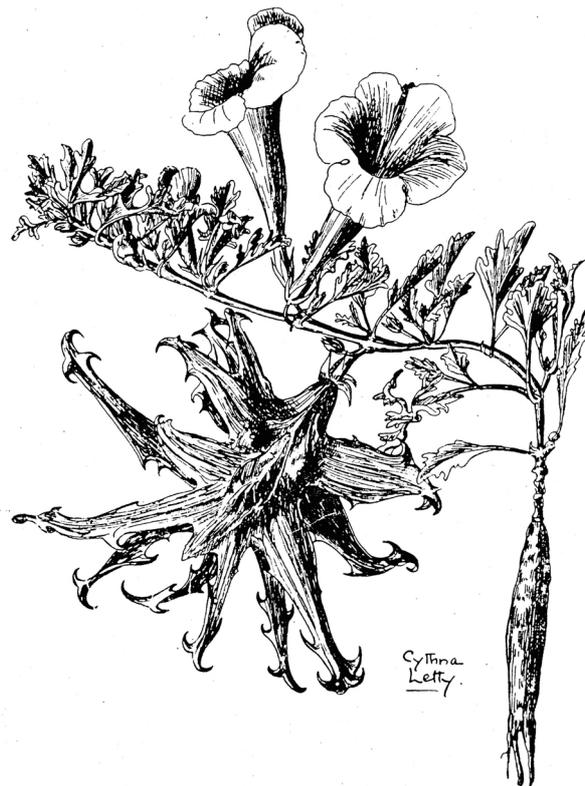


Kerstin Boje

**Phytochemische und biopharmazeutische Untersuchungen
an *Harpagophytum procumbens* DC.**



Münster 2002

Pharmazeutische Biologie und Phytochemie

**Phytochemische und biopharmazeutische Untersuchungen
an *Harpagophytum procumbens* DC.**

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

vorgelegt von
Kerstin Boje
aus Herne

-2002-

Dekan:	Prof. Dr. V. Leute
Erster Gutachter:	Prof. Dr. A. Nahrstedt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. H. Glasl
Tage der mündlichen Prüfungen:	- 23.09.2002
	- 24.09.2002
	- 25.09.2002
Tag der Promotion:	- 25.09.2002

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Nahrstedt angefertigt.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. A. Nahrstedt* für die Überlassung dieses interessanten Themas und, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, es in dieser Weise zu bearbeiten. Sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie seine Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen.

Dank gilt *allen Mitarbeitern und Kollegen* des Institutes, die mich in dieser Zeit begleitet haben, nicht nur für die Hilfestellung, die ich von allen Seiten erfahren habe, sondern insbesondere für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt *Herrn Dr. M. Lechtenberg* nicht nur für die motivierenden Gespräche, die geduldige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge, sondern auch für die freundschaftliche Unterstützung in den vergangenen Jahren. Weiterhin danke ich ihm für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. F. Petereit danke ich herzlich für die vielen hilfreichen, anregenden Gespräche, für seine Unterstützung und sein Interesse.

Herrn Prof. Dr. Glasl danke ich für seine Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft und die herzliche Übernahme des Koreferats.

Besonderem Dank gilt weiterhin *Frau M. Hermann* für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre wertvolle Unterstützung bei den Caco-2-Testungen und für das Korrekturlesen des Caco-Kapitels dieser Arbeit.

Besonders zu danken habe ich auch *Frau B. Quandt* für die Unterstützung bei der Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese und für die Durchführung der Zuckermanalytik an der CE.

Dank schulde ich ebenfalls *Frau U. Liefländer Wulf* für die Hilfestellung und Unterstützung an der HPLC.

Herrn Dr. H. Fler danke ich für die Durchführung der Spasmolysetestung.

Herrn R. Sieger danke ich für die Unterstützung bei den phytochemischen Arbeiten im Rahmen seines Praktischen Jahres.

Herrn Krüger und insbesondere *Herrn Weber* möchte ich für die liebevolle Pflege der Harpagophytum-Pflanzen danken.

Herrn Dr. U. Kuczkowiak und *Herrn Dr. S. O. Kruse* danke ich für die Überlassung des Fotomaterials der Pflanze.

Dank gilt weiterhin *Herrn Dr. D. Bergenthal* und *Frau M. Heim* (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster) sowie *Herrn Dr. K. Bergander* und *Frau K. Voss* (Institut für Organische Chemie, Münster) für die NMR-Messungen und Interpretationshilfen.

Herrn Th. Meiners (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster) und *Herrn Dr. H. Luftmann* (Institut für Organische Chemie, Münster) danke ich für die massenspektroskopischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. W. Wiegrebe, seinem *Arbeitskreis* und insbesondere *Herrn K. Zierreis* (Institut für Pharmazeutische Chemie, Regensburg) danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und vielseitigen Hilfen bei der Testung der Lipoxygenasen.

Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig und *Frau B. Rennert* (Institut für Pharmazie, Berlin) danke ich ebenfalls ganz herzlich dafür, dass sie mich an ihrem Institut aufgenommen, in den Elastase-Assay eingearbeitet haben und als Ansprechpartner ständig zur Verfügung standen.

Herrn Prof. Dr. M. Lehr und *Frau A. Schulze-Elfringhoff* (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster) danke ich für die Testung des Extraktes im Phospholipase-Testsystem und für die Diskussionsbereitschaft zu diesem Thema.

Bei *Herrn PD Dr. D. Paper* möchte ich mich für die Testung des Pagosids im HETCAM-Test bedanken.

Dank gilt ebenfalls *Frau H. Potthast* und *Dr. J. Ruoff* (Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Eschborn) für die Beantwortung der vielen Fragen zum Caco-2-Zellkulturmodell.

Herrn Dr. B. Glodny (Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Münster) danke ich für die Überlassung der Caco-2-Zellen.

Herrn Dr. M. Schmidt (Sertürner, Gütersloh) danke ich für die Überlassung der Übersetzungen einiger italienischer und französischer Arbeiten.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Boje, K., Lechtenberg, M., Nahrstedt, A.

Iridoid and Phenylethanoid Glucosides from *Harpagophytum procumbens* DC.
Posterbeitrag, 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung
02. – 06. September 2001 in Erlangen (Deutschland)

Boje, K., Lechtenberg, M., Nahrstedt, A.

Secondary Metabolites from *Harpagophytum procumbens* DC. inhibit the Activity of the
Elastase
Posterbeitrag, 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung
02. – 06. September 2001 in Erlangen (Deutschland)

*Meinen Eltern,
meinem Bruder Andreas
und Marcus*

Allgemeiner Teil

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	<i>HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS DC.</i>	1
1.1.1	Verbreitung	1
1.1.2	Botanische Beschreibung	2
1.1.3	Systematische Einordnung	4
1.1.4	Droge	6
1.1.5	Inhaltsstoffe	7
1.1.5.1	Iridoide	7
1.1.5.2	Phenylethanoide	12
1.1.5.3	Kohlenhydrate	13
1.1.5.4	Weitere Verbindungen	14
1.1.6	Wirkung und Anwendung	16
1.1.6.1	Volkstümliche Anwendung	16
1.1.6.2	Pharmakologische und Biochemische Studien	17
1.1.6.2.1	Klinische Studien	17
1.1.6.2.2	Tierexperimentelle Untersuchungen	18
1.1.6.2.3	Biochemische Testungen	20
1.1.6.2.4	Unerwünschte Wirkungen und Toxikologie	22
1.1.6.2.5	Pharmakokinetik	23
1.2	RHEUMATISCHE ERKRANKUNGEN	23
1.2.1	Bedeutung der Elastase im rheumatischen Geschehen	24
1.2.2	Arachidonsäurekaskade	25
1.3	RESORPTION	27
1.3.1	Gastrointestinale Absorption	27
1.3.2	Transportmechanismen	28
1.4	ZIELSETZUNG	32

Spezieller Teil

2	Phytochemische Untersuchungen eines Teufelskrallenwurzelextraktes	33
2.1	QUALITATIVE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DES EXTRAKTES	33
2.1.1	Ausgangsmaterial	33
2.1.2	Dünnschichtchromatographie	33
2.1.3	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	35
2.1.4	Kapillarelektrophorese (CE)	37
2.2	QUANTITATIVE METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER HAUPTINHALTSSTOFFE	40
2.2.1	Extraktion	41
2.2.2	Quantitative HPLC	41
2.2.2.1	<i>Harpagophytum procumbens</i> DC.	42
2.2.2.2	<i>Harpagophytum zeyheri</i> Decne	46
2.2.2.3	Handelsübliche Extrakte von <i>H. procumbens</i>	47
2.2.3	Quantitative CE	48
2.3	FRAKTIONIERUNG DES EXTRAKTES	51
2.4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	55
3	Strukturaufklärung	57
3.1	IRIDOIDGLUCOSIDE	57
3.1.1	Harpagosid	57
3.1.2	8-PCHG	63
3.1.3	8-Feruloylharpagid	68
3.1.4	8-O-Cinnamoylmyoporosid	73
3.1.5	Pagosid	82
3.2	PHENYLETHANOIDE	94
3.2.1	Acteosid	94
3.2.2	Isoacteosid	100
3.2.3	6'-O-Acetylacteosid	105
3.3	PHENOLCARBONSÄUREN	112
3.3.1	Zimtsäure	112
3.3.2	Kaffeesäure	115
3.4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	118

4	Hemmung der Elastase-Aktivität	122
4.1	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	123
4.1.1	Inkubationsansatz	123
4.1.2	Auswertung	125
4.2	VORVERSUCHE	126
4.2.1	Bestimmung der Enzymaktivität	126
4.2.2	Untersuchung der Substratabhängigkeit	127
4.2.3	Testung der Kaffeesäure	128
4.3	HAUPTUNTERSUCHUNGEN	129
4.3.1	Testung von Extrakten	129
4.3.1.1	<i>Harpagophytum procumbens</i> DC.	129
4.3.1.2	<i>Harpagophytum zeyheri</i> Decne	130
4.3.2	Testung von Fraktionen	132
4.3.3	Testung von Reinsubstanzen	133
4.3.3.1	Harpagosid	133
4.3.3.2	8-PCHG	135
4.3.3.3	Pagosid	137
4.3.3.4	Acteosid	138
4.3.3.5	Isoacteosid	139
4.3.3.6	6'-O-Acetylacteosid	140
4.3.3.7	Kaffeesäure	141
4.3.3.8	Zimtsäure	142
4.3.3.9	Stachyose	142
4.4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	144
5	Absorptionsstudien am Caco-2-Zellkulturmodell	147
5.1	CACO-2-RESORPTIONSMODELL	147
5.1.1	Versuchsdurchführung	149
5.1.2	Bestimmung der Integrität	151
5.1.3	Auswertung	152
5.2	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	153
5.3	BESTIMMUNG DER PERMEABILITÄT VON KONTROLLSUBSTANZEN	156
5.3.1	FITC-Dextran	156
5.3.2	Propranolol	158

5.4	UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT VON INHALTSSTOFFEN AUS <i>HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS DC.</i>	159
5.4.1	Untersuchung des Extraktes	160
5.4.1.1	Harpagosid	162
5.4.1.2	Zimtsäure	163
5.4.2	Testung von Reinsubstanzen	164
5.4.2.1	Apikaler zu basolateraler Transport	165
5.4.2.1.1	Harpagosid	166
5.4.2.1.2	8-PCHG	168
5.4.2.1.3	Pagosid	169
5.4.2.1.4	Zimtsäure	170
5.4.2.2	Basolateraler zu apikaler Transport	172
5.4.2.2.1	Harpagosid	173
5.4.2.2.2	8-PCHG	174
5.4.2.2.3	Pagosid	174
5.4.2.2.4	Zimtsäure	175
5.4.2.3	Zusatz von Verapamil	176
5.4.2.3.1	Harpagosid	177
5.4.2.3.2	8-PCHG	178
5.4.2.3.3	Pagosid	179
5.4.2.4	Zusatz von EDTA	180
5.4.2.4.1	Harpagosid	181
5.4.2.4.2	8-PCHG	182
5.5	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	182
6	Untersuchungen zur antiinflammatorischen und spasmolytischen Aktivität von <i>Harpagophytum procumbens DC.</i>	187
6.1	BEEINFLUSSUNG DES ARACHIDONSÄURESTOFFWECHSELS	188
6.1.1	Hemmung der Phospholipase A₂	189
6.1.1.1	Induktion durch Calcium-Ionophor A23187	189
6.1.1.1.1	Versuchsdurchführung	189
6.1.1.1.2	Testung des Extraktes	190
6.1.1.2	Induktion durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	190
6.1.1.2.1	Versuchsdurchführung	190
6.1.1.2.2	Testung des Extraktes	190

6.1.2	Hemmung der Lipoxygenasen	191
6.1.2.1	5-Lipoxygenase	191
6.1.2.1.1	Versuchsdurchführung im intakten Zellsystem	191
6.1.2.1.2	Testung im intakten Zellsystem	192
6.1.2.1.3	Versuchsdurchführung im zerstörten Zellsystem	193
6.1.2.1.4	Testung im zerstörten Zellsystem	193
6.1.2.2	12-Lipoxygenase aus Thrombozyten	193
6.1.2.2.1	Versuchsdurchführung	193
6.1.2.2.2	Testung des Extraktes	193
6.1.2.3	12-Lipoxygenase aus Mäuseepidermis	194
6.1.2.3.1	Versuchsdurchführung	194
6.1.2.3.2	Testung des Extraktes	195
6.2	HETCAM-TEST	195
6.2.1	Versuchsdurchführung	195
6.2.2	Testung von Pagosid	196
6.3	SPASMOLYTISCHE AKTIVITÄT	196
6.3.1	Versuchsdurchführung	197
6.3.2	Testung des Extraktes	197
6.4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	198
7	Zusammenfassung der Dissertation und Ausblick	200
7.1	ZUSAMMENFASSUNG	200
7.2	AUSBLICK	202
8	Material	204
8.1	PFLANZENEXTRAKTE	204
8.1.1	<i>Harpagophytum procumbens</i> DC.	204
8.1.2	<i>Harpagophytum zeyheri</i> Decne.	205
8.2	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	206
8.2.1	Allgemeine Laborgeräte	206
8.2.2	Chemikalien	206
9	Methoden	207
9.1	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	207
9.1.1	Dünnschichtchromatographie	207
9.1.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	208
9.1.2.1	Analytische HPLC	208
9.1.2.2	Präparative HPLC	208
9.1.2.3	Quantifizierung mit HPLC	211

9.1.3	Säulenchromatographie	212
9.1.3.1	Trennung an Celite [®] 545	212
9.1.4	Multilayer Counter Current Chromatography (MLCCC)	213
9.1.5	Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)	214
9.2	KAPILLARELEKTROPHORETISCHE METHODEN	215
9.2.1	Quantifizierung	215
9.2.1.1	Aufbereitung der Proben	215
9.2.1.2	Erstellung der Kalibriergeraden	216
9.2.2	Zuckerbestimmung	216
9.3	OPTISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	217
9.3.1	UV-Spektroskopie	217
9.3.2	NMR-Spektroskopie	218
9.3.3	Massenspektroskopie	219
9.3.4	Polarimetrie	219
9.4	ISOLIERUNG DER REINSUBSTANZEN	220
9.4.1	Fraktionierung des Extraktes	220
9.4.2	Isolierung und Charakterisierung der Verbindungen	220
9.5	ELASTASE-TESTSYSTEM	
9.5.1	Chemikalien und Geräte	224
9.5.1.1	Chemikalien	224
9.5.1.2	Geräte	224
9.5.2	Testsystem	224
9.5.2.1	Lösungen	224
9.5.2.2	Inkubationsansatz	226
9.5.2.3	Methodik	226
9.5.2.4	Bestimmung der Enzymaktivität	227
9.5.2.5	Einfluss der Substratkonzentration	228
9.5.2.6	Bestimmung der IC50-Werte	228
9.6	CACO-2 ZELLMODELL	229
9.6.1	Material	229
9.6.1.1	Geräte	229
9.6.1.2	Chemikalien	229
9.6.1.3	Caco-2 Zellen	229
9.6.2	Kultivierung der Zellen	230
9.6.3	Bestimmung der Stabilität der Verbindungen	230
9.6.4	Bestimmung der Integrität des Zellmonolayers	231
9.6.4.1	Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	231
9.6.4.2	FITC-Dextran	232
9.6.5	Transportstudien	233
9.6.5.1	Transwell-Filter	233
9.6.5.2	Durchführung	233
9.6.5.3	Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{eff})	235

9.7	ANTIINFLAMMATORISCHE UND SPASMOLYTISCHE AKTIVITÄT	236
9.7.1	Hemmung der Phospholipase A ₂	236
9.7.2	Hemmung von Lipoxygenasen	238
9.7.2.1	5-Lipoxygenase	238
9.7.2.2	12-Lipoxygenase aus Thrombozyten	241
9.7.2.3	12-Lipoxygenase aus Mäusehauthomogenisat	242
9.7.3	HETCAM-Assay	243
9.7.4	Spasmolysetest am Meerschweinchenileum	244
10	Literaturverzeichnis	246

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APT	Attached Proton Test
CD ₃ OD	Deuteriertes Methanol
CE	Kapillarelektrophorese
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Doppeldublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektroosmotischer Flow
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fließmittel
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HETCOR	Heteronuclear Correlated Spectroscopy
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HPETE	Hydroxyperoxyeicosatetraensäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀ -Wert	Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung hervorruft
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
LT	Leukotrien
m	Multipllett
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MLCCC	Multilayer Coil Countercurrent Chromatography

Abkürzungsverzeichnis

MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektroskopie
MW	Mittelwert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Kernresonanzspektroskopie)
NOE	Nuclear-Overhauser-Effect
8-PCHG	8-O-p-Cumaroylharpagid
PG	Prostaglandin
Ph. Eur.	Pharmakopeia Europaea (Europäisches Arzneibuch)
p.o.	per os
R _f	Retentionsindex
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TEER	Transepithelial electrical resistance (Transepithelialer Widerstand))
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
*	p < 0.05
**	p < 0.01



*We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.*

T.S. Eliot

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 *Harpagophytum procumbens* DC.

