papers American Chemical Society* **222**.
8. **Caujolle, F., H. C. Pham, P. Duch-Kan, and L. Bravo-Diaz.** 1969. [Spasmolytic action of hop (*Humulus lupulus*, Cannabinacees)]. *Agressologie* **10**:405-410.
9. **Cernelc, D.** 1966. Our results of inhalation test with hop-allergen in asthmatic children. *Allerg.Asthma (Leipz.)* **12**:272-278.
10. **Chappel, C. I., S. Y. Smith, and M. Chagnon.** 1998. Subchronic Toxicity Study of Tetrahydroisohumulone and Hexahydroisohumulone in the Beagle Dog. *Food Chem.Toxicol.* **36**:915-922.
11. **Chin, Y. C. and H. H. Anderson .** 1950. Toxicology and Pharmacology of Lupulon. *Arch.Intern.Pharmacodyn.* **82**:1-15.

12. **CMA**, Bonn. Hopfensorten. www.1516-online.com/lex/lexdat/h0006.php . 2002.
13. **Coldham, N. G. and M. J. Sauer** . 2001. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem.Toxicol.* **39**:1211-1224.
14. **Czygan, F.-C.** 1992. Hopfen (*Humulus lupulus* L.): Morphologie und Systematik, Kultur- und Kunstgeschichte. *Zeitschrift für Phytotherapie* **13**:141-150.
15. **De Keukeleire, D., L. De Cooman, H. Rong, A. Heyerick, J. Kalita, and S. R. Milligan.** 1999. Functional properties of hop polyphenols. *Basic Life Sci.* **66**:739-760.
16. **Duden.** Das große Fremdwörterbuch. 2000. Mannheim.
17. **Eri, S., B. K. Khoo, J. Lech, and T. G. Hartman.** 2000. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **48**:1140-1149
18. **Estrada, J. L., F. Gozalo, C. Cecchini, and E. Casquete.** 2002. Contact urticaria from hops (*Humulus lupulus*) in a patient with previous urticaria-angioedema from peanut, chestnut and banana. *Contact Dermatitis* **46**:127.
19. **Etteldorf, N., N. Etteldorf, and H. Becker.** 1999. New chalcones from hop *Humulus lupulus* L. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **54**.
20. **Feneselau, C. and P. Talalay.** 1973. Is oestrogenic activity present in hops? *Fd Cosmet Toxicol* **11**:597-603.
21. **Fintelmann, V.** 1992. Klinisch-ärztliche Bedeutung des Hopfens. *Zeitschrift für Phytotherapie* **13**:165-168.
22. **Forster, A. and B. Beck.** 1984. Hopfen und Hopfenpellets, Über den Einfluß des Wassergehaltes auf deren Lagerverhalten. *Brauwelt* **36**:1524-1527.
23. **Forster, A., B. Beck, and Schmidt R.** 1987. Veränderungen von Bitter- und Aromastoffen verschiedenartiger Hopfenextrakte während ihrer Lagerung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **40**:4-8.
24. **Forster, A.** 1992. Großtechnische Verfahren zur Extraktion von Hopfen. *Zeitschrift für Phytotherapie* **13**:162-164.
25. **Forster, A.** 1993. Zur Charakterisierung und Gruppierung von Hopfensorten.