Während des Hottentottenaufstandes (1904-1906) in Deutsch-Südwest-Afrika konnte einem schwerverletzten Hottentotten durch Ärzte nicht mehr geholfen werden. Ein Mediziner seines Stammes heilte ihn jedoch mit Hilfe einer Wurzel. G.H. Mehnert, Soldat der kaiserlichen Schutztruppe, wollte dem Mediziner sein Geheimnis entlocken. Dieser wollte weder das Heilmittel noch oberirdische Teile, mit denen die Pflanze hätte identifiziert werden können, preisgeben. Mehnert verfolgte ihn mit einem Jagdhund. Es gelang



Abb. 1.1-1

ihm, die Stellen zu finden, wo er die Wurzel und das Laub vergraben hatte. Das Laub hatte der Mediziner, um sein Mittel nicht zu verraten, an einer von der Wurzel entfernten Stelle ausgesetzt.

Mehnert siedelte sich in Nababis (Bezirk Mariental) als Farmer an und vertrieb die getrocknete Wurzel unter dem Namen Harpago-Tee als Mittel bei Gesundheitsstörungen.

(Mündliche Überlieferung von G.H. Mehnert, zit. in Volk, 1964; Abb. 1.1-1: Soldat der kaiserlichen Schutztruppe).

Es handelte sich hierbei um die Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC.

Seit 1953 wird die Wurzel in Nordamerika und Europa importiert. Insbesondere in den 50er und 60er Jahren erlebte die Droge einen Boom als Wunderdroge gegen sämtliche Beschwerden [Kämpf, 1976].

1.1.1 VERBREITUNG

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pflanze mit dem Namen Teufelskralle ist nicht zu verwechseln mit der in Mitteleuropa heimischen Teufelskralle der Gattung *Phyteuma* (Campanulaceae) [Czygan, 1987].

Die afrikanische Teufelskralle, *Harpagophytum procumbens*, kommt ausschließlich in den Savannen des südwestlichen Afrikas zwischen dem 15. und 30. südlichen Breitengrad vor. Das betrifft vor allem die Länder Angola,



Abb. 1.1.1-1 Landkarte Südafrikas

Botswana, Namibia, Republik Südafrika, Sambia und Zimbabwe [Eich et al., 1998]. Betti (1994) gibt weiterhin an, dass sie zwischen 1100 und 1800 Höhenmeter zu finden ist.

Sie wächst bevorzugt in dem rotgefärbten, lehmigen Sandboden, der auch in der Kalahari zu finden ist. Als Ruderalpflanze ist sie häufig an Wegrändern, Wasserstellen und Siedlungen zu finden.

1.1.2 BOTANISCHE BESCHREIBUNG

Nach der Regenzeit entstehen aus der Wurzel 1 bis 2 Meter lange Triebe, die sich, dem Boden anliegend, sternförmig um die Wurzel verteilen (procumbens = kriechend). An den Trieben befinden sich gelappte bzw. gebuchtete, gestielte Blätter. Sie sind meist gegenständig, am Zweigende zum Teil auch wechselständig. In den Blättern der Achseln stehen einzeln die auffälligen, trichterförmigen Blüten. Sie sind meist rotviolett, um die 6 cm lang und ähneln den Blüten einer Gloxinie [Volk, 1964].



Abb. 1.1.2-1 Blüte von *H. zeyheri* (Gewächshaus, Institut für Pharmazeutische Biologie, Münster)

Aus den Blüten entstehen flache, stark verholzte Kapseln mit armartig verlängerten Auswüchsen, die mit klauenartigen Widerhaken besetzt sind [Volk, 1964]. Diese Widerhaken haben zwei Funktionen: zum einen können die Früchte bei starkem Wind im Boden verankert werden [Czygan, 1987], zum anderen dienen sie der Verbreitung der Früchte durch Tiere, die in diese Früchte hineintreten. Daher leitet sich der Name „Trampelklette“ ab [Epizoochorie – Straßburger, 1998]. Häufig sterben die Tiere, die auf diese Weise mit Harpagophytum-Früchten in Berührung gekommen sind, an Wundinfektion oder Bewegungsunfähigkeit [Volk, 1964]. Dabei führen die Tiere eine Art „Teufelstanz“ auf, um sich von der Frucht zu befreien. Dadurch erhielt erst die Frucht und später dann die gesamte Pflanze den Namen

Teufelskralle (devil's claw - Englisch, griffle du diable - Französisch) [Brossier, 1986]. Die Früchte können sich auch in dem Fell der Tiere festsetzen (z.B. im Vlies der Schafe), wodurch der Name „Wollspinne“ abzuleiten ist. Mit dem Vlies der Schafe sind die Früchte auch nach Europa gekommen. Der lateinische Gattungsname kann ebenfalls auf die bizarre Fruchtform zurückgeführt werden. Er leitet sich von dem griechischen Wort „harpagos“ ab, das „Enterhaken“ bedeutet.



Abb. 1.1.2-2 Frucht von *H. procumbens*; links in der Aufsicht [Volk, 1964], rechts in der Seitenansicht [Richter, 2001]

In den Früchten sind 13-45 längliche, schwarze Samen enthalten, die nach und nach freigesetzt werden [Betti, 1994]. Die Samenschale ist rau, warzig, schwach wulstig und unregelmäßig kantig.

Das Wurzelsystem besteht aus einer Haupt-(Primär-)Wurzel und Seiten-(Sekundär-)Wurzeln. Die verdickte Primärwurzel ist häufig auf Grund von Insektenfraß ausgehöhlt und trägt oben stumpf vierkantige, aufrechte Wurzelhalse, die von Volk (1964) als orthotrope Rhizome bezeichnet werden. Aus der Primärwurzel gehen die Seitenwurzeln hervor, deren knollenartige Verdickungen von pharmazeutischem Interesse sind (Kap. 1.1.4, S.6). Diese Verdickungen werden auch als sekundäre Speicherwurzeln bezeichnet und sind ca. 20 cm lang und 6 cm dick. Sie sind außen hell- bis rotbraun, umgeben von einem dünnen rissigen Korkmantel, der die Wurzel bei hohen Temperaturen vor dem Austrocknen schützt [Volk, 1964; Czygan, 1987]. Eine Seitenwurzel kann mehrere solcher Verdickungen aufweisen. Sie befinden sich bis zu einem Durchmesser von 1.50 m um die Pflanze [Sticher, 1977] und in einer Tiefe bis zu 2 m [Czygan, 1987]. Auf Grund des knollenartigen Aussehens der verwendeten sekundären Speicherwurzeln wurde die Droge anfangs [Volk, 1964] als *Tubera Harpagophyti* bezeichnet. Nach Caprasse (1980) ist diese Bezeichnung nicht korrekt, da es

sich um echte Wurzeln und nicht um Knollen handelt. Eine sehr ausführliche Beschreibung der Morphologie und Anatomie von *Harpagophytum* geben Ihlenfeldt und Hartmann (1970).

1.1.3 SYSTEMATISCHE EINORDNUNG

Die Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) gehört zu der Familie der Sesamgewächse (Pedaliaceae). Die systematische Einordnung der Pflanze, die in der Auflistung gegeben wird, erfolgt nach Frohne und Jensen (1998) und Strasburger (1998).

Klasse	Rosopsida
Unterklasse	Asteridae
Ordnung	Scrophulariales
Familie	Pedaliaceae
Gattung	<i>Harpagophytum</i>
Art	<i>Harpagophytum procumbens</i> DC.

Nach Volk (1964) gehören zu der Familie der Pedaliaceen ca. 100 Arten, die etwa 15 Gattungen bilden. Es handelt sich hierbei um eine kleine Familie, die in den Tropen, insbesondere in Afrika, zu finden ist. Betti (1994) spricht von 22 Gattungen und ca. 90 Arten. Nach Hegnauer (1968) zählt die Familie 50 Arten, die über 16 kleine Gattungen verteilt werden.

Neben *Harpagophytum procumbens* gehört auch *Sesamum indicum* zu den in Europa arzneilich verwendeten Pedaliaceen. Aus ölreichen Samen von *Sesamum indicum* wird das Sesamöl gewonnen [Ph.Eur. 2001; Volk, 1964]. In Afrika werden weiterhin noch die Früchte und Blätter von *Ceratotheca triloba* als Antitussivum und Antiinfektivum, die Blätter und die Wurzeln von *Dicercaryum zanguebarium* als antivirales und antiinflammatorisches Mittel und die Blätter von *Sesamum angustifolium* gegen Diarrhoe, Hauterkrankungen und Fieber verwendet [Iwu, 2000].

Die Gattung *Harpagophytum* umfasst 2 Arten: *Harpagophytum procumbens* DC. und *Harpagophytum zeyheri* Decne. Dabei ist nur *H. procumbens* als Stammpflanze für die Droge *Harpagophyti radix* zugelassen [Ph.Eur. 2001]. Betti (1994) gibt 2 Unterarten von *H. procumbens* (*H. procumbens* ssp. *procumbens* und ssp. *transvaalensis*) und 3 Unterarten von *H. zeyheri* (*H. zeyheri* ssp. *zeyheri*, ssp. *schijffii* und ssp. *sublobatum*) an. Die Unterarten

können nicht nur durch Blatt- und Fruchtformen voneinander unterschieden werden, sie zeigen auch eine unterschiedliche regionale Ausbreitung. In den meisten Arbeiten über Teufelskrallen werden nur diese zwei Arten beschrieben. Auf Unterarten gehen lediglich noch Ihlenfeldt und Hartmann (1970) bei der botanischen Untersuchung der Pflanzen der Gattung *Harpagophytum* ein. In Kontaktbereichen von *H. procumbens* und *H. zeyheri* konnten einige seltene Fälle von Hybridisierung der beiden Arten beobachtet werden [Betti, 1994].

Für Laien ist eine Unterscheidung von *H. procumbens* und *H. zeyheri* auf Grund der großen Ähnlichkeit sehr schwierig. Betti [1994] untersuchte die morphologisch-anatomische Gestaltung dieser Pflanzen und konnte Unterschiede in der Blatt- und Fruchtform, teilweise auch im Aussehen der Sekundärwurzeln erkennen. In den Handel gelangen jedoch nur die sekundären Speicherwurzeln ohne oberirdisches Material, was eine Identifizierung sehr erschwert. Eine Unterscheidungsmöglichkeit bietet eine Analyse der Inhaltsstoffe der sekundären Speicherwurzel z.B. mit Hilfe der HPLC. Dabei werden die Verbindungen Harpagosid und 8-O-p-Cumaroylharpagid (8-PCHG) zu Hilfe genommen. Die Verbindungen sind in beiden Arten in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Harpagosid liegt in *H. procumbens* in höheren Konzentrationen vor als in *H. zeyheri*, während 8-PCHG in *H. zeyheri* vorherrscht. Chrubasik und Ziegler (1996) bildeten aus den Gehalten der beiden Inhaltsstoffe einen Quotienten und nutzen ihn zur chemotaxonomischen Unterscheidung der beiden Arten. Für *H. procumbens* ermittelten sie einen Harpagosid/8-PCHG-Quotienten zwischen 20 und 38, für *H. zeyheri* lag der Quotient unter 1. Eich et al. (1998) berechneten den prozentualen Gehalt von 8-PCHG am „Gesamtiridoidgehalt“ (Harpagosid + 8-PCHG). Diese 8-PCHG-Kennzahl liefert eine eindeutigere Zuordnung zu den Arten. Feistel und Gaedcke (2000) untersuchten mit Hilfe der 8-PCHG-Kennzahl einige im Handel befindliche Drogen. Die 8-PCHG-Kennzahl betrug dabei für *Harpagophytum procumbens* maximal 12 und für *H. zeyheri* mindestens 30. Sie stellten dabei fest, dass nicht nur die sekundären Speicherwurzeln von *H. procumbens*, sondern auch die von *H. zeyheri* und deren Mischungen im Handel sind.

Sowohl durch morphologisch-anatomische als auch durch chemotaxonomische Übereinstimmungen [Hegnauer, 1968] kann eine enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Scrophulariaceen und Pedaliaceen gezeigt werden. Beide Familien weisen Iridoide vom Aucubintyp (Harpagosid) und reichliches Vorkommen an Kaffeesäurederivaten (Acteosid, Isoacteosid) auf. Die Samen sind ölreich und die Wurzel enthält anstelle von Stärke Stachyose als Reservekohlenhydrat.

1.1.4 DROGE

Wie bereits erwähnt, wird als Droge die getrocknete sekundäre Speicherwurzel von *Harpagophytum procumbens* DC. verwendet. Zur Drogengewinnung werden die Wurzeln erst der Länge nach geteilt, dann in 0.5-1.5 cm dicke Scheiben geschnitten und anschließend an gut belüfteten Stellen in der Sonne getrocknet [Ph.Eur. 2001]. Eine Zerkleinerung nach dem Trocknen ist nahezu nicht möglich. Einerseits verkleben die Mühlen, andererseits ist die Droge in getrocknetem Zustand zu hart [Volk, 1964]. Der Wasseranteil in der Wurzel ist sehr hoch. Aus 100 kg Frischmaterial kann nur 6 kg Droge gewonnen werden [Dittrich, 1974]. Auf Grund dessen schrumpft die Wurzel beim Trocknungsvorgang stark zusammen und es entstehen typische fächerförmige Drogenstücke [Wichtl, 2002]. Um einen Pilz- oder Bakterienbefall auf Grund des hohen Wasseranteils in der Wurzel zu vermeiden, ist es notwendig, die Wurzel schnell zu trocknen [Tunmann und Lux, 1962]. Nach ca. 3 Tagen Trocknung in der Sonne erhält man die Droge [Czygan, 1987].

Die Droge *Harpagophyti radix* besteht aus unregelmäßig gestalteten, keil- bis fächerförmigen Drogenstücken, die eine hellgraubraun bis dunkelbraune Färbung haben. Die Droge schmeckt mäßig bitter und ein wenig süßlich. Durchschnittlich beträgt der Bitterwert der Droge 6000 [Czygan et al., 1977]. Schier und Bauersfeld (1973) bezeichneten den Geschmack als stark bitter.

In allen Monographien (Ph.Eur., Franc. X^c, BHP, HAB, ESCOP, Kommission E) wird nur die sekundäre Speicherwurzel von *Harpagophytum procumbens*, nicht die von *H. zeyheri*, als Ausgangsmaterial zur Drogenherstellung zugelassen. Es wird jedoch auf Grund verschiedener Untersuchungen vorgeschlagen, beide Species als gleichwertig zu betrachten. Czygan und Krüger (1977) konnten weder einen Unterschied in der Morphologie, Anatomie, Histologie noch in dem Harpagosid-Gehalt der Wurzeln beider Arten feststellen und sah aus dem Grund beide Pflanzen als gleichwertige Drogenlieferanten an. Die meisten im Handel befindlichen Drogen bestehen aus Mischungen der beiden Arten [Czygan, 1987; Wegener, 1998]. Da häufig eine genaue Charakterisierung der Extrakte bei pharmakologischen Untersuchungen fehlte, lässt sich vermuten, dass für diese Versuche ebenfalls Mischungen verwendet worden sind und die antiinflammatorische Wirkung auf beide Arten zurückzuführen ist. Chrubasik und Ziegler (1996) untersuchten die antirheumatische und analgetische Wirksamkeit von *H. procumbens* und *H. zeyheri* und stellten fest, dass die Wirksamkeit beider Drogen vergleichbar ist.

Neben *Harpagophytum zeyheri* findet man auch häufig Teile der Primärwurzel von *Harpagophytum procumbens* in der Droge [Chrubasik und Ziegler, 1996; Schier, 1974]. Die

Hauptwurzel ist charakterisiert durch eine schwarzbraune Färbung, ein zu der Sekundärwurzel unterschiedliches mikroskopisches Bild [Vanhaelen, 1986] und einen kaum bitteren Geschmack. Die geringe Bitterkeit wird durch die geringe Konzentration an Harpagosid verursacht. Aus dem Grund wurde die Hauptwurzel als unwirksam abgelehnt [Schier und Bauersfeld, 1973]. Die Unwirksamkeit wurde jedoch durch Studien nicht belegt.

Neben dem „Harpago-Tee“ sind auch Kapseln, Tabletten und Brausetabletten mit dem Extrakt der Teufelskrallenwurzel im Handel. Zur Herstellung arzneilich verwendeter Extrakte werden Wasser oder Ethanol-Wasser-Mischungen verwendet. Standardisiert werden die meisten Extrakte auf den Hauptinhaltsstoff, das Iridoidglykosid Harpagosid.

1.1.5 INHALTSSTOFFE

Die Arbeitsgruppe von Tunmann (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg) beschäftigte sich von 1960 bis 1974 ausführlich mit dem Inhaltsstoffspektrum von *Harpagophytum procumbens*. Sie konnten Iridoidglykoside [Lux, 1960; Fickentscher, 1963; Tunmann und Hammer, 1968], Kohlenhydrate [Stierstorfer, 1961], Sterine, ein Triterpengemisch, freie Säuren, Flavonoide [Bauersfeld, 1974] und Harpagochinon [Koch, 1970] aus der getrockneten Droge isolieren. Das Vorkommen von Phenylethanoiden wurde durch Burger et al. (1987) beschrieben.

1.1.5.1 Iridoide

Iridoide sind Verbindungen, die aus einem Cyclopentanpyran-Ringsystem aufgebaut sind und meistens zwei Sauerstofffunktionen besitzen. Am C-1 des Moleküls befindet sich eine β -glykosidisch gebundene Glucose, die das Molekül stabilisiert. Biogenetisch handelt es sich bei den Iridoiden um Monoterpene. Infolge der Eliminierung von Kohlenstoff, wahrscheinlich als CO₂, existieren aber auch C-9 und C-8-Iridoide.

Früher wurden die Iridoide auch als Pseudoindikane bezeichnet [Warden, 1881; zit. in Sticher, 1969]. Dieser Name leitete sich von der Eigenschaft einiger iridoider Verbindungen ab, einen instabilen blauen Farbstoff in Gegenwart von Mineralsäuren und reduzierenden Zuckern zu bilden. Der heutige Name „Iridoide“ wurde von Briggs et al. (1963; zit. in Sticher, 1969) vorgeschlagen und ist auf die Ähnlichkeit des Grundgerüsts mit dem Enolhalbacetal des Iridodials zurückzuführen. Iridodial ist Bestandteil des Sekretes bestimmter Drüsenameisen, hauptsächlich der Iridomyrmex-Arten.

Die Verbindungsklasse der Iridoide lässt sich in 3 Gruppen unterteilen: nichtglykosidische Iridoide, glykosidische Iridoide und Secoiridoidglykoside. Sie findet vor allem Verbreitung in den Unterklassen Cornidae und Lamiidae, den früheren Tubifloren. Zu den Lamiidae gehören neben den Pedaliaceen unter anderem auch die Scrophulariaceen, Plantaginaceen, Lamiaceen und Verbenaceen [Hänsel et al., 1999].

Die Iridoide der Gattung *Harpagophytum* gehören zu den glykosidischen Iridoiden mit einem C-9 Grundgerüst. Bisher konnten 6 Verbindungen dieser Art aus *Harpagophytum procumbens* isoliert werden.

Harpagosid

Aus einem mit Petroliumbenzin entfettetem Extrakt isolierte Lux (1960) einen Bitterstoff, der unter Säurezusatz Glucose und unter Alkalizusatz Zimtsäure abspaltete. Sie gaben dieser Verbindung den Namen Harpagosid, ermittelten mit Hilfe chemischer und

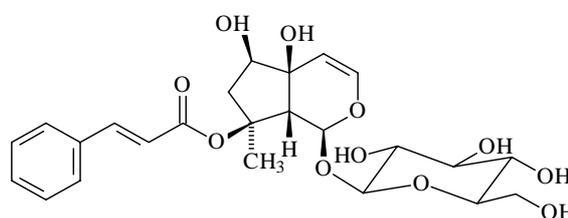


Abb. 1.1.5-1 Strukturformel des Harpagosids

spektroskopischer Untersuchungen die Summenformel $C_{22}H_{28}O_{10}$ und stellten fest, dass es sich um ein aucubinartiges Iridoidglykosid handelt. Die Konstitution des Glykosids konnte jedoch erst durch Lichti und Wartburg (1964 und 1966) vollständig ermittelt werden. Sie korrigierten die Summenformel zu $C_{24}H_{30}O_{11}$ und schlugen für Harpagosid die in Abbildung 1.1.5-1 gegebene Struktur vor. Nach Ph.Eur. 2001 muss die Droge einen Harpagosidgehalt von mindestens 1.2 % aufweisen.

Czygan und Krüger (1977) bestimmten das Verteilungsmuster von Harpagosid in der gesamten Pflanze. Blüten, Stengel und die reifen Früchte waren nahezu frei von Iridoiden. In den Blättern konnten sie Spuren von Harpagosid entdecken. Den höchsten Gehalt von Harpagosid fanden sie in den Wurzeln, wobei in der sekundären Speicherknolle die Konzentration doppelt so hoch war wie in der entsprechenden Primärwurzel. Die Harpagosidgehalte in den einzelnen Knollen einer Pflanze schwanken sehr stark. Willert und Schneider (2001) konnten Werte zwischen 0.94 % und 3.20 % finden. Nach Durchführung von über 700 Einzelpflanzenanalysen fanden sie weiterhin heraus, dass der Gehalt an Inhaltsstoffen stark von endogenen und ökologischen Faktoren beeinflusst wird. Die unterschiedliche Verteilung des Harpagosidgehaltes in den Knollen konnte auch von Feistel und Gaedcke (2000) beobachtet werden. Sie machten das von dem Alter der Knollen abhängig.

Der Gehalt an Harpagosid in *Harpagophytum procumbens* variiert demnach je nach Literaturquelle von 0.1 – 3.6 % [Schmidt et al., 1998].

In den sekundären Speicherknollen von *Harpagophytum zeyheri* konnte ebenfalls Harpagosid in dem gleichen Konzentrationsbereich wie in den Sekundärwurzeln von *H. procumbens* gefunden werden [Czygan und Krüger, 1977]. Das Verteilungsmuster des Harpagosids in den anderen Pflanzenorganen entspricht dem von *H. procumbens*.

Abou-Mandour (1977) und Franz et al. (1982) gelang es, aus Zellen der sekundären Speicherwurzel von *H. procumbens* kontinuierliche Gewebekulturen anzulegen. Das Gewebe wuchs zwar, konnte jedoch trotz verschiedenster Variationen in den Kulturbedingungen kein Harpagosid synthetisieren.

Iridoide haben nicht nur eine pharmakologische und biologische [Ghisalberti, 1998], sondern auch eine chemotaxonomische Bedeutung [Hegnauer und Kooiman, 1978]. Hegnauer (1968) beschrieb eine enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Pedaliaceen und u.a. den Scrophulariaceen nicht nur auf Grund der anatomisch-morphologischen Gestaltung, sondern auch auf Grund eines ähnlichen Inhaltsstoffspektrums, wie z.B. aucubinartiger Iridoide. Diese Aussage kann durch verschiedene Arbeiten unterstützt werden. Harpagosid konnte nicht nur in *H. procumbens*, sondern auch z.B. in *Scrophularia scorodonia* [Diaz et al., 1998], *Verbascum thapsus* [Pardo et al., 1998], *Scrophularia ningpoensis* [Yi-Ming et al., 1999], *Scrophularia koraiensis* [Pachaly et al., 1994] und *Verbascum*-Arten [Seifert et al., 1982; Seifert et al., 1985] gefunden werden.

Harpagid

Bei Harpagid handelt es sich um das Decinnamoylderivat des Harpagosids. Es kann durch alkalische Hydrolyse aus Harpagosid gewonnen werden [Tunmann und Lux, 1962; Lichti und Wartburg, 1964]. Die Verbindung liegt aber auch genuin in *H. procumbens* vor und konnte neben Harpagosid von Lux (1960) isoliert werden. Im Gegensatz zu seinem 8-Cinnamoylderivat Harpagosid weist es einen leicht süßlichen Geschmack auf. Harpagid ist bei den Tubiflorae [Hegnauer und Kooiman, 1978] weit verbreitet.

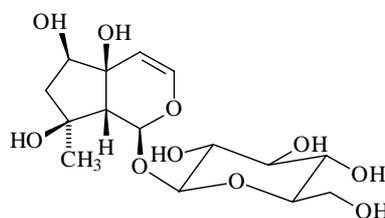


Abb. 1.1.5-2 Struktur des Harpagids

Harpagogenin

Im Rahmen der Strukturaufklärung des Harpagosids versuchten sowohl Lichti und Wartburg (1964) als auch Tunmann und Lux (1962) das Aglykon zu bestimmen. Da sich die Verbindung jedoch nach Säurezusatz zu einem schwarzen [Lichti und

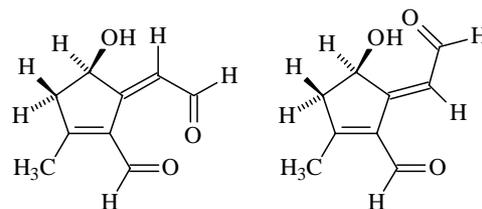


Abb. 1.1.5-3 Strukturen des Harpagogenins

Wartburg, 1964] und huminartigen [Tunmann und Lux, 1962] Produkt zersetzte, gelang die Identifizierung des Genins nicht. Es ist allgemein bekannt, dass Iridoide nach Zusatz von Säuren oder β -Glucosidasen zu einer nicht fassbaren, schwarzen Masse polymerisieren [Hänsel et al., 1999]. Es wird vermutet, dass sich infolge des Säurezusatzes die Glucose abspaltet und der Lactonring geöffnet wird. Es bildet sich ein Hemiacetal, welches mit der Dialdehydform im Gleichgewicht steht. Die Dialdehydform ist sehr reaktiv und bildet unbekannte Polymere aus. Vanhaelen et al. (1981) gelang es jedoch sowohl nach hydrolytischer (pH-Wert 3.5) als auch nach enzymatischer Spaltung das Aglykon aus Harpagosid und Harpagid zu fassen und zu identifizieren. Sie gaben der Verbindung den Namen Harpagogenin und ermittelten nach spektroskopischen Untersuchungen die in Abbildung 1.1.5-3 gegebenen Strukturen.

8-O-p-Cumaroylharpagid (8-PCHG)

8-PCHG wurde erstmals von Kikuchi et al. (1983) aus einem mit Petroliumbenzin entfetteten methanolischen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* isoliert und die Struktur aufgeklärt. Burger et al.

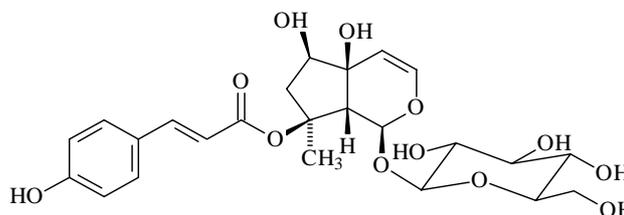


Abb. 1.1.5-4 Struktur des 8-PCHG's

(1987) gewann 8-PCHG neben Phenylethanoiden aus einem acetonischen Extrakt. Die Gewinnung aus anderen Pflanzen wurde bisher noch nicht beschrieben. 8-PCHG ist wie bereits erwähnt das Hauptiridoide der sekundären Speicherwurzeln von *H. zeyheri*. Schmidt et al. (1998) ermittelten z.B. für *H. zeyheri* einen 8-PCHG-Gehalt von 0.76 – 1.59 % und in *H. procumbens* einen Gehalt von 0.02 – 0.18 %. Die Werte von Baghdikian et al. (1997) waren mit diesen vergleichbar. Das Verhältnis von Harpagosid und 8-PCHG konnte somit zur Unterscheidung der beiden Arten verwendet werden.

Während der Gehalt von Harpagosid in den Sekundärwurzeln um das 35fache größer ist als der in den Blättern der gleichen Pflanze, liegen die Gehalte von 8-PCHG in den beiden Organen in derselben Größenordnung [Feistel und Gaedcke, 2000].

Procumbid

Procumbid konnte von Stierstorfer (1961)/ Tunmann und Stierstorfer (1962) neben verschiedenen Kohlenhydraten (Kap. 1.1.5.3, S.13) aus einem mit organischen Lösungsmitteln nicht ausschüttelbaren, ethanolischen Extrakt von *Harpagophyti radix* gewonnen werden. Die Strukturaufklärung gelang im Rahmen der Arbeit von Stierstorfer (1961) jedoch nicht. Auf

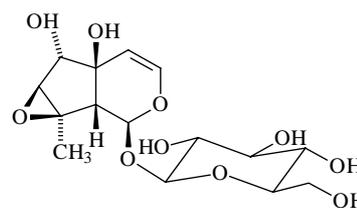


Abb. 1.1.5-5 Struktur des Procumbids

Grund ähnlicher, chemischer Eigenschaften wie Harpagosid und Harpagid wurde eine ähnliche chemische Konstitution vermutet [Tunmann und Stierstorfer, 1962; Tunmann und Stierstorfer, 1964]. Eine glykosidische Spaltung der Verbindung gelang sowohl mit Säurezusatz als auch mit einem α -Glucosidase enthaltendem Fermentgemisch, nicht jedoch mit Emulsin oder verschiedener β -Glucosidasen. Sie schlossen daraus, dass in der Verbindung eine α -glykosidische Bindung vorlag. Tunmann und Hammer (1968) konnten jedoch mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen (typische Lage und Kopplungskonstante des H-1') und Spaltung der Verbindung durch eine β -Glucosidase eine β -glykosidische Bindung nachweisen. Die Zuordnung der Struktur des Procumbids war in der Literatur nicht einheitlich. Bianco et al. (1971) ermittelte für Procumbid die in Abbildung 1.1.5-5 gegebene Struktur, die von Kikuchi et al. (1983) bestätigt werden konnte.

Procumbosid

Diese Verbindung konnte erstmals von Kikuchi et al. (1983) aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* isoliert werden. Sie ermittelten für diese Verbindung folgende Struktur: Abbildung 1.1.5-6.

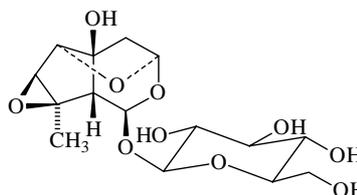


Abb. 1.1.5-6 Struktur des Procumbosids

6'-O-(p-Cumaroyl)-procumbid

Im Rahmen der Arbeit von Kikuchi et al. (1983) gelang ebenfalls die Isolierung von 6'-O-(p-Cumaroyl)-procumbid. Bei dieser Verbindung handelt sich um ein p-Cumarsäure-Derivat des Procumbids. Cumarsäure ist dabei an die Hydroxylgruppe der Position 6' der Glucose gebunden. Diese Verbindung konnte auch von Burger et al. (1987) aus einem *Harpagophyti radix*-Extrakt gewonnen werden.

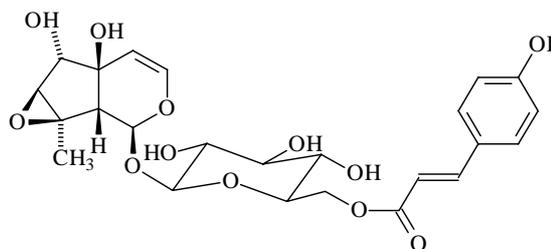


Abb. 1.1.5-7 6'-O-(p-Cumaroyl)-procumbid

1.1.5.2 Phenylethanoide

Die Struktur der Phenylethanoide wird bestimmt durch eine Hydroxyphenylethylstruktur mit einer β -glykosidisch gebundenen Glucose. An der Glucose können noch weitere Zimtsäurederivate (Kaffeesäure) und Zucker (Rhamnose, Glucose, Allose, Apiose) gebunden sein [Jiménez und Riguera, 1994].

Phenylethanoide sind im ganzen Pflanzenreich und insbesondere innerhalb der Tubiflorae (Lamiidae) weit verbreitet. Dort liegen sie häufig neben Iridoiden vor. In vielen Familien und Gattungen dienen einzelne Phenylethanoide als chemotaxonomische Marker [Cometa et al., 1993].

Burger et al. (1987) konnte erstmals Phenylethanoide aus einem Aceton-Extrakt von *Harpagophyti radix* isolieren. Es handelte sich hierbei um die bekannten Verbindungen Acteosid, Isoacteosid und das neue Glykosid β -(3',4'-dihydroxyphenyl)ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3) β -D-glucopyranosid.

Acteosid

Acteosid stellt nicht nur das erste isolierte Phenylethanoid dar, sondern auch das am weitesten verbreitete. Es konnte in mehr als 60 Arten nachgewiesen werden [Cometa et al., 1993]. Acteosid ist ebenfalls unter dem Namen Verbascosid und Kusagin in bekannt. 1963 wurde die

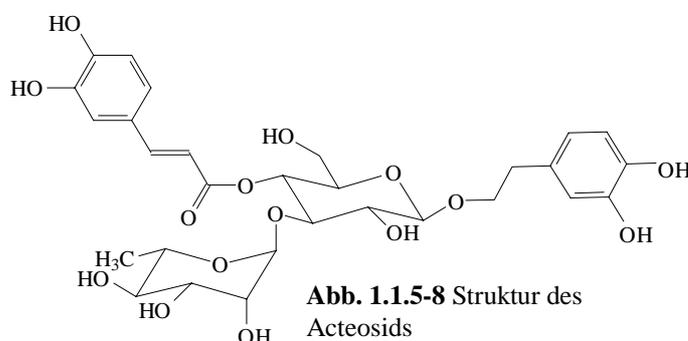
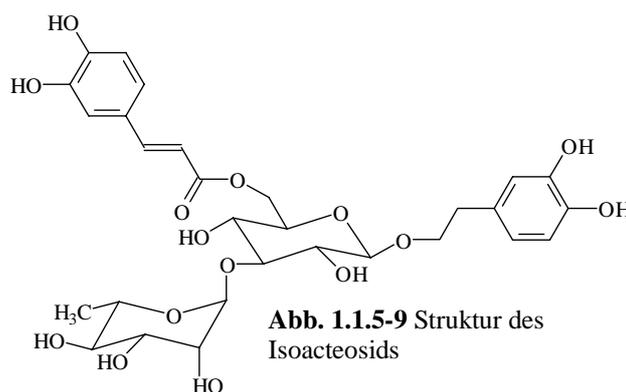


Abb. 1.1.5-8 Struktur des Acteosids

Verbindung von Scarpati und Delle Monache (1963) aus *Verbascum sinuatum* isoliert und als Verbascosid bezeichnet. 1968 konnten Birkofer et al. die Verbindung aus *Syringa vulgaris* gewinnen. Sie gaben ihr jedoch den Namen Acteosid. Sakurai und Kato (1983), die die Substanz aus *Clerodendron trichotomum* isoliert haben, bezeichneten sie als Kusagin in.

Isoacteosid

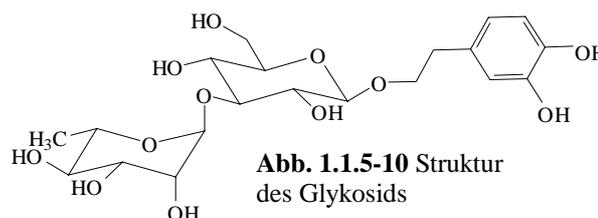
Neben Acteosid konnten Scarpati und Delle Monache (1963) Isoacteosid (Abb. 1.1.5-9) aus *Verbascum sinuatum* isolieren. Sie gaben der Verbindung den Namen Isoverbascosid. Der Name Isoacteosid wurde von Miyase et al. (1982) geprägt, die die Substanz aus *Leucoseprum japonicum* isolierten.



Isoacteosid ist das Stellungsisomer des Acteosids. Der Kaffeesäurerest ist über die Hydroxylgruppe des C-6' der Glucose gebunden und nicht über die des C-4'.