- Brauwelt **40**:2036-2057.
26. **Forster, A.** 1998. Der Verbleib von Xanthohumol aus Hopfen während der Bierbereitung. Brauwelt **37**:1677-1679.
 27. **Forster, A.** 2000. Hopfen - mehr als nur ein alpha-Säureträger. Mitteilungen Österreichisches Getränkeinstitut **Nr. 11/12**:116-120.
 28. **Forster, A.** 2000. Wie genau kann man eine Hopfenpartie analysieren? Hopfen-Rundschau **11**:240-242.
 29. **Forster, A.** 2001. What is about antioxidative characteristics of hops? 28.EBC-Congress Budapest.
 30. **Fujimori, H.** 1965. Potentiation of Barbitol Hypnosis as an Evaluation Method for Central Nervous System Depressants. Psychopharmacologia **7**:374-378.
 31. **Fukao, T., H. Sawada, and Y. Ohta.** 2000. Combined effect of hop resins and sodium hexametaphosphate against certain strains of Escherichia coli. J.Food Prot. **63**:735-740.
 32. **Fussel, A., A. Wolf, and A. Brattstrom.** 2000. Effect of a fixed valerian-Hop extract combination (Ze 91019) on sleep polygraphy in patients with non-organic insomnia: a pilot study. Eur.J.Med.Res. **5**:385-390.
 33. **Gardea-Torresdey, J., M. Hejazi, K. Tiemann, J. G. Parsons, M. Duarte-Gardea, and J. Henning.** 2002. Use of hop (*Humulus lupulus*) agricultural by-products for the reduction of aqueous lead(II) environmental health hazards. J.Hazard.Mater. **91**:95-112.
 34. **Gerhaeuser, C., A. Alt, K. Klimo, E. Heiss, E. Gamal, Amira, I. Neumann, J. Knauff, H. Scherf, N. Frank, Bartsch, Helmut, and H. Becker.** 2001. Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus*) as a novel potential cancer chemopreventive agent. Proceedings American Association for Cancer Research Annual Meeting [print] **42March, 2001. 18.**
 35. **Gibaldi, M. and S. Feldmann.** 1970. Mechanisms of surfactant effects on drug absorption. Journal of Pharmaceutical Sciences **59**:579-589.
 36. **Goese, M., K. Kammhuber, A. Bacher, M. H. Zenk, and W. Eisenreich.** 1999. Biosynthesis of bitter acids in hops: A ¹³C-NMR and ²H-NMR study on the building blocks of humulone. European Journal of Biochemistry **263**.
 37. **Gorissen, H., R. Vancraenenbroeck, and R. Lontie.** 1967. Separation of hop anthocyanogens by chromatography on "Superfine" Sephadex G-25 columns. Arch.Int.Physiol Biochim. **75**:558-560.
-

38. **Guadagni, D. G., R. G. Buttery, and J. Harris.** 1966. Odour intensities of hop oil components. *J.Sci.Food Agric.* **17**:142-144.
39. **Haas, L. F.** 1995. Neurological stamp. *Humulus lupulus* (hop). *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **58**:152.
40. **Hager.** 2002. *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe.* Springer Verlag, Heidelberg.
41. **Hänsel, R.** 1991. *Phytopharmaka.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
42. **Hänsel, R. and H. H. Wagener.** 1967. Versuche, sedativ-hypnotische Wirkstoffe im Hopfen nachzuweisen. *Arzneim.-Forsch.(Drug Res)* **17**:79-81.
43. **Hänsel, R.** 1982. Nachweis sedativ-hypnotischer Wirkstoffe im Hopfen 3.Mitteilung. *Planta Med.* **45**:224-228.
44. **Heiss, E., K. Klimo, I. Neumann, and C. Gerhaeuser.** 2001. Anti-proliferative mechanisms of Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus*) in in vitro breast cancer chemoprevention models. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* **127**.
45. **Henderson, M. C., C. L. Miranda, J. F. Stevens, M. L. Deinzer, and D. R. Buhler.** 2000. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**:235-251.
46. **Hoek, A. C., A. C. Hermans-Lokkerbol, and R. Verpoorte.** 2001. An improved NMR method for the quantification of alpha-acids in hops and hop products. *Phytochem.Anal.* **12**:53-57.
47. **Honma, Y., H. Tobe, M. Makishima, A. Yokoyama, and J. Okabe-Kado.** 1998. Induction of differentiation of myelogenous leukemia cells by humulone, a bitter in the hop. *Leuk.Res.* **22**:605-610.
48. **Hopsteiner.** Crop report 2001. www.hopsteiner.com . 2002.
49. **Hölzl, J.** 1992. Inhaltsstoffe des Hopfens (*Humulus lupulus* L.). *Zeitschrift für Phytotherapie* **13**:155-161.
50. **Kluge, F.** *Ethymologisches Wörterbuch.* 21. Auflage. 1989. Berlin.
51. **Knorr, F.** 1978. Polyphenols in brewing (author's transl). *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **166**:228-233.
52. **Koletzko, B. and F. Lehner.** 2000. Beer and breastfeeding. *Adv.Exp.Med.Biol.* **478**:23-28.