 β -(3',4'-dihydroxyphenyl)ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3) β -D-glucopyranosid.

Wie bereits oben erwähnt, konnte diese Verbindung (Abb. 1.1.5-10) erstmals von Burger et al. (1987) neben Acteosid und Isoacteosid aus *H. procumbens* isoliert werden.

**1.1.5.3 Kohlenhydrate**

Niedermolekulare Kohlenhydrate (Mono-, Disaccharide) sind für Pflanzen eine leicht erschließbare Energiequelle. Höhermolekulare Kohlenhydrate (Polysaccharide) dienen der Pflanze neben Fetten und Proteinen sowohl als Reservesubstanzen als auch als Gerüstsubstanzen [Reinhardt, 2001]. Als Reservekohlenhydrat liegt in den meisten Fällen Stärke vor. In einigen Familien wurde sie jedoch ersetzt, wie z.B. bei den Scrophulariaceen, Bignoniaceen, Acanthaceen, Martyniaceen, Gesneriaceen und Pedaliaceen. Diese sind durch das Vorkommen des Tetrasaccharids Stachyose als Reservekohlenhydrat gekennzeichnet [Hegnauer, 1968]. Es ist ebenfalls bei den Lamiaceen, Verbenaceen und Plantaginaceen [Frohne und Jensen, 1998] zu finden. Stachyose wurde erstmals 1890 von Planta und Schulze aus *Stachys tubrifera*, Lamiaceae [zit. in Stierstorfer, 1961] isoliert.

Im Rahmen seiner Dissertation beschäftigte sich Stierstorfer (1961) mit den wasserlöslichen, mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahierbaren Verbindungen aus *H. procumbens*. Er

konnte Glucose, Fructose, Saccharose, das Trisaccharid Raffinose und das Tetrasaccharid Stachyose mittels Säulenchromatographie isolieren. Nach seinen Untersuchungen nimmt Raffinose 8-12% der Wasserphase (\cong 0.18-0.27 % der Ausgangsdroge) und Stachyose 30-35% (\cong 0.6-0.8 % der Ausgangsdroge) der Wasserphase ein. Da im Laufe dieser Untersuchungen keine Stärke in den sekundären Speicherwurzeln gefunden werden konnte, lag nahe, dass Stachyose das Reservekohlenhydrat darstellt.

Die Arbeiten von Ziller und Franz (1979) erweiterten die Kenntnisse über das Inhaltsstoffspektrum der Kohlenhydrate. Sie konnten neben den für *H. procumbens* bekannten Zuckern noch Galaktose, myo-Inositol und Sucrose nachweisen. Der prozentuale Anteil der isolierten Kohlenhydrate, bezogen auf das getrocknete Pflanzenmaterial, betrug für Galaktose 0.36 %, Glucose 0.25 %, Fructose 0.27 %, Sucrose 2.73 %, Raffinose 2.40 % und für Stachyose 46.00 %.

Kallusgewebe der sekundären Speicherwurzel produziert im Gegensatz zu dem intakten Organ nur geringe Mengen Stachyose [Franz et al., 1982]. Saccharose ist nur in Spuren und Galaktose gar nicht vorhanden. Fructose nimmt in diesen Gewebekulturen den Hauptanteil der freien Zucker ein. Weiterhin konnten in den Kalli höhermolekulare Kohlenhydrate identifiziert werden.

1.1.5.4 Weitere Verbindungen

Triterpene

Bauersfeld [1974] konnte aus einem Etherextrakt der mit Petrolumbenzin entfetteten Wurzeln pentacyclische Triterpene (Oleanolsäure, 3 β -Acetyloleanolsäure und Ursolsäure) isolieren. Der Anteil des Etherextraktes an der Drogenmasse betrug 0.2 %. Es fiel ebenfalls ein Triterpengemisch an, das nicht weiter aufgetrennt werden konnte. Mittels chemischer und spektroskopischer Untersuchungen stellte er fest, dass dieses Gemisch aus Estern der Acetyloleanol- bzw. Acetylursolsäure mit p-Methoxy- und o-Methoxybenzylalkohol besteht. In diesem Etherextrakt kamen 9% Ursol- und Oleanolsäure, 2 % 3 β -Acetyloleanolsäure und 0.4 % des Ester-Gemisches vor.

Sterine

Aus dem oben genannten Extrakt gewann Bauersfeld (1974) auch Sterine wie β -Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Sitosterolzimtsäureester. In dem Etherextrakt waren sie zu insgesamt 2.2 % enthalten. Sterolglykoside nahmen mit 54 % den größten Teil des

Etherextraktes ein. Die freien Sterine wurden bereits im Rahmen der Untersuchung von Koch (1970) gefunden. Er isolierte ebenfalls ein Sterolglykosidgemisch (25% des Etherextraktes). Chemische und spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass dieses Gemisch aus β -Sitosterin- β -D-Glucosid, Stigmasterin- β -D-Glucosid und Campesterin- β -D-Glucosid bestand.

Freie Säuren

Der Etherextrakt von *Harpagophyti radix* enthielt ebenfalls Chlorogensäure (3 %) und Zimtsäure (6.6 %). Zimtsäure konnte bereits als Esterkomponente des Harpagosids beschrieben werden.

Flavonoide

Aus dem Etherextrakt konnte eine intensiv gelb-orange Fraktion gewonnen werden, die sich aus den Flavonolen Kämpferol, Kämpferid, Fisetin und dem Flavon Luteolin zusammensetzte. Der Gehalt der Flavonoide im Etherextrakt mit insgesamt 0.9 % war gering. Hegnauer (1968) beschreibt das Vorkommen von Flavonen anstelle von Flavonolen als biochemisches Merkmal, das Pedaliaceen mit anderen Tubiflorae gemeinsam haben. Demnach scheint *H. procumbens* auf Grund des Vorkommens der oben genannten Flavonole von der chemotaxonomischen Einordnung von Hegnauer (1968) abzuweichen.

Kohlenwasserstoffe

In dem von Koch (1970) bearbeiteten Etherextrakt konnte ein Kohlenwasserstoffgemisch gefunden werden. Eine gaschromatographische Prüfung ergab, dass dieses Gemisch aus n-Alkanen mit einer Kettenlänge von C-20 bis C-35 bestand. Diese Fraktion nahm 0.5 % des Gesamtetherextraktes ein.

Harpagochinon

Koch [1970] konnte in geringen Mengen aus einem Etherextrakt der entfetteten Wurzel Droge eine Verbindung gewinnen, die bereits im Tageslicht auf dem Dünnschichtchromatogramm eine weinrote Färbung aufwies. Nach spektroskopischen Untersuchungen vermuteten sie die in der Abbildung 1.1.5.4-1 gegebene Struktur und gaben ihr den Namen Harpagochinon.

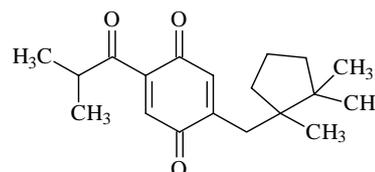


Abb. 1.1.5.4-1 Struktur des Harpagochinons

Wachse und Fette

Hammer (1974; zit. von Sticher, 1977) berichtete weiterhin von dem Vorkommen von Wachsen und Fetten. Das fette Öl enthält neben Palmitinsäure und Stearinsäure hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren wie Palmitoleinsäure, Ölsäure und Linolsäure. Der Fettsäureanteil des Wachses besteht überwiegend aus Palmitinsäure.

Aminosäuren

Im Rahmen der Untersuchung der Kohlenhydrate fanden Ziller und Franz (1979) auch Aminosäuren. Sie lagen jedoch meist nur in Spuren vor. Es konnten Aspartinsäure, Serin, Alanin, Arginin, Glutaminsäure, Valin, Prolin, Leucin, Phenylalanin, Histidin, Glycin und Lysin nachgewiesen werden.

Kwasniewski (1978) berichtete von einer bräunlichen, glasartigen Masse nach dem Auskochen der Droge mit Chloroform, die er als Gummiharz (1.2 % bzgl. Droge) bezeichnete. Weiterhin fand er nach der Methode des DAB 7 ein gelbes Wasserdampfdestillat, das er als ätherisches Öl bezeichnete und zu 0.03 % in der Droge enthalten war. Mit Methanol konnte er aus einem klar filtrierten, wässrigen Auszug Schleim ausfällen.

1.1.6 WIRKUNG UND ANWENDUNG

1.1.6.1 Volkstümliche Anwendung

Traditionell wurde eine wässrige Abkochung der getrockneten Wurzel von den Hottentotten und Bantus bei rheumatischen Beschwerden, als Verdauungs- und Fiebermittel, bei Migräne, allergischen Reaktionen und gegen Blutkrankheiten verwendet. Auch in der Schwangerschaft und bei der Geburt fand die Wurzel von *Harpagophytum procumbens* ihren Einsatz. Sie wurde zur Schmerzstillung während der Schwangerschaft und Geburt angewendet. Aus dem wässrigen Extrakt der Wurzel wurde eine Salbe hergestellt, die bei einer mit Komplikationen verlaufenden Geburt auf das Abdomen aufgetragen wurde [Vanhaelen, 1986]. Eine Salbe wurde ebenfalls bei Hauterkrankungen und Hautverletzungen eingesetzt [Volk, 1964; Vanhaelen, 1986].

1.1.6.2 Pharmakologische und biochemische Studien

Nachdem die Droge 1953 durch Volk [Volk, 1964; Reglin, 1995] ihren Einzug in Europa und Nordamerika gefunden hatte, wurde sie anfangs als Wundermittel angepriesen. Sie wurde bei Stoffwechselerkrankungen, Galle-, Leber-, Nieren-, Blasen-, Magen-, Darm-Beschwerden, allergischen Reaktionen, Menstruations- und Wechseljahresbeschwerden, Kopfschmerzen und allgemein gegen Alterserscheinungen verwendet [Kämpf, 1976]. Wirksamkeitsbelegende Studien für diese Anwendungsgebiete liegen jedoch nicht vor.

Eine Positiv-Monographie der Kommission E erhielt *Harpagophyti radix* für die Anwendungen bei Appetitlosigkeit, dyspeptischen Beschwerden und bei degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparates. Der verdauungsfördernde Effekt kann auf die Anwesenheit der Bitterstoffe in der Droge zurückgeführt werden, die eine magensaftsekretionsanregende und choloretische Wirkung besitzen. Die antirheumatische Wirkung wurde seit den 50er Jahren in vielen Studien untersucht. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse wird im Folgenden dargestellt. Übersichten zu den publizierten experimentellen und klinischen Untersuchungen geben die Veröffentlichungen von Wegener und Winterhoff (2001), Hansen (2000), Wegener (1998), Loew (1995) und Wenzel und Wegener (1995).

1.1.6.2.1 Klinische Studien

Viele der klinischen Studien sind offen und unkontrolliert durchgeführt worden. Es liegen aber mittlerweile auch Ergebnisse aus doppelblinden und kontrollierten Untersuchungen vor. Diese Untersuchungen bezogen sich hauptsächlich auf die Wirksamkeit bei Arthrosen, Arthriden, Rheuma und Lumbalgien.

Bei Patienten mit Arthrose und Arthritis konnten durch die Einnahme von *Harpagophyti radix* die Symptomatik und die Schmerzen deutlich vermindert werden. Es konnte weiterhin eine Verringerung der Steifigkeit und Erhöhung der Beweglichkeit beobachtet werden [Schmelz et al., 1997; Chantre et al., 2000; Leblan et al., 2000].

Harpagophyti radix konnte ebenfalls bei der Indikation Arthritis und Rheuma den Schmerz verringern, die Symptomatik verbessern und die Beweglichkeit erhöhen [Hansen, 2000].

Bei der Indikation Rückenschmerzen konnte in den Studien eine Schmerzfreiheit erzielt werden [Chrubasik et al., 1996; Göbel et al., 2001; Göbel et al., 1999; Laudahn et al., 1999; Chrubasik et al., 1999]. Bei Chrubasik et al. (1997) und Chrubasik et al. (1996) zeigte der Extrakt keinen Einfluss auf die Beweglichkeit.

Schmidt (1978) und Leblan et al. (2000) stellten fest, dass durch eine zusätzliche Applikation eines Harpagophytum-Tees Corticoide eingespart werden können.

Im Rahmen einer Kohortenstudie [Chrubasik et al., 1997] wurde Wirtschaftlichkeit und Wirksamkeit eines Teufelskrallen-Präparates mit nichtsteroidalen Antirheumatika und/oder Krankengymnastik bei Rückenschmerzen verglichen. Die Teufelskrallen-Gruppe litt längere Zeit unter den Schmerzen. Die Beschwerden waren auch anfangs stärker ausgeprägt. Nach 6 Wochen jedoch konnte aber im Beschwerdebild zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied mehr festgestellt werden. Zudem erwies sich die Therapie mit Harpagophyti radix als kostengünstiger.

1.1.6.2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die ersten Untersuchungen zur antiphlogistischen und antiarthritischen Wirksamkeit von Harpagophyti radix führte Zorn [1958] durch. Eine Teeabkochung der Wurzel wies sowohl nach s.c. als auch nach p.o. Gabe eine Wirksamkeit bei der Formaldehydarthritis der Ratte auf. Es folgten weitere Untersuchungen des Extraktes auf antirheumatische und analgetische Wirksamkeit. Für antirheumatische Effekte wurden akute (Carrageenan-, Ovalbumin-, Formalin-Rattenpfotenödemtest) und subakute Modelle (Arthritis-, Granuloma-Test) verwendet. Zur Überprüfung der analgetischen Wirksamkeit wurden hauptsächlich akute Modelle (Krümmreflextest, Hot-Plate-Test, Brennstrahltest, UV-Erythem) verwendet [Wegener und Winterhoff, 2001].

Übersichtstabellen [Wegener, 1998] machen deutlich, dass die Ergebnisse sowohl für den Extrakt als auch für Harpagosid sehr widersprüchlich sind. Eine vergleichende Bewertung der Untersuchungsergebnisse wird durch eine mangelnde Charakterisierung der eingesetzten Extrakte erschwert.

In den subakuten Modellen zeigte der Extrakt und zum Teil auch Harpagosid eine antiarthritische Wirksamkeit. Bei der Formaldehyd-induzierten-Arthritis erzeugte der Extrakt nach p.o. [Zorn, 1958], s.c. [Zorn, 1958] und i.p. [Eichler und Koch, 1970] Gabe eine Verbesserung der Gelenkfunktion. Ebenfalls sank im Granulombeuteltest durch die p.o. [Erdös et al., 1978] und i.p. [Eichler und Koch, 1970] Verabreichung des Extraktes das Granulomgewicht.

Im Carrageenan-induzierten-Rattenpfotenödemtest (i.p. Gabe) konnte der Extrakt bei den Untersuchungen von Lanhers et al. (1992), Mánez et al. (1990) und Baghdikian et al. (1997) eine Abschwellung des Ödems hervorrufen. Mánez et al. (1990) hob dabei die gute

Wirksamkeit eines Chloroform-Extraktes hervor. Nach oraler Gabe konnte in diesem Testsystem keine Wirkung des Extraktes beobachtet werden [Whitehouse et al., 1983; McLeod et al., 1979; Erdös et al., 1978]. Es konnte ebenfalls keine Ödemhemmung (p.o. und i.p.) in dem Adjuvans-induziertem-Rattenpfotenödemtest erzielt werden [McLeod et al., 1979; Erdös et al., 1978].

Im Rahmen der Untersuchungen von Baghdikian et al. (1997) zeigte ein wässriger Extrakt (i.p.) im Writhing-Test eine analgetische Wirkung und bestätigte somit die Ergebnisse von Lanhers et al. (1992). Erdös et al. (1978) gelang der Nachweis einer analgetischen Wirkung in diesem Testsystem nach oraler Gabe nicht. Positive Ergebnisse erzielte Erdös et al. (1978) nach der oralen Gabe eines methanolischen und butanolischen Extraktes im Brennstrahltest. Nach i.v. Verabreichung zeigte der Extrakt im Kaninchenohrtest keine analgetische Aktivität [Eichler und Koch, 1970].

Occhiuto et al. (1985) konnten eine spasmolytische Aktivität des Extraktes am isolierten Meerschweinchenileum feststellen. Weiterhin zeigte ein methanolischer Extrakt von *H. procumbens* eine antiarrhythmische und blutdrucksenkende Wirkung [Circosta et al., 1984; Costa de Pasquale et al., 1985].

Baghdikian et al. (1997) untersuchten nicht nur einen Extrakt aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens*, sondern auch von *H. zeyheri*. Dabei war die analgetische und antiphlogistische Wirkung beider Extrakte miteinander vergleichbar. Daraufhin wurde gefordert, dass *H. zeyheri* ebenfalls als Ausgangsmaterial zur Drogenherstellung zugelassen wird. Harpagosid war dabei der Wirkung des Extraktes unterlegen [Baghdikian et al., 1997].

Neben dem Extrakt wurden auch zum Teil die analgetische und antiphlogistische Aktivität von Harpagosid und Harpagogenin untersucht.

Harpagosid zeigte eine antiphlogistische Wirksamkeit im Granulombeuteltest (i.p.: Eichler und Koch, 1970, p.o.: Erdös et al., 1978). Im Rattenpfotenödemtest zeigte die Verbindung weder nach p.o., i.v. noch i.p. Applikation eine Aktivität [Eichler und Koch, 1970; Erdös et al., 1978; Lanhers et al.; 1992]. Nur mittels eines Harpagosid-Konzentrates erzielte Erdös et al. (1978) eine schwache Wirkung in diesem Testsystem (p.o.). Eine antiphlogistische Wirkung konnte ebenfalls nicht im Formaldehyd-induzierten-Arthritistest gefunden werden [Eichler und Koch, 1970]. Untersuchungen zu der antiinflammatorischen Wirksamkeit verschiedener Iridoide im TPA-induziertem-Mausohrödemtest und Carrageenan-induziertem Mausohrödemtest zeigten, dass Harpagosid in beiden Testsystemen protektiven Effekt ausübt [del Carmen Recio et al., 1994].