-
53. **Kovacevic, M. and M. Kac.** 2001. Solid-phase microextraction of hop volatiles: Potential use for determination and verification of hop varieties. *Journal of Chromatography* **918**:159-167.
 54. **Kumai, A. and R. Okamoto.** 1984. Extraction of the hormonal substance from hop. *Toxicol.Lett.* **21**:203-207.
 55. **Langezaal, C. R., A. Chandra, and J. J. Scheffer.** 1992. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. *Pharm.Weekbl.Sci.* **14**:353-356.
 56. **Larson, A. E., R. R. Yu, O. A. Lee, S. Price, G. J. Haas, and E. A. Johnson.** 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int.J.Food Microbiol.* **33**:195-207.
 57. **Lee, K. M., K. S. Jung, D. K. Song, M. Kräuter, and H. Y. Kim.** 1993. Effects of *Humulus lupulus* Extract on the Central Nervous System in Mice. *Planta Med.* **59**:A 691.
 58. **Lermusieau, G., M. Bulens, and S. Collin.** 2001. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J.Agric.Food Chem.* **49**:3867-3874.
 59. **Lindemayr, H. and S. Jager.** 1980. Beruflich erworbene Typ I-Allergie durch Hanfpollen und Haschisch. [Occupational immediate type allergy to hemp pollen and hashish (author's transl)]. *Derm.Beruf.Umwelt.* **28**:17-19.
 60. **Liu, J., J. E. Burdette, H. Xu, C. Gu, R. B. van Breemen, K. P. Bhat, N. Booth, A. I. Constantinou, J. M. Pezzuto, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, and J. L. Bolton.** 2001. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J.Agric.Food Chem.* **49**:2472-2479.
 61. **Mannering, G. J., J. A. Shoeman, and L. B. Deloria.** 1992. Identification of the antibiotic hops component, colupulone, as an inducer of hepatic cytochrome P-4503A in the mouse. *Drug Metab Dispos.* **20**:142-147.
 62. **Mannering, G. J., J. A. Shoeman, and D. W. Shoeman.** 1994. Effects of colupulone, a component of hops and brewers yeast, and chromium on glucose tolerance and hepatic cytochrome P450 in nondiabetic and spontaneously diabetic mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **200**:1455-1462.
 63. **Melchert, H., H. Knopf, E. Pabel, and A. Bertelsmann.** 2000. Use of psychophytopharmaceuticals in German surveys from 1984 to 1999: Results for Hypericum-, Valeriana- and Humulus-drugs. *Pharmacoepidemiology & Drug Safety* [print] **9**.
-