Analgetisch wirksam war Harpagosid im Kaninchenohrtest [i.v. Eichler und Koch, 1970], im Brennstrahltest [p.o. Erdös et al., 1978] und im Writhing-Test nach i.p. Applikation [Lanhers et al., 1992]. Nach p.o und i.v. Verabreichung konnten Erdös et al. (1978) im Writhing-Test keine analgetische Aktivität nachweisen.

Sowohl Lanhers (1992) als auch Erdös (1978) waren davon überzeugt, das Harpagosid nicht der alleinige Wirkungsträger ist.

In-situ erzeugtes Harpagogenin war nach i.p. Gabe sowohl im Granulombeuteltest als auch bei der Formaldehyd-induzierten Arthritis wirksam. Im Rattenpfotenödemtest und im Kaninchenohrtest konnte keine Aktivität des in-situ erzeugten Harpagogenins ermittelt werden [Eichler und Koch, 1970].

Acteosid ist eine bekannte antiinflammatorisch wirkende Verbindung. Die Aktivität wurde jedoch nicht in Bezug auf *Harpagophytum procumbens* untersucht.

Murai et al. (1995) stellten fest, dass Acteosid, gewonnen aus *Plantago lanceolata* L., einen hemmenden Effekt auf das mit Arachidonsäure-induzierte Mausohrödem besitzt. Eine analgetische Wirkung im Writhing-Test konnte ebenfalls beobachtet werden [Nakamura, 1993; zit. in Murai et al., 1995].

1.1.6.2.3 Biochemische Testungen

In verschiedenen Testsystemen wurde der Wirkmechanismus des Extraktes untersucht.

Tippler et al. (1996) prüfte die Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade im Calcium-Ionophor stimulierten Vollblut durch zwei Extrakte mit unterschiedlichem Harpagosid-Gehalt (2.07 % und 7.3 %) und durch reines Harpagosid. Beide Extrakte konnten dosisabhängig die Cysteinyl-Leukotrien- und Thromboxan B₂-Synthese hemmen. Obwohl die Aktivität des Harpagosid reicheren Extraktes stärker ausgeprägt war, zeigte Harpagosid als Reinsubstanz eine geringere inhibierende Wirkung als die beiden Extrakte.

Im Rahmen der Untersuchungen von Loew et al. (2001) zeigte ein Harpagosid haltiger Extrakt eine Hemmung der Cysteinyl-Leukotrien-Synthese, während Harpagosid freie Fraktionen und reines Harpagosid keinen Effekt auf diese Freisetzung ausübten. Ebenso konnten die Cysteinyl-Leukotrien-Konzentrationen im Blut nach oraler Aufnahme des Harpagophytum-Extraktes verringert werden.

Moussard et al. (1992) und Whitehouse et al. (1983) konnten eine Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch den Extrakt nicht beobachten. Moussard (1992) konnte eine Verringerung von Arachidonsäuremetaboliten im Serum gesunder Probanden nach der

Einnahme von Teufelskralle (21 Tage, 4 x 500 mg Extrakt) nicht feststellen. Untersuchungen von Whitehouse (1983) zeigten, dass ein hochdosierter Extrakt die Prostaglandin-Synthetase nicht inhibiert.

Benito et al. (2000) untersuchte die hemmende Aktivität verschiedener aus *Scrophularia scorodonia* isolierter Iridoide, zu denen auch Harpagosid und Harpagid gehörte, auf die Cyclooxygenase und Lipoxygenase. Harpagosid und Harpagid verminderten zwar die PGE₂- und LTC₄-Freisetzung in Ionophor stimulierten Mausmakrophagen, diese Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant. Während Harpagosid signifikant die TXB₂-Freisetzung verminderte (IC₅₀ 10 µM), zeigte Harpagid dort keinen signifikanten Effekt. Es konnte weiterhin für beide Substanzen kein cytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

Ein von Lipopolysacchariden gereinigter Harpagophyti radix Extrakt konnte die Freisetzung von TNFα aus LPS-stimulierten humanen Monozyten dosisabhängig hemmen. Eine Hemmung der IL-6-, IL-1β- und PGE₂-Freisetzung aus stimulierten Monozyten konnte nur in höheren Dosierungen erreicht werden. Harpagosid und Harpagid zeigten keinen Effekt auf die TNFα-Freisetzung [Fiebich et al., 2001].

In vitro Studien mit dem Präparat Jucurba[®] zeigen, dass der Extrakt der Teufelskrallenwurzel die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) herabsetzt, die Umwandlung der inaktiven in die aktiven MMP unterbindet und die aktiven MMP blockiert [zit. von Caesar, 2001].

Übersichtsartikel über Phenylethanoide zeigen deutlich, dass Acteosid und auch Isoacteosid viele Wirkqualitäten besitzen [Jiménez und Riguera, 1994; Cometa et al., 1993]. Dabei weisen sie auch Aktivitäten auf, die in der Therapie degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen eine Rolle spielen. Acteosid hemmt die Protein-Kinase C und zeigt antioxidative und analgetische Effekte [Jiménez und Riguera, 1994]. Ravn et al. (1990) stellten weiterhin fest, dass Acteosid die 5-Lipoxygenase und cAMP-Phosphodiesterase hemmt. Die Hemmung der 5-Lipoxygenase konnte von Kimura et al. (1997) bestätigt werden. Isoacteosid hemmt ebenfalls die 5-Lipoxygenase [Nishimura et al., 1990] und weist eine antioxidative Aktivität auf.

Auch viele Flavonoide zeigen eine antiinflammatorische Aktivität. Untersuchungen von Tordera et al. (1994) weisen darauf hin, dass unter anderem Fisetin, Kämpferol und Luteolin die Freisetzung von β-Glucuronidase und Lysozym aus neutrophilen Granulozyten (Ratte)

hemmen. Weiterhin gehören diese drei Verbindungen zu den Flavonoiden, die auch die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Neutrophilen signifikant unterbinden.

1.1.6.2.4 Unerwünschte Wirkungen und Toxikologie

	Tier	Extrakt	Ergebnisse
ALBUS (1953) [zit. in Czygan, 1987]	Maus	Fluidextrakt	p.o.: 220 mL/kg i.v.: 34 mL/kg
ZORN (1958)	Ratte	Decoct	s.c.: 2 mL führt zum Tod
ERDÖS et al. (1978)	Maus	Verschiedene Extrakte Harpagosid-Konzentrat	p.o.: LD ₀ > 4650 mg/kg i.v.: LD ₀ > 1000 mg/kg p.o.: LD ₀ > 4650 mg/kg i.v.: LD ₀ > 395 mg/kg i.v.: LD ₅₀ > 511 mg/kg
VANHAELEN et al. (1981) [zit. in Vanhaelen, 1986]	Maus	Harpagosid Harpagid	i.p.: LD ₅₀ 1 g/kg i.p.: LD ₅₀ 3.2 g/kg
WHITEHOUSE et al. (1983)	Maus Ratte	Wurzelextrakt	p.o.: LD ₀ > 13.5 g/kg p.o.: LD ₅₀ > 13.5 g/kg p.o.: 21 Tagen, 7.5 g/kg keine pathologischen Effekte p.o.: 7 Tage, 2 g/kg keine Veränderung der Leberwerte

Tab. 1.1.6-1 Toxikologische Untersuchungen von Harpagophyti radix

Nach Mehnert (Kap. 1.1, S.1; Volk, 1964) wurde die „Harmlosigkeit“ des Harpago-Tees durch Ärzte überprüft. Im Rahmen der klinischen Studien konnte diese Aussage bestätigt werden. Die Droge war sehr gut verträglich. Gelegentlich traten Nebenwirkungen wie Magenbeschwerden, Übelkeit, Diarrhoe und erhöhte Transpiration auf [Wegener, 1998]. Bei einer Person mit beruflicher Dauerexposition konnten allergische Reaktionen beobachtet werden. Die gastrointestinalen Beschwerden könnten durch die in der Droge enthaltenen Bitterstoffe hervorgerufen werden. Infolge dieser Inhaltsstoffe ist Harpagophyti radix bei Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren kontraindiziert.

Nach verschiedenen toxikologischen Untersuchungen an Ratten und Mäusen kann Harpagophyti radix als nicht toxisch betrachtet werden. Eine Zusammenfassung der bisher durchgeführten Studien liefert Tabelle 1.1.6-1.

1.1.6.2.5 Pharmakokinetik

Soulimani et al. beschäftigten sich 1994 mit der Pharmakokinetik eines Harpagophyti radix Extraktes. Sie behaupteten auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen, dass die Wirksamkeit des Extraktes durch orale Applikation infolge des sauren Magensaftes verloren geht.

Loew et al. (1996) berichteten von einer geringen Bioverfügbarkeit von Harpagosid im systemischen Kreislauf. Nach der oralen Gabe von 600 mg Teufelskrallen-Extrakt (7.3 % Harpagosid) konnten nach 2 Stunden maximale Blutspiegel von 15.4 ng/mL gemessen werden.

Wie bereits in Kapitel 1.1.6.2.3 (S.20) erwähnt, untersuchten Loew et al. (2001) die Cysteinyl-Leukotrien-Freisetzung auch *in vivo*. Dabei stellten sie fest, dass maximale Harpagosid Blutspiegel nach 1.3 – 2.5 h erreicht worden sind.

1977 war man der Meinung [Ghisalberti, 1998], dass Iridoide auf Grund der Instabilität im sauren Milieu [Hänsel et al., 1999] pharmakologisch inaktiv wären. Untersuchungen von Chrubasik (1997) und Loew et al. (1996) zeigen jedoch, dass Harpagosid sowohl im künstlichen Magensaft als auch im künstlichen Darmsaft 3 bzw. 6 Stunden stabil blieb.

Es wurden weitere Studien mit verschiedenen Iridoiden durchgeführt [Jiménez und Riguera, 1994], die darauf hin deuteten, dass Iridoidglykoside als Prodrugs agieren. Um zu sehen, welche Metabolisierungsprodukte entstehen können, inkubierten Baghdikian Harpagosid, Harpagid und 8-PCHG mit humanen, intestinalen Bakterien [Baghdikian et al., 1999] bzw. mit Ammoniak und Salzsäure. In beiden Fällen entstand aus den Iridoidglykosiden das Pyridinmonoterpenalkaloid Aucubinin B. Bei der Verwendung von Ammoniak und Salzsäure entstand neben Aucubinin B noch Beatrin A und B, ebenfalls Pyridinmonoterpenalkaloide. Die Umsetzung zu Alkaloiden konnte auch für andere Iridoide gezeigt werden [Ghisalberti, 1998].

1.2 **Rheumatische Erkrankungen**

Unter dem Begriff „Rheuma“ werden eine Reihe von Erkrankungen zusammengefasst, die sich am Stütz- und Bindegewebe des Bewegungsapparates manifestieren und häufig eine systemische Beteiligung des Bindegewebes innerer Organe aufweisen [Pschyrembel, 1994]. Zu den Leitsymptomen gehören Schmerzen und eingeschränkte Bewegungsfähigkeit („Morgensteife“).

1.2.1 BEDEUTUNG DER ELASTASE IM RHEUMATISCHEN GESCHEHEN

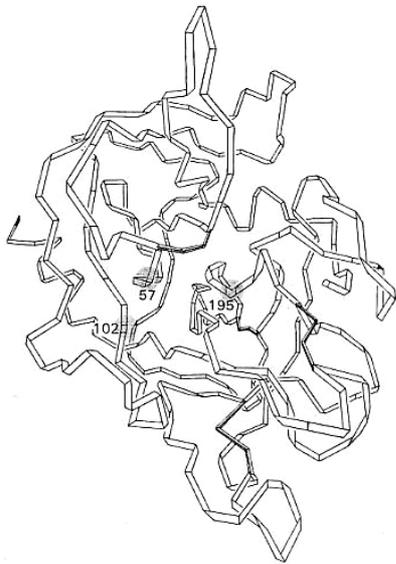


Abb. 1.2.1-1 Struktur der Elastase mit der katalytische Triade aus Histidin57, Aspartat102, Serin195 [Streyer, 1994]

Die Elastase ist eine Endopeptidase und gehört zu der „Chymotrypsin-Familie“ der Serinproteasen. Sie besteht aus einer Polypeptidkette aus 218 Aminosäuren und 4 Disulfidbrücken. Da ebenfalls neutrale Zucker vorhanden sind, gehört das Enzym zu der Gruppe der Glykoproteine. Das katalytische Zentrum dieses Enzyms wird aus 3 wasserstoffbindenden Aminosäureresten (His57, Asp102, Ser195) gebildet [Deshun und Sadler, 1998]. In dieser katalytischen Triade werden Peptidbindungen gespalten, die eine kleine, ungeladene Seitengruppe tragen. Dazu greift die Hydroxylgruppe des Serins den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung an. Es bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand, der von einer Protonenübertragung auf das Histidin begleitet wird. Dieses Proton wird im nächsten

Schritt an die Aminkomponente des Substrates abgegeben, wodurch das Molekül gespalten wird und die Aminokomponente entlassen wird. Die Regenerierung des Enzyms erfolgt über die Deacylierung des Serins [Streyer, 1994].

Das oben beschriebene Strukturmerkmal trifft auf viele Proteine zu. Deswegen weist die Elastase eine große Anzahl natürlicher, endogener Substrate auf. Dazu gehören neben Elastin unter anderem Kollagen, Knorpelproteoglykane, Immunglobuline, Komplementfaktoren und Gerinnungsfaktoren [Travis et al., 1979; Deshun und Sadler, 1998].

Die Elastase ist sowohl im Pankreas als auch in Leukozyten (Neutrophile Granulozyten) und Makrophagen lokalisiert. Die Pankreas-Elastase spielt beim Verdauungsvorgang eine Rolle. Für das antiinflammatorische Geschehen ist die Aktivität der „leukozytären“ Elastase von Bedeutung.

Das Zielgewebe dieser Elastase ist unter anderem der Gelenkknorpel, der aus Kollagenfasern mit eingelagerten Proteoglykanen besteht und ein reibungsloses Gleiten der Knochen gewährleistet. Im physiologischen Zustand spielt die Elastase mit anderen lysosomalen Enzymen eine Rolle beim Auf- und Abbau von Geweben [Metz und Peet, 1999], Verdauung von Bakterien und Immunkomplexen, Wundreinigung und Leukozytenmigration [Deshun und Sadler, 1998]. Durch endogene Inhibitoren (α_1 -Proteinase-Inhibitor, α_2 -Makroglobulin), die mit der Elastase im Gleichgewicht stehen, wird ihre proteolytische Aktivität kontrolliert

[Travis et al., 1979]. Im Verlauf des rheumatischen Geschehens ist das Gleichgewicht zwischen der Elastase und den Inhibitoren durch eine Erhöhung der Elastase-Aktivität gestört. Die Ursache und der Ablauf des rheumatischen Geschehens ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Gesichert ist [Menninger et al, 1982; Steinmeyer, 1987], dass es im Verlauf der Entzündung zu einer Invasion von phagozytierenden, polymorphkernigen Leukozyten kommt. Infolge der Phagozytose setzen Neutrophile Granulozyten Entzündungsmediatoren und knorpelaggressive Enzyme, wie Kollagenase, Elastase, Kathepsin G, frei [Baggiolini et al., 1979]. Vorhandene Inhibitoren können auf Grund der massiven Freisetzung der Elastase deren gesamte Aktivität nicht mehr kompensieren.

Die Elastase greift Komponenten des Knorpelgewebes, das Kollagen und die Proteoglykane, proteolytisch an. Infolge dessen kommt es zu einer Aufweichung und Destruktion des Knorpels. Angrenzendes Knochengewebe wird ebenfalls zerstört [Menninger et al., 1982]. Unter dem Einfluss des Entzündungsgeschehens beginnt das Synovialgewebe zu wuchern. Es bildet ein Granulationsgewebe aus, das als Pannus bezeichnet wird. In der Grenzschicht zwischen Granulationsgewebe und Knorpel konnten mikroskopisch Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden, in denen die Elastase vorhanden war.

Die Bedeutung der Elastase in der rheumatischen Therapie ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren auch noch keine antirheumatischen Wirkstoffe, deren Hauptmechanismus die Elastaseinhibierung ist.

In vitro-Testsysteme zur Untersuchung der Elastase inhibierenden Wirkung stehen bereits zur Verfügung. Ein Assay, der von Melzig et al. (1999) übernommen worden ist und mit dessen Hilfe der Extrakt und einige Inhaltsstoffe von *Harpagophytum procumbens* untersucht worden sind, wird in Kapitel 4 (S.122) näher beschrieben.

1.2.2 ARACHIDONSÄUREKASKADE

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 (S.25) beschrieben, werden neben Enzymen auch Entzündungsmediatoren im Laufe des rheumatischen Geschehens freigesetzt. Ein großer Teil dieser Mediatoren wird über den Arachidonsäureweg gebildet (Abb. 6.1.1, S.188).

Die Arachidonsäure ($\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure) ist in veresterter Form unter anderem Bestandteil von Membranphospholipiden. Infolge der Aktivierung der Phospholipase A₂ durch verschiedene Reize (z.B. zellschädigende Noxen) wird die Arachidonsäure aus der Zellmembran freigesetzt. In Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus wird die Arachidonsäure

über den Cyclooxygenase- oder den Lipoxygenaseweg in unterschiedliche Metaboliten umgesetzt.

Die Cyclooxygenase ist mit einer Peroxidase Bestandteil der Prostaglandinsynthese. Dieser Enzymkomplex katalysiert die Entstehung des cyclischen Prostaglandin H_2 , aus dem im weiteren Verlauf die Prostaglandine, das Prostacyclin und das Thromboxan A_2 gebildet wird. Pathophysiologisch sind Prostaglandine am Schmerzgeschehen, an entzündlichen Prozessen und bei der Fieberentstehung beteiligt. Thromboxan A_2 besitzt neben einer vasokonstriktorischen eine plättchenaggregierende Wirkung.

Über Lipoxygenasen entstehen aus der Arachidonsäure durch den Einbau von Sauerstoff primär Hydroperoxyfettsäuren, die im nachfolgenden Schritt unter anderem zu Hydroxyfettsäuren umgesetzt werden. Die Bezeichnung 5-, 12- und 15-Lipoxygenase gibt die Angriffsposition der Lipoxygenase an der Arachidonsäure an. Dabei ist das Vorhandensein der jeweiligen Lipoxygenase gewebespezifisch. Eine erhöhte Aktivität der 5-Lipoxygenase konnte im Cytosol von Leukozyten (neutrophilen Granulozyten und Monozyten), Mastzellen und Makrophagen festgestellt werden. Infolge der Aktivierung durch Calcium, ATP und Hydroperoxiden wird das Enzym zu dem membranständigen Lipoxygenase-Activating-Protein (FLAP) transportiert. Dort wird die Lipoxygenase zur Oxygenierung der Arachidonsäure gebunden. Zunächst wird die 5S-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (5S-HPETE) gebildet, die über die LTA_4 -Synthase in das instabile Leukotrien A_4 (LTA_4) überführt wird. Aus dem Leukotrien A_4 können die Leukotriene B_4 - E_4 (LTB_4 - E_4) entstehen. Durch die Einwirkung der 12-Lipoxygenase entsteht aus der Arachidonsäure über 12-HPETE die 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE).

Die Leukotriene, 5-HETE und 12-HETE sind wie ein Teil der Cyclooxygenase-Produkte am Entzündungsgeschehen beteiligt. Sie haben eine ausgeprägte chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, Fibroblasten und Keratinozyten. LTB_4 bewirkt weiterhin eine Sensibilisierung von Nozizeptoren. Die Leukotriene C_4 - E_4 sind für eine Konstriktion der Gefäß-, Bronchial- und Darmmuskulatur verantwortlich.

1.3 Resorption

Die Verteilung eines Wirkstoffes im Körper nach oraler Applikation kann mit dem LADME-Modell beschrieben werden (Abb. 1.3-1). Nachdem der Wirkstoff aus der Arzneiform freigesetzt worden ist (Liberation), wird er durch biologische Membranen (z.B. Magendarmschleimhaut, Muskelgewebe) in den Körper aufgenommen (Absorption). Von der Blutbahn aus gelangt der Arzneistoff in verschiedene Gewebe und Organe (Distribution). Zum Teil unterliegt er in der Leber oder auch schon an der Darmwand einer Metabolisierungsreaktion. Lipophile Verbindungen werden z.B. in besser wasserlösliche überführt. Die Ausscheidung der Substanz (Exkretion) erfolgt über Niere, Galle, Darm, Lunge, Haut oder Speichel [Bauer et al., 1993].

Ein wesentlicher Schritt der Bioverfügbarkeit von Verbindungen stellt dabei die Aufnahme des Wirkstoffes aus dem Darmlumen in die Blutbahn über die Darmepithelzellen dar.

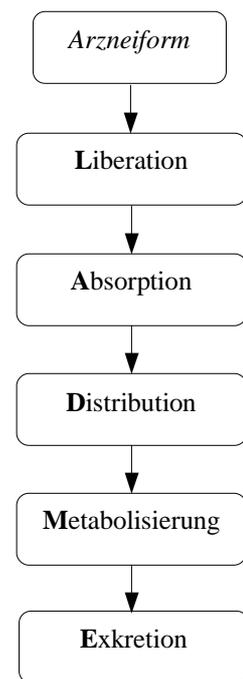


Abb. 1.3-1
LADME-Modell

1.3.1 GASTROINTESTINALE ABSORPTION

Im Dünndarm werden die meisten Nahrungsbestandteile und Arzneistoffe resorbiert. Für eine optimale Resorption ist die Dünndarmschleimhaut so strukturiert, dass eine große Oberfläche gebildet wird. Das geschieht durch die Auffaltung der Innenwand des Dünndarms, wodurch die Ring- bzw. Kerckringfalten entstehen. Sie ragen in das Darmlumen hinein (Abb. 1.3.1-1, oberes Bild, S.28). Diese Falten sind mit Zotten belegt, die die Oberfläche weiter vergrößern. Die Epithelschicht der Zotten wird hauptsächlich aus den Enterocyten (Saumzellen) gebildet. Verstreut befinden sich dort auch schleimbildende Becherzellen. Die Enterozyten tragen zum Lumen hin noch protoplasmatische Fortsätze, die als Microvilli bezeichnet werden. Die Zellen der Epithelschicht sind über Tight Junctions miteinander verbunden. Poren in diesen Kittleisten sorgen für eine gewisse paracelluläre Durchlässigkeit. Unterhalb der Zotten befindet sich ein Kapillarnetz, das die Zotten versorgt und die resorbierten Verbindungen aufnimmt.

Im Gegensatz zum Dünndarm besitzt der Dickdarm eine weitaus geringere Oberfläche (Abb. 1.3.1-2, S.28). Seine Schleimhaut besitzt keine Zotten und die Epithelschicht besteht

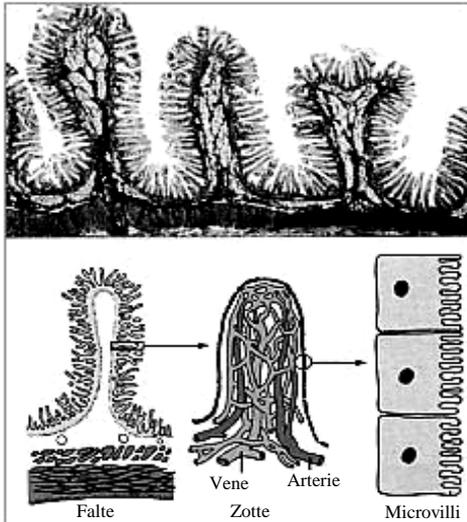


Abb. 1.3.1-1 Ausschnitt aus der Dünndarmschleimhaut (oben); Schema einer Falte, Darmzotte und Darmepithelzelle mit Microvilli [Scharf, K.-H. und Weber, W., 1987]

vorwiegend aus Becherzellen. Weiterhin weisen die Poren der Tight Junctions im Dickdarm (0.2-0.25 nm) einen geringeren Durchmesser auf als im Dünndarm (0.75-0.8 nm). Eine große Oberfläche und weite Porenradien sind im Dickdarm nicht notwendig, da in diesem Teil des Darmabschnittes die Resorption fast abgeschlossen ist. Hier wird lediglich der Darminhalt eingedickt und zur Bildung des Fäzes mit Schleim vermischt [Thews et al., 1999; Faller, 1988].

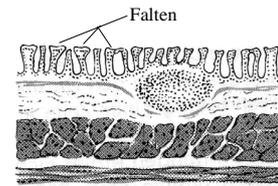


Abb. 1.3.1-2 Dickdarmwand [Leonhardt, H.; 1979]

1.3.2 TRANSPORTMECHANISMEN

Die erste Resorptionsbarriere im Dünndarm stellen nach den obigen Ausführungen somit die Enterozyten dar. Arzneistoffe und Nahrungsmittelbestandteile können diese Schicht auf unterschiedliche Weise passieren [Barthe et al., 1999; Yee und Day, 1999; Artursson et al., 1996; Abb. 1.3.1-3].

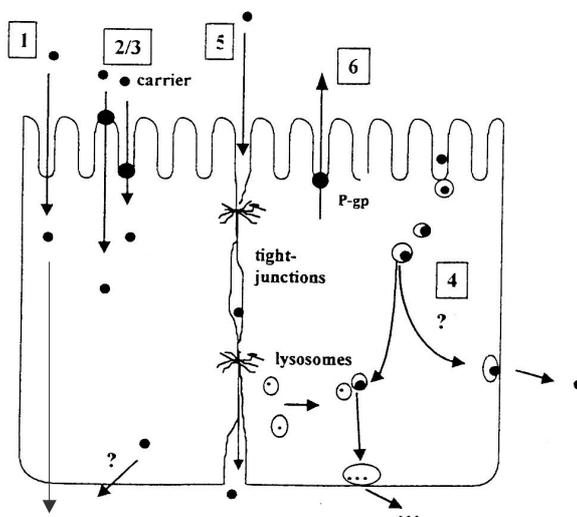


Abb. 1.3.1-3 Transportmechanismen in den intestinalen Epithelzellen [Barthe et al., 1999]

- (1) Passiv transcellulärer Transport
- (2/3) Carrier vermittelter Transport
- (4) Endo-/Exocytose
- (5) Passiv paracellulärer Transport
- (6) Efflux-Transport

Transcellulärer Transport (1)

Bei dem transcellulären Weg werden die Verbindungen passiv über die Membran transportiert. Die Absorptionsrate ist somit proportional zu der Arzneistoffkonzentration und zu der Oberfläche der Resorptionsbarriere. Dieser Mechanismus folgt dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz. Auf diesem Weg werden lipophile Substanzen mit einem geringen Molekulargewicht befördert. Die meisten Arzneistoffe werden passiv transcellulär transportiert.

Paracellulärer Transport (5)

Verbindungen, die passiv paracellulär transportiert werden, wandern zwischen den Enterozyten, durch die mit Wasser gefüllten Poren der Tight Junctions hindurch. Dieser Weg kann somit von kleinen hydrophilen Verbindungen genutzt werden. Da die Poren negative Ladungen aufweisen, permeieren kationische Verbindungen besser als anionische. Obwohl diese interzellulären Zwischenräume weniger als 1% der Oberfläche im Dünndarm ausmachen, erfolgt 90 % des Stoffaustausches über den paracellulären Weg [Thews et al., 1999]. Er ist ebenfalls für viele Wirkstoffe wichtig (z.B. Ranitidin, Atenolol, Acyclovir). Da im Dickdarm die Anzahl der Poren geringer ist und die Porenradien kleiner sind, ist die Absorptionsrate paracellulär transportierter Verbindungen im Dickdarm eingeschränkt [Yee und Day, 1999].

Bestimmte „Enhancer“ haben die Fähigkeit, die Tight Junctions zu öffnen und die Absorptionsrate paracellulär transportierter Verbindungen zu erhöhen [Kotzé et al., 1997; Tomita et al., 1994].

Carriervermittelter Transport (2/3)

Dieser Absorptionsweg ist abhängig von speziellen Proteinen, die sich in der Membran befinden und mit dem zu transportierenden Molekül eine reversible Bindung eingehen. Er kann aktiv oder passiv („erleichterte Diffusion“) vermittelt werden. Bei dem durch einen passiven Carrier vermittelten Transport ist die treibende Kraft wiederum der Konzentrationsgradient. Die Resorptionsgeschwindigkeit wird jedoch durch einen membranständigen Transporter erhöht [Thews et al., 1999]. Der aktive Transport benötigt Energie, um die Verbindung vom Lumen in das Zellinnere zu transportieren. Er kann gegen einen Konzentrationsgradienten arbeiten und ist für bestimmte Strukturmerkmale selektiv. Somit kann es zu einer Konkurrenz von ähnlich strukturierten Verbindungen um einen Transporter kommen. Ein weiteres Kennzeichen dieses Transportweges ist, dass er nur in

einer Richtung – meistens von der Mucosa zur Serosa - arbeitet. Da nur eine bestimmte Anzahl von Transportern zur Verfügung steht, ist dieser Mechanismus sättigbar. Viele kleinere, hydrophile Moleküle werden auf diesem Weg über die Zellmembran transportiert. Von den Arzneistoffen nutzen z.B. Cephalosporine, β -Laktam-Antibiotika und ACE-Hemmer diesen Transportweg.

Einige Verbindungen werden sowohl auf dem aktiven als auch auf dem passiven Weg transportiert. Bei geringen Konzentrationen überwiegt der aktive Transport, während bei hohen Konzentrationen der passive Weg vorherrscht [Yee und Day, 1999].

Endocytose / Exocytose (4)

Mittels der Endocytose werden Verbindungen, die die Zellmembran auf anderem Wege nicht passieren können, durch Einstülpung der Membran aktiv in die Zelle aufgenommen. Die Einstülpungen werden abgeschnürt und bilden innerhalb der Zelle Vesikel aus, in denen die Verbindungen transportiert werden. Bei der Exocytose verschmilzt die Vesikelmembran mit der Zellmembran und setzt so die aufgenommenen Substanzen wieder frei. Dieser Mechanismus wird häufig von großen Peptiden und Makromolekülen bevorzugt; z.B. unterliegt auch Vitamin B12 dieser Aufnahme in die Zelle.

Efflux-Transport (6)

Der Efflux-Transport stellt eine besondere Form des aktiven Transportes dar. Er ist abhängig von einer in der „brush border“ Membran der Enterozyten vorkommenden Pumpe, dem P-Glykoprotein. Es ist ein 140-170 kDa Membranprotein [Yee und Day, 1999], das unspezifisch, bereits in die Zelle aufgenommene Verbindungen aktiv wieder in das apikale Kompartiment befördert. Auf diese Weise wird der Transport und die Akkumulation von Substanzen in der Zelle verhindert. Das P-Glykoprotein kommt in verschiedenen Geweben (Gehirn, Niere, Galle, Darm, usw.) vor und schützt das Gewebe vor dem Eindringen von Xenobiotika. Eine sehr hohe Aktivität konnte man in Tumorzellen finden. Dort ist dieses Membranprotein für die Resistenz von Zytostatika verantwortlich. Der Transporter interagiert mit einer Reihe von lipophilen Verbindungen wie z.B. Verapamil, Vinblastin, Digoxin, Erythromycin. Somit kann das P-Glykoprotein die Absorption und damit die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen.

Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen sind humane Kolon-Karzinom-Zellen, die in Kultur spontan einen Monolayer ausbilden. Obwohl es sich um Kolon-Zellen handelt, ähneln sie in vielfacher Weise den Epithelzellen des Dünndarms. Aus diesem Grund kann man mit Hilfe dieser Zellen die Absorption und den Transport von Verbindungen *in vitro* untersuchen [Yee, 1997; Hilgers et al., 1990].

Das Zellsystem und entsprechende Untersuchungen von Inhaltsstoffen aus *Harpagophytum procumbens* wird in Kapitel 5 (S.147) beschrieben.

1.4 Zielsetzung

Klinische und tierexperimentelle Studien zeigen, dass die sekundäre Speicherwurzel von *Harpagophytum procumbens* eine antirheumatische und antiarthritische Aktivität aufweist. Die dem zu Grunde liegenden Mechanismen und die dafür verantwortlichen Verbindungen konnten jedoch noch nicht eindeutig bestimmt werden. Dass Harpagosid nicht der alleinige Wirkstoff ist, konnten die oben angeführten Untersuchungen zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Kenntnisse über das Inhaltsstoffspektrum von *Harpagophytum procumbens* und möglichst auch *Harpagophytum zeyheri* erweitert werden. Die Struktur bereits bekannter Verbindungen soll mit modernen spektroskopischen Methoden bestätigt werden. Mit Hilfe analytischer Methoden, wie HPLC und CE, soll die Zusammensetzung eines Extraktes näher charakterisiert und die vorhandenen Signale möglichst vollständig zugeordnet werden können. Bisher geschah das nur für die Signale des Harpagosids und des 8-PCHGs. Mit beiden Methoden soll auch eine Quantifizierung der isolierten Verbindungen ausgearbeitet werden.

Weiterhin soll der Mechanismus der antiinflammatorischen Aktivität des Extraktes näher untersucht werden. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein Extrakt von *Harpagophytum procumbens* die TNF α -Freisetzung aus stimulierten Monozyten hemmt [Fiebich et al., 2001]. Die Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch den Extrakt wurde ebenfalls bereits nachgewiesen [Tippler et al., 1996; Loew et al., 2001; Moussard et al., 1992; Whitehouse et al., 1983]. Die Ergebnisse dazu sind jedoch nicht einheitlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf Grund dessen die Hemmung der Arachidonsäurekaskade noch einmal durch Inhibierung von Lipoxygenasen und Phospholipase A₂ bestimmt. Als weiteres antirheumatisches Prinzip wird die inhibierende Wirkung des Extraktes und einiger Inhaltsstoffe auf die Elastase Aktivität überprüft.

Zu der Pharmakokinetik des Teufelskrallen-Extraktes liegen bisher nur wenige Studien vor. Mit Hilfe eines *in vitro*-Systems (Caco-2-Zellsystem) sollen die Erkenntnisse zur Resorption und zu Transportmechanismen der Inhaltsstoffe erweitert werden.

2 Phytochemische Untersuchungen eines Teufelskrallenwurzelextraktes

2.1 Qualitative Methoden zur Charakterisierung des Extraktes

2.1.1 AUSGANGSMATERIAL

Für die phytochemischen Untersuchungen wurde ein wässriger Extrakt aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* DC. verwendet. Die Herstellung des Extraktes wird in Kapitel 8.1.1 näher beschrieben.