64. **Merte, H. J. and P. Roggenkamper.** 1974. Ocular injuries in hop-culture (author's transl). *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* **164**:125-129.
 65. **Milligan, S., J. Kalita, V. Pocock, A. Heyerick, L. De Cooman, H. Rong, and D. De Keukeleire.** 2002. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction.* **123**:235-242.
 66. **Milligan, S. R., J. C. Kalita, A. Heyerick, H. Rong, L. De Cooman, and D. De Keukeleire.** 1999. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**:2249-2252.
 67. **Milligan, S. R., J. C. Kalita, V. Pocock, D. K. Van, V, J. F. Stevens, M. L. Deinzer, H. Rong, and D. De Keukeleire.** 2000. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**:4912-4915.
 68. **Miranda, C. L., J. F. Stevens, A. Helmrich, M. C. Henderson, R. J. Rodriguez, Y. H. Yang, M. L. Deinzer, D. W. Barnes, and D. R. Buhler.** 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem.Toxicol.* **37**:271-285.
 69. **Miranda, C. L., Y. H. Yang, M. C. Henderson, J. F. Stevens, G. Santana-Rios, M. L. Deinzer, and D. R. Buhler.** 2000. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab Dispos.* **28**:1297-1302.
 70. **Moir, M.** 2000. Hops: A millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [print] **58**.
 71. **Monographie der Kommission E.** *Lupuli strobulus*, Hopfenzapfen. 1990.
 72. **Mountfield, R. J., S. Senepin, M. Schleimer, I. Walter, and B. Bittner.** 2000. Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450. *International Journal of Pharmaceutics* **211**:89-92.
 73. **Nerurkar, M. M., P. S. Burton, and R. T. Borchardt.** 1996. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharmaceutical Research* **13**:528-534.
 74. **NEWMARK, F. M.** 1978. Hops allergy and terpene sensitivity: An occupational disease. *Annals of Allergy* **41**:311-312.
 75. **OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development.** Guideline for Testing of chemicals 407 "Repeated Dose Oral Toxicity - Rodent". 1993.
-

-
76. **Okada, Y., M. Sugimoto, and K. Ito.** 2001. Molecular cloning and expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene responsible for essential oil biosynthesis in hop (*Humulus lupulus*). *Journal of Plant Physiology*. **158(9)**:1183-1188
 77. **Okamoto, R. and A. Kumai.** 1992. Antigonadotropic activity of hop extract. *Acta Endocrinol.(Copenh)* **127**:371-377.
 78. **Paniego, N. B., K. W. Zuurbier, S. Y. Fung, H. R. van der, J. J. Scheffer, and R. Verpoorte.** 1999. Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *Eur.J.Biochem.* **262**:612-616.
 79. **Park, H. S., K. S. Jung, S. Y. Jee, S. H. Hong, H. Y. Kim, and D. H. Nahm.** 2001. Are there any links between Hop Japanese pollen and other weed pollens or food allergens on skin prick tests? *Allergy Asthma Proc.* **22**:43-46.
 80. **Park, J. W., S. H. Ko, C. W. Kim, B. J. Jeoung, and C. S. Hong.** 1999. Identification and characterization of the major allergen of the *Humulus japonicus* pollen. *Clin.Exp.Allergy* **29**:1080-1086.
 81. **Pellow, S., P. Chopin, S. E. File, and M. Briley.** 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci..Meth.* **14**:149-167.
 82. **Pollach, G., W. Hein, and F. Hollaus.** 1996. Use of hop products as bacteriostaticum in the sugar industry. *Zuckerindustrie* **121**:919-926.
 83. **Rauha, J.-P., P. Tammela, J. Summanen, P. Vuorela, M. Kahkonen, M. Heinonen, A. Hopia, T. Kujala, K. Pihlaja, K. Tornquist, and H. Vuorela.** 1999. Actions of some plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH4C1 cells. *Pharmaceutical & Pharmacological Letters* **9**.
 84. **Rong, H., Y. Zhao, K. Lazou, D. De Keukeleire, S. Milligan, and P. Sandra.** 2000. Quantitation of 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.), hop products, and beer, by benchtop HPLC-MS using electrospray ionization. *Chromatographia* **51**:545-552.
 85. **Rong, H., T. Boterberg, J. Maubach, C. Stove, H. Depypere, S. Van Slambrouck, R. Serreyn, D. De Keukeleire, M. Mareel, and M. Bracke.** 2001. 8-Prenylnaringenin, the phytoestrogen in hops and beer, upregulates the function of the E-cadherin/catenin complex in human mammary carcinoma cells. *Eur.J.Cell Biol.* **80**:580-585.
 86. **Rote Liste 2002.** Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. 15-3-2002.
-