2.1.2 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

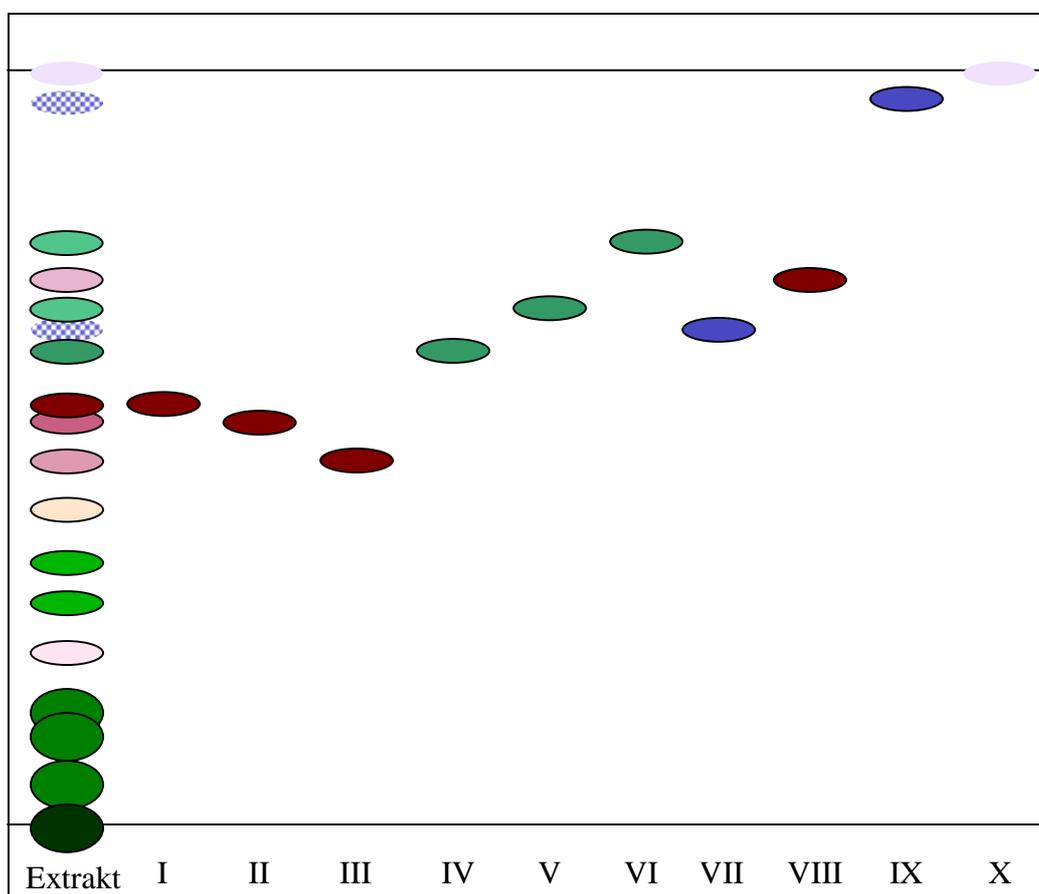


Abb. 2.1.2-1 Dünnschichtchromatogramm des Teufelskrallen-Extraktes (20mg/mL) und der isolierten Verbindungen (ca. 1mg/mL) gelöst in 50 % Methanol: Harpagosid (I), 8-PCHG (II), 8-Feruloylharpagid (III), Isoacteosid (IV), Acteosid (V), 6'-O-Acetylacteosid (VI), Pagosid (VII), 8-O-Cinnamoylmyoporosid (VIII), Kaffeesäure (IX), Zimtsäure (X); Mobile Phase 1 (Kap.

Zur ersten Charakterisierung des Extraktes und der daraus gewonnenen Fraktionen wurde ein dünnschichtchromatographisches System mit Ethylacetat, Ameisensäure, Wasser als mobile

Phase und Kieselgel als stationäre Phase entwickelt. Detektiert wurde mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Kap. 9.1.1, S.207). Mit dem hohen Wasseranteil im Fließmittel ist es möglich, sowohl die enthaltenen Phenylethanoide und Iridoide zu identifizieren, als auch die Zuckerbestandteile des Extraktes zu beobachten. Die isolierten Verbindungen werden an Hand ihrer R_f -Werte und der Färbungen mit dem Detektionsmittel zugeordnet.

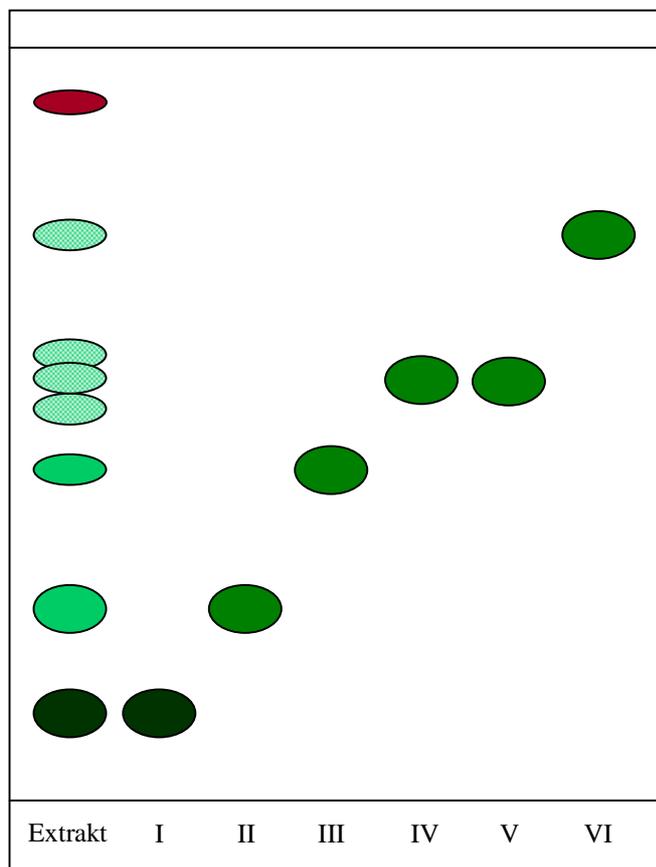


Abb. 2.1.2-2 Dünnschichtchromatogramm des Zuckeranteils des Teufelskrallen-Extraktes (20mg/mL); Stachyose (I), Raffinose (II), Saccharose (III), Glucose (IV), Fructose (V), Rhamnose (VI); Mobile Phase 2 (Kap. 9.1.1, S. 207)

Im unteren R_f -Bereich (Abb. 2.1.2-1, S.33) befinden sich die Kohlenhydrate, die sich mit Anisaldehyd-Schwefelsäure grün anfärben. Das Tetrasaccharid Stachyose verbleibt bei der gewählten Zusammensetzung des Fließmittels in der Auftragzone. Raffinose, ein Trisaccharid, befindet sich oberhalb der Stachyose. Mit einem höheren R_f -Wert als Raffinose folgen Saccharose und weiterhin Monosaccharide. Zur näheren Charakterisierung des polaren Bereiches des Extraktes wurde ein weiteres Fließmittelsystem aus Ethylacetat, Methanol, Essigsäure und Wasser (Kap. 9.1.1, S.207) entwickelt. Dadurch können Zuckerbestandteile durch den Vergleich mit authentischen Proben identifiziert werden (Abb. 2.1.2-2).

Stachyose mit einem R_f -Wert von 0.12 ist dominierend im Kohlenhydratspektrum. Auf Höhe der Raffinose (R_f 0.26) ist eine schwache Zone im Extrakt zu erkennen. Auf Höhe der Saccharose (R_f 0.44) ist eine deutlichere Zone zu sehen. Bei einem R_f Wert von 0.56 liegen die Zonen der Glucose und Fructose, die bei diesem Fließmittel nicht getrennt werden können. In diesem Bereich liegen im Extrakt 3 grünlich gefärbte Zonen vor, bei denen vermutet werden kann, dass sich hier die Zone der beiden Monosaccharide (Glucose, Fructose) befindet. Eine Xylose-Zone (R_f 0.67) kann im Extrakt nicht detektiert werden, während sich auf Höhe der Rhamnose (R_f 0.75) eine schwache Bande befindet. Die Auswahl der aufgetragenen Vergleichssubstanzen richtete sich nach der Dissertation von Stierstorfer (1961), wonach nur niedermolekulare Zuckerbestandteile in

Harpagophyti radix gefunden werden konnten. Stachyose nimmt dabei den Hauptanteil ein. Die von Stierstorfer isolierten Zucker können in dem hier bearbeiteten Extrakt mittels Dünnschichtchromatographie wiedergefunden werden.

In dem höheren R_f -Bereich (Abb. 2.1.2-1, S.33) fällt die stark rot gefärbte Zone des Harpagosids auf, der Leitsubstanz des Extraktes. Darunter mit einem R_f -Wert von 0.53 liegt die schwach rot gefärbte Zone des 8-PCHGs und bei 0.49 die ebenfalls rote Bande des 8-Feruloylharpagids. Die Phenylethanoide fallen durch ihre grünliche Färbung in einem R_f -Bereich von 0.63 – 0.77 auf. Die blaue Zone des Pagosids kann in dem Chromatogramm des Extraktes nicht beobachtet werden, da sie von Acteosid und Isoacteosid überdeckt wird. Außerdem kann Zimtsäure nahe der Fließmittelfront wiedergefunden werden.

Ein Fließmittel mit einem höheren Anteil von Ethylacetat (Ethylacetat 30 / HCOOH 2 / Wasser 3) wurde von Jürgenliemk im Rahmen seiner Dissertation (2001) zur Detektion von Flavonoiden verwendet. Im Vergleich zu seiner flavonoidreichen Fraktion können nach Besprühen mit Naturstoffreagenz in dem Harpagophyti radix Extrakt die gelb bis orange fluoreszierenden Zonen von Quercitrin-, Isoquercitrin- und Rutinderivaten nicht detektiert werden. Im Bereich der Flavonoid-Aglyka sind ebenfalls keine Zonen zu erkennen.

2.1.3 HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die HPLC stellt eine weitere Möglichkeit dar, den Extrakt zu charakterisieren und dessen Hauptinhaltsstoffe zu quantifizieren. Da sie genauere und reproduzierbarere Ergebnisse liefert als die kolorimetrische Messung der Iridoide nach Haag-Berrurier [zit. Sticher et al., 1980] und weniger aufwendig ist als die gaschromatographische Bestimmung [Vanhaelen et al., 1981], hat sich die HPLC als Standardmethode zur Untersuchung der Extrakte der Teufelskrallenwurzel etabliert. Das Ph.Eur. 2001 verwendet eine Methode von Sticher et al. (1980) und nutzt ein isokratisches System mit Methanol und Wasser als Fließmittel. Dieses System wird zur Identifizierung und Quantifizierung des Harpagosids verwendet, weist aber in Bezug auf die anderen Inhaltsstoffe eine nur unbefriedigende Trennung auf. Die Trennung des Extraktes verbessert sich durch Nutzung eines Gradienten [Eich et al., 1998; Chrubasik et al., 1996]. Es konnten jedoch nur Harpagosid, 8-PCHG und Zimtsäure zugeordnet werden [Baghdikian et al., 1997; Chrubasik et al., 1996].

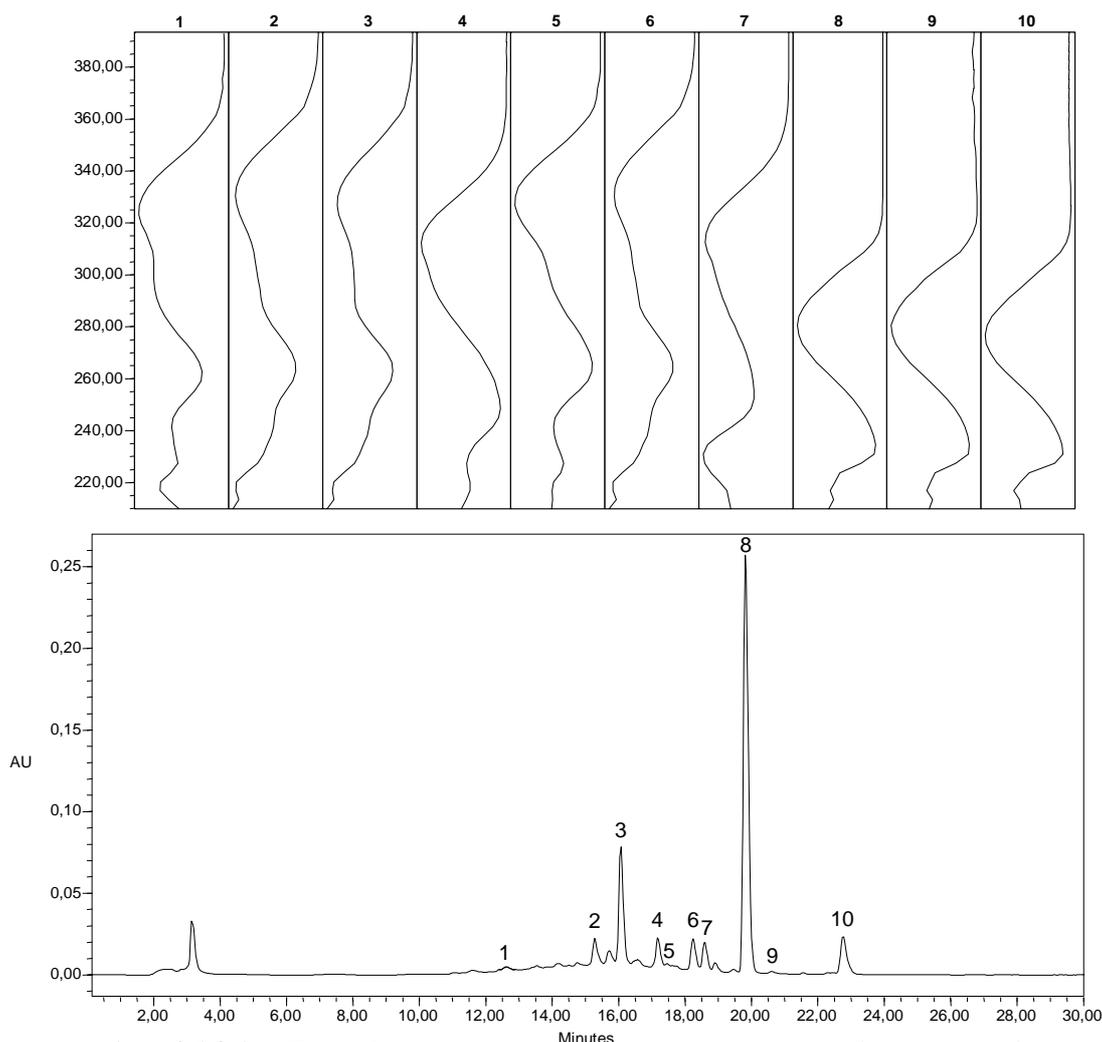


Abb. 2.1.3-1 HPLC-Chromatogramm des Extraktes von *Harpagophytum procumbens* DC. bei 280 nm; Kaffeesäure (1), Acteosid (2), Isoacteosid (3), 8-PCHG (4), 8-O-Feruloylharpagid (5), 6'-O-Acetylacteosid (6), Pagosid (7), Harpagosid (8), 8-Cinnamoylmyoporosid (9), Zimtsäure (10)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur qualitativen Überprüfung des Extraktes ein Gradient aus Acetonitril und 0.1 % TFA entwickelt und bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert (Kap. 9.1.2.1, S.208). In diesem Chromatogramm kann man 10 Peaks erkennen, die innerhalb von 23 min basisliniengetreunt werden. Nach der weiteren Aufarbeitung des Extraktes und Isolierung der Verbindungen können den Peaks die entsprechenden Substanzen (Abb. 3.4-1, S.121) zugeordnet werden (Abb. 2.1.3-1). In dem chromatographischen Bild dominiert bei dieser Wellenlänge Harpagosid (R_t 19.8 min). Eine Wellenlänge von 330 nm eignet sich besser zur Detektion der Phenylethanoide. Hier stellt Isoacteosid das höchste Signal dar.

	Verbindung	Retentionszeit [min]
1	Kaffeesäure	12.3
2	Acteosid	15.3
3	Isoacteosid	16.1
4	8-PCHG	17.2
5	8-Feruloylharpagid	17.4
6	6'-O-Acetylacteosid	18.2
7	Pagosid	18.7
8	Harpagosid	19.8
9	8-O-Cinnamoylmyoporosid	20.5
10	Zimtsäure	22.8

Tab. 2.1.3-1 Retentionszeiten der isolierten Verbindungen aus *H. procumbens* DC.

2.1.4 KAPILLARELEKTROPHORESE (CE)

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung des Extraktes besteht in der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Inhaltsstoffe. Diese relativ neue analytische Methode gewinnt immer mehr an Bedeutung bei der Analyse von Extrakten und Substanzgemischen, da sie einige Vorteile gegenüber der HPLC aufweist. Die Vorteile liegen in der kürzeren Analysendauer, in der geringeren Probenmenge und dem geringeren Lösungsmittelverbrauch. Außerdem ist die Trennleistung (theoretische Bodenzahl) äußerst hoch.

Für die Auftrennung des gesamten Extraktes von *Harpagophyti radix* mittels Kapillarelektrophorese wurde bislang noch keine Methode beschrieben. Sturm et al. beschäftigten sich mit der Analyse der Iridoidglykoside [Sturm et al., 1999], während Wu et al. [Hsin-Kai et al., 1998] ein Iridoidgemisch untersuchten, in dem Harpagosid enthalten war. Für die Trennung des zu untersuchenden Extraktes wird eine 57 cm lange Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm (Kap. 9.2, S.215) verwendet. Ein Puffer bestehend aus 100 mM di-Natriumtetraborat und eine angelegte Spannung von 30 kV erweist sich dabei als optimal für die Trennung der Hauptinhaltsstoffe von *Harpagophytum procumbens* DC.