87. **Royal Pharmaceutical Society.** 1999. Martindale, The Extra Pharmacopoeia. London.
88. **Schulz, V., R. Hänsel, and V. E. Tyler.** 2001. Rational Phytotherapy. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
89. **Shimamura, M., T. Hazato, H. Ashino, Y. Yamamoto, E. Iwasaki, H. Tobe, K. Yamamoto, and S. Yamamoto.** 2001. Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **289**:220-224.
- 89b. **Sierra-Santoyo, A., Hernandez, M., Albores, A., Cebrian, M.-E.** 2000. Sex-dependent regulation of hepatic cytochrome P-450 by DDT. *Toxicol-Sci.* **54**: 81-87
90. **Simpson, W. J. and A. R. Smith.** 1992. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J.Appl.Bacteriol.* **72**:327-334.
91. **Singer, M. V., S. Teysse, and V. E. Eysselein.** 1991. Action of beer and its ingredients on gastric acid secretion and release of gastrin in humans. *Gastroenterology* **101**:935-942.
92. **Spencer, J. F., E. von Rudloff, and D. W. Westlake.** 1969. Changes produced in hop extract components by yeasts. *Can.J.Microbiol.* **15**:1381-1386.
93. **Steinhaus, M. and P. Schieberle.** 2000. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety spalter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J.Agric.Food Chem.* **48**:1776-1783.
94. **Stevens, J. F., A. W. Taylor, J. E. Clawson, and M. L. Deinzer.** 1999. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J.Agric.Food Chem.* **47**:2421-2428.
95. **Stevens, J. F., A. W. Taylor, G. B. Nickerson, M. Ivancic, J. Henning, A. Haunold, and M. L. Deinzer.** 2000. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* **53**:759-775.
96. **Stevens, J. F., C. L. Miranda, K. R. Wolthers, M. Schimerlik, M. L. Deinzer, and D. R. Buhler.** 2002. Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive nitrogen species. *J.Agric.Food Chem.* **50**:3435-3443.
97. **Stocker, H. R.** 1967. Sedative und hypnogene Wirkung des Hopfens. *Schweiz.Brauerei-Rundschau* **78**:80-89.
-

-
98. **Tabata, N., M. Ito, H. Tomoda, and S. Omura.** 1997. Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **46**:683-687.
 99. **Tagashira, M., M. Watanabe, and N. Uemitsu.** 1995. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **59**:740-742.
 100. **Tagashira, M., K. Uchiyama, T. Yoshimura, M. Shirota, and N. Uemitsu** 1997. Inhibition by Hop Bract Polyphenols of Cellular Adherence and Water-insoluble Glucan Synthesis of Mutans Streptococci. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **61**:332-335.
 101. **Tekel', J., D. De Keukeleire, H. Rong, E. Daeseleire, and C. Van Peteghem.** 1999. Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry. *J.Agric.Food Chem.* **47**:5059-5063.
 102. **Tobe, H., Y. Muraki, K. Kitamura, O. Komiyama, Y. Sato, T. Sugioka, H. B. Maruyama, E. Matsuda, and M. Nagai.** 1997. Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **61**:158-159.
 103. **Tobe, H., M. Kubota, M. Yamaguchi, T. Kocha, and T. Aoyagi.** 1997. Apoptosis to HL-60 by humulone. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **61**:1027-1029.
 104. **Urakami, K., C. Kobayashi, Y. Miyazaki, K. Nishijima, Y. Yoshimura, and K. Hashimoto.** 2000. Degradation products generated by sonication of benzyl alcohol, a sample preparation solvent for the determination of residual solvents in pharmaceutical bulks, on capillary gas chromatography. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* **48**:1299-1303.
 105. **Vanhoenacker, G., A. Dermaux, D. De Keukeleire, and P. Sandra.** 2001. Single-run capillary electrochromatographic analysis of hop acids and prenylated hop flavonoids. *Journal of Separation Science* **24**:55-58
 106. **Verschuere, M., P. Sandra, and F. David.** 1992. Fractionation by SFE and microcolumn analysis of the essential oil and the bitter principles of hops. *J.Chromatogr.Sci.* **30**:388-391.
 107. **Verzele, M.** 1986. 100 Years of hop chemistry and its relevance to brewing. *J.Inst.Brew.* **92**:32-48.
 108. **Vogel, H. G.** 2002. Drug discovery and evaluation: pharmakological assays. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 109. **Volz, H. P.** 2001. Phytochemicals as means to induce sleep. *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.* **95**:33-34.
 110. **Williams, C. S., B. V. Eastoe, I. R. Slaiding, and M. D. Walker.** 1994. Analysis of
-

- pesticide residues in hops and their extraction by liquid CO₂ during the production of hop extracts. *Food Addit.Contam* **11**:615-619.
111. **Wohlfart, R., R. Hänsel, and H. Schmidt.** 1983. The sedative-hypnotic action of hops. 4. Pharmacology of the hop substance 2-methyl-3-buten-2-ol. *Planta Med.* **48**:120-123.
112. **Wohlfart, R., G. Wurm, R. Hänsel, and H. Schmidt.** 1983. Detection of sedative-hypnotic active ingredients in hops. 5. Degradation of bitter acids to 2-methyl-3-buten-2-ol, a hop constituent with sedative-hypnotic activity. *Arch.Pharm.(Weinheim)* **316**:132-137.
113. **Yamamoto, K., J. Wang, S. Yamamoto, and H. Tobe.** 2000. Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett.* **465**:103-106.
114. **Yamamoto, K., J. Wang, S. Yamamoto, and H. Tobe.** 1999. Suppression of cyclooxygenase-2 gene transcription by humulon. *Prostaglandins* **59**.
115. **Yasukawa, K., M. Takeuchi, and M. Takido.** 1995. Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **52**:156-158.
116. **Yilmazer, M., J. F. Stevens, and D. R. Buhler.** 2001. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Letters [print]* **491**:252-256.
117. **Yilmazer, M., J. F. Stevens, M. L. Deinzer, and D. R. Buhler.** 2001. In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **29**:223-231.
118. **Zarrindast, M. R. and S. A. Tabatabai.** 1992. Involvement of dopamine receptor subtypes in mouse thermoregulation. *Psychopharmacology* **107**:341-346.
119. **Zierau, O., S. Gester, P. Schwab, P. Metz, S. Kolba, M. Wulf, and G. Vollmer.** 2002. Estrogenic Activity of the Phytoestrogens Naringenin, 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin and 8-Prenylnaringenin. *Planta Med.* **68**:449-451.

Lebenslauf

Name: Karl Hartmut Schiller
Geburtsdatum: 21. Mai 1974
Geburtsort: Höxter
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Peter Schiller
Margaretha Schiller, geb. Müller
Geschwister: Hans Meinhard Schiller

Schulbildung:

1980-84 Städtische Kath. Grundschule, Höxter
1984-93 König-Wilhelm-Gymnasium, Höxter
17.06.1993 Abitur

Studium:

WS 1993 – SS 1997 Studium der Pharmazie an der Westfälischen
Wilhelms-Universität, Münster
03.11.1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03.11.1997-30.04.1998 Kappenberg-Apotheke, Münster
04.05.1998-31.10.1998 Farmacia A. Perez Alarcon, Valencia, Spanien
29.01.1999 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
28.06.1999 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeiten:

seit 01.02.1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dissertation:

01.02.1999 Beginn der Dissertation am Institut für Pharmazeutische und
Medizinische Chemie, Abt. Pharmakologie und Toxikologie für
Naturwissenschaftler, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. J.
Verspohl und am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Winterhoff, Westfälische
Wilhelms-Universität Münster