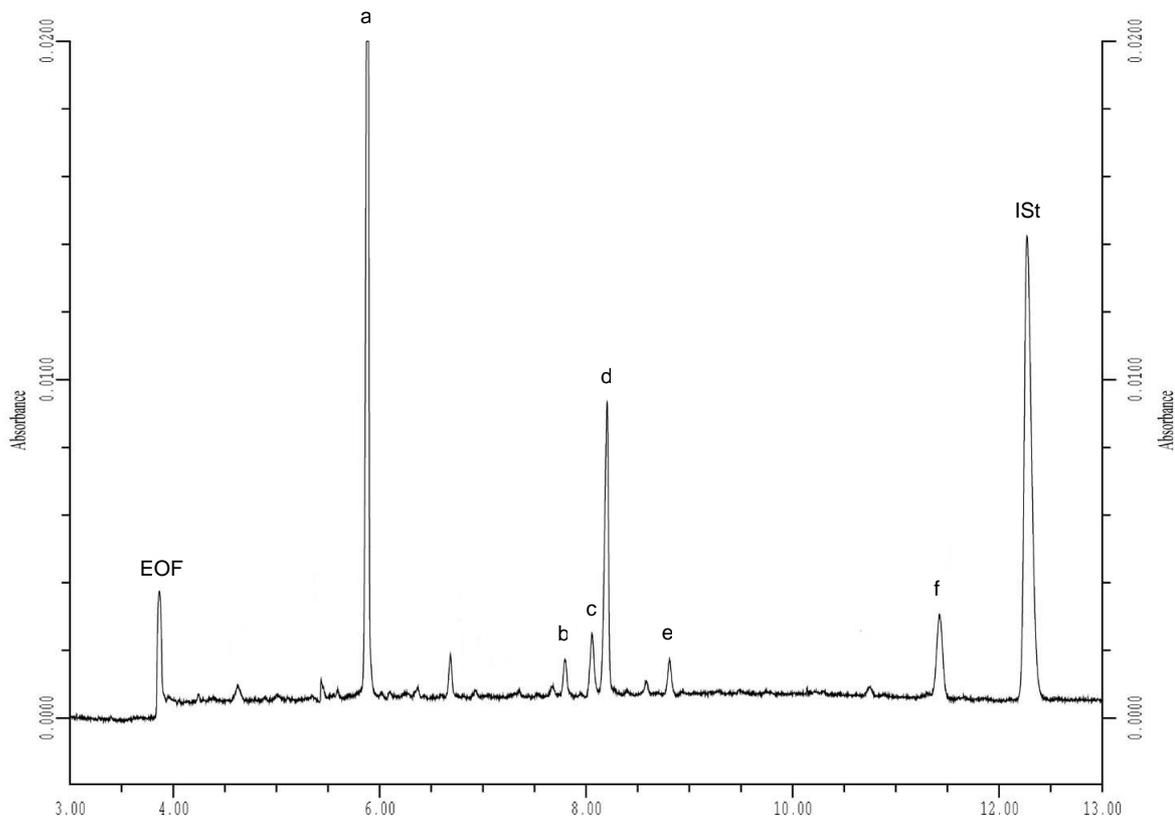


Abb. 2.1.4-1 Elektropherogramm des Harpagophyti radix Extraktes (280 nm); Harpagosid (a), 8-PCHG (b), 6'-O-Acetylacteosid (c), Isoacteosid / Acteosid (d), Pagosid (e), Zimtsäure (f), Interner Standard (ISt)

Dieser Trennpuffer stellt das Ergebnis einer längeren Reihe verschiedener systematischer Optimierungsversuche dar:

Erniedrigt man die Spannung von 30 kV auf 20 kV, verlängert sich die Laufzeit. Die Migrationszeit von Harpagosid erhöht sich dadurch von 6.17 min auf 10.45 min. Diese Veränderung hat jedoch keine verbesserte Trennleistung zur Folge, weswegen bei weiteren Untersuchungen eine Spannung von 30 kV beibehalten wird. Eine Veränderung des Boratpuffers durch Erhöhung oder Erniedrigung der Boratkonzentration bringt ebenfalls keine Vorteile. Durch eine Erniedrigung der Boratkonzentration (25-75 mM) verkürzt sich zwar die Analysendauer, jedoch verschlechtert sich die Auflösung. Einige Peaks, die mit einer höheren Boratkonzentration getrennt werden können, fallen dort zusammen. Eine Erhöhung des Boratpuffers auf 125 mM oder 200 mM verlängert nur die Laufzeit (7.99 min bzw. 16.59 min für Harpagosid) ohne Verbesserung der Trennleistung. Auch eine Erhöhung des pH-Wertes durch Zusatz von Borsäure oder der Zusatz von SDS (25 mM Boratpuffer + 60 mM SDS)

verbessert die Trennleistung nicht. Die kürzeren Analysenzeiten haben wiederum nur eine schlechtere Trennung zur Folge.

In dem Elektropherogramm des Extraktes (Abb. 2.1.4-1, S.38) sind bei einer Wellenlänge von 280 nm mehrere Peaks zu sehen, von denen durch Koelution sechs Signale den isolierten Verbindungen zugeordnet werden können. Bei der Zuordnung der Verbindungen fällt auf, dass sich die Stellungsisomeren Isoacteosid und Acteosid in diesem System nicht auftrennen lassen. Beide erscheinen bei einer Migrationszeit von 9.5 min. Dieses Problem trat ebenfalls im Verlauf der Arbeit von Fler (2000) bei der Trennung der Phenylethanoide von *Plantago lanceolata* L. auf. Durch die Einführung eines negativ geladenen Cyclodextrins (Heptakis-6-sulfato- β -Cyclodextrin) als pseudostationäre Phase und gleichzeitiger Umpolung (Detektion an der Anodenseite) der Kapillarelektrophorese konnte mit einem Phosphorsäurepuffer (25 mM H₃PO₄, auf pH 3 mit NaOH) eine Trennung von Acteosid und Isoacteosid erzielt werden. Der geringe Nutzen rechtfertigt hier nicht den deutlichen Mehraufwand, der mit erheblichen Kosten und einem hohen Zeitaufwand verbunden ist.

Da bei der CE-Methode die Trennung durch Ladung und Masse der Verbindungen bestimmt wird und nicht wie bei der HPLC-Methode durch Adsorptions- und Verteilungsvorgänge, erschienen die Substanzen in einer anderen Reihenfolge als bei der HPLC. Die Migrationszeiten sind in Tabelle 2.1.4-1 aufgeführt.

Das Ergebnis bestätigt einige der oben genannten Vorteile der CE-Methodik. Die Analysendauer ist kürzer als bei der HPLC (12 anstatt 23 min) und der Verbrauch an Lösungsmittel und Substanzen ist ebenfalls geringer. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten ist zufriedenstellend. Bei genauer Betrachtung des Elektropherogramms (Abb. 2.1.4-1, S.38) kann man einige noch nicht zugeordnete Signale erkennen, die im HPLC-Chromatogramm wahrscheinlich überdeckt werden. Das spricht für die gute Auflösung dieser Methode. Nachteilig ist die geringe Massensensitivität der CE-Methode und die nicht vorhandene Trennung von Acteosid und Isoacteosid bei dem verwendeten Puffer. Zur vollständigen Quantifizierung von *Harpagophytum procumbens* ist die HPLC aus diesen Gründen der CE-Methode vorzuziehen. Durch die verkürzte Analysendauer und die gute Trennung der Iridoide

	Verbindung	Migrationszeit [min]
a	Harpagosid	5.8
b	8-PCHG	7.8
c	6'-O-Acetylacteosid	8.0
d	Isoacteosid / Acteosid	8.2
e	Pagosid	8.9
f	Zimtsäure	11.4

Tab. 2.1.4-1 Migrationszeiten der Inhaltsstoffe aus *Harpagophyti radix*

wäre diese Methode optimal zur Bestimmung des Harpagosid-8-PCHG-Quotienten und zum Schnell-Screening von Pflanzenmaterial.

2.2 Quantitative Methoden zur Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe

Zur Überprüfung der Qualität eines Extraktes ist es nicht nur notwendig zu wissen, aus welchen Verbindungen der Extrakt sich zusammensetzt, sondern auch in welcher Menge diese Verbindungen im Extrakt vorliegen. Niedrige Konzentrationen können zum Beispiel auf schlechte Extraktion, Abbaureaktionen durch unsachgemäße Lagerung oder Verschnitte hindeuten. Zu hohe Konzentrationen von Inhaltsstoffen können durch Verfälschung mit anderen Arten zu Stande kommen. Bei einer höheren Konzentration von 8-PCHG in dem Extrakt von *Harpagophyti radix* kann z.B. eine Verfälschung mit *Harpagophytum zeyheri* vorliegen.

In bisherigen Veröffentlichungen wurden in der Regel nur die Iridoide und davon das Harpagosid, das für die Wirkung des Extrakts verantwortlich sein soll, quantifiziert. Für die Quantifizierung wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Pourrat et al. (1985) bestimmten spektralphotometrisch nach Umsetzung mit Godin's Reagens den Gesamt-Iridoidgehalt von Extrakten. Vanhaelen et al. (1981) entwickelten ein gaschromatographisches System zur parallelen Bestimmung von Harpagosid und Harpagid. Eine HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Harpagosid im Extrakt wurde von Poukens-Renwart et al. (1996) entwickelt. Der Vergleich mit einer HPLC-Methode bestätigte die Genauigkeit dieser Quantifizierungsmethode.

Zur schnellen und genauen Bestimmung hat sich mittlerweile jedoch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgesetzt [Erdös et al., 1978; Sticher et al., 1977; Meier et al., 1977; Sticher, 1977; Guillerault et al., 1994]. Sticher et al. (1980) verwendeten ein isokratisches HPLC-System zur Abtrennung von Harpagosid von anderen Bestandteilen des Extraktes. Diese Methode verwendet auch das Ph.Eur. 2001 zur Gehaltsbestimmung. Durch Verwendung von linearen Gradienten ist es auch möglich, Harpagid und 8-PCHG zu bestimmen [Guillerault et al., 1994]. Den Quotienten aus Harpagosid und 8-PCHG nutzten Baghdikian et al. (1997) als chemotaxonomisches Merkmal zur Beurteilung des Pflanzenmaterials. Für *Harpagophytum procumbens* liegt dieser Quotient zwischen 20 und 38 und für *Harpagophytum zeyheri* unter 1. Eich et al. (1998) schlugen für eine höhere Genauigkeit vor, den prozentualen Anteil von 8-PCHG am Gesamt-Iridoidgehalt (8-PCHG +

Harpagosid) anstelle des einfachen Quotienten zu verwenden. Für *H. procumbens* liegt der Wert dieser Kennzahl bei maximal 12, für *H. zeyheri* bei mindestens 30.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl eine HPLC- als auch eine CE-Methode zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe entwickelt. Neben einem handelsüblichen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* wurden noch weitere arzneilich verwendete sowie frisch hergestellte Extrakte aus der Wurzel von *H. procumbens* (Kap. 8.1.1, S.204) und *H. zeyheri* (Kap. 8.1.2, S.205) untersucht.

2.2.1 EXTRAKTION

Aus den Drogenpulvern der beiden Arten (Kap. 8.1, S.204) wurden Extrakte mit unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellt. Es wurden Wasser, Ethanol und Ethanol-Wassermischungen verwendet. Ebenso wurde die Temperatur variiert. Die genaue Herstellung der Extrakte wird in Kapitel 8.1.1 (S.204) und 8.1.2 (S.205) beschrieben. Mit dieser Untersuchung sollte die Abhängigkeit der Extraktion bekannter Inhaltsstoffe, mit einer Konzentration größer als 0.1 %, von der Temperatur und dem Lösungsmittel näher untersucht werden. Das sollte Aufschluss darüber geben, mit welcher Methode eine vollständigere Extraktion erzielt werden kann. Vorherige Untersuchungen [Pourrat et al., 1985; Erdös et al., 1978; Duband, 1986] zum Extraktionsverhalten bezogen sich meistens nur auf den Gehalt an Harpagosid.

Die Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von *Harpagophyti zeyheri radix* sollte Aufschluss darüber geben, in wieweit sich diese Droge phytochemisch von *H. procumbens* unterscheidet. In bisherigen Untersuchungen zur chemotaxonomischen Unterscheidung wurde nur das Verhältnis von Harpagosid zu 8-PCHG untersucht [Baghdikian et al., 1997].

2.2.2 QUANTITATIVE HPLC

Die Quantifizierung (Kap. 9.1.2.3, S.211) der Inhaltsstoffe aus dem Extrakt erfolgte mit demselben System wie in Kapitel 9.1.2.1 (S.208) beschrieben. Es wurde die Methode des externen Standards gewählt. Infolge der hohen Präzision in der Probenaufgabe durch Verwendung z.B. eines Autosamplers, ist diese Methode bezüglich der Genauigkeit der Methode des internen Standards ebenbürtig.

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden die eigenen Isolate verwendet, mit Ausnahme von Pagosid, welches aus Substanzmangel als 8-PCHG berechnet wurde. 8-PCHG kann als Bezugssubstanz verwendet werden, da diese Substanz ein ähnliches chromatographisches Verhalten und einen ähnlichen Absorptionskoeffizienten (Pagosid $\log \epsilon = 4.16$, 8-PCHG $\log \epsilon = 4.24$) aufweist. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurden die Substanzen in der Nähe ihrer UV-Maxima detektiert. Harpagosid und Zimtsäure wurden bei 280 nm, 8-PCHG und Pagosid bei 312 und die Phenylethanoide bei 330 nm detektiert.

Untersucht wurde der oben beschriebene Extrakt, 4 arzneiübliche Handelsextrakte (Kap. 8.1.1), 8 aus dem Wurzelpulver von *Harpagophytum procumbens* hergestellte Extrakte (Hp-HS, Hp-ES, Hp-H90, Hp-E90, Hp-H50, Hp-E50, Hp-HU, Hp-EU; Tab. 2.2.2-1; Kap. 8.1.1, S.204) und 7 frisch hergestellte Extrakte aus dem Drogenpulver von *Harpagophytum zeyheri* (Hz-ES, Hz-H90, Hz-E90, Hz-H50, Hz-E50, Hz-HU, Hz-EU; Tab. 2.2.2-1; Kap. 8.1.2, S.205). Beide Drogen wurden von der Firma Sertürner (Gütersloh, jetzt Berlin) zur Verfügung gestellt.

Extrakt <i>H. procumbens</i>	Lösungsmittel	Extraktionsart	Temperatur	Extrakt <i>H. zeyheri</i>
Hp-HS	Wasser (H ₂ O)	Soxhlet	Siedetemperatur	---
Hp-ES	Ethanol 96 %	Soxhlet	Siedetemperatur	Hz-ES
Hp-H90	Wasser (H ₂ O)	Wasserbad	90°C	Hz-H90
Hp-E90	Ethanol 50 %	Wasserbad	90°C	Hz-E90
Hp-H50	Wasser (H ₂ O)	Wasserbad	50°C	Hz-H50
Hp-E50	Ethanol 50 %	Wasserbad	50°C	Hz-E50
Hp-HU	Wasser (H ₂ O)	Ultra Turrax	Eiskühlung	Hz-HU
Hp-EU	Ethanol 50 %	Ultra Turrax	Eiskühlung	Hz-EU

Tab. 2.2.2-1 Erläuterung zu den Extraktbezeichnungen; die Herstellung wird in Kapitel 8.1.1 und 8.1.2 näher erläutert

2.2.2.1 *Harpagophytum procumbens* DC.

In mehreren Veröffentlichungen wurde das Iridoid Harpagosid als Hauptinhaltsstoff der Extrakte aufgefasst [Chrubasik et al., 1996]. Das trifft auch bei unseren Untersuchungen auf die meisten mit Wasser hergestellten Extrakte zu (Abb. 2.2.2-1, S.45). Dort liegt der Harpagosidgehalt bezogen auf den Extrakt zwischen 2.13 % und 2.40 %. Der wässrige Soxhlet-Extrakt (Hp-HS) enthält jedoch nur 1.26 % Harpagosid und einen höheren Gehalt an Isoacteosid (1.99 %). Die geringe Harpagosid Konzentration kann infolge der hohen Temperatur in der Vorlage (Siedetemperatur!) durch Abbaureaktionen hervorgerufen worden

sein. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass Zimtsäure in dem Extrakt Hp-HS in höheren Konzentrationen zu finden ist. Weiterhin ist zu beobachten, dass der Gehalt an Harpagosid mit abnehmender Temperatur im wässrigen Milieu minimal ansteigt. Diese Temperaturabhängigkeit ist im ethanolhaltigen Extraktionsmittel nicht zu beobachten. Obwohl Iridoide zu den instabilen Verbindungen zählen, konnte die Aussage von Pourrat et al. (1985) bestätigt werden, dass Harpagosid auch bei höheren Temperaturen (bis 90 °C) relativ stabil ist. Die Vollständigkeit der Extraktion von Harpagosid zeigt ebenfalls keine Abhängigkeit vom verwendeten Extraktionsmittel. Auch bei den ethanolhaltigen Lösungsmitteln liegt der Harpagosidgehalt zwischen 2.23 % und 2.47 %.

Bei den Gehalten der Iridoide, 8-PCHG und Pagosid, kann ebenfalls weder eine Temperatur- noch eine Extraktionsmittelabhängigkeit beobachtet werden. Nur durch eine andauernde, wässrige Extraktion bei Siedetemperatur vermindert sich leicht deren Konzentration. Pourrat et al. (1985) fanden im Rahmen seiner Untersuchungen, dass der Gehalt an Iridoiden mit Methanol als Auszugsmittel höher als mit Wasser war. Den höchsten Gehalt an Iridoiden bekam er durch eine Soxhlet Extraktion mit Methanol als Lösungsmittel. Die Quantifizierung der einzelnen Iridoide erfolgte dabei semiquantitativ durch Vergleich der Zonengröße im Dünnschichtchromatogramm.

Die Phenylethanoide sind bei ethanolhaltigen Auszugsmitteln in höheren Konzentrationen anzutreffen als bei wässrigen. In ethanolischen Lösungen liegt der Gehalt zwischen 2.59 % und 2.86 %, in wässrigen zwischen 0.7 % und 2.00 %. Somit stellt Isoacteosid in denen mit Ethanol hergestellten Extrakten die Hauptsubstanz dar. Auffällig ist, dass die Konzentrationen der drei Phenylethanoide im wässrigen Milieu mit steigender Extraktionstemperatur stark zunehmen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den im Kapitel 5.2 (S.153) beschriebenen Untersuchungen, in denen die Phenylethanoide sich bei 37 °C im Laufe der Stabilitätsuntersuchungen innerhalb kürzester Zeit abbauen. Höhere Temperaturen sollen die Isomerisierung von Acteosid zu Isoacteosid steigern (Fleer 2000). Auch das kann hier nicht beobachtet werden, da sowohl Isoacteosid als auch Acteosid bei höheren Temperaturen in größeren Konzentrationen vorhanden sind. Die Extraktion im wässrigen ist im Gegensatz zum ethanolischen Milieu bei höheren Temperaturen offenbar vollständiger.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit ethanolhaltigen Extraktionsmitteln eine vollständigere Extraktion der Phenylethanoide zu erreichen ist bei gleichbleibendem Gehalt an Iridoiden. Mit wässrigen Extraktionsmitteln können nur bei höheren Temperaturen größere Mengen an Phenylethanoiden, die jedoch geringer sind als in den ethanolischen Extrakten, erfasst werden. Weiterhin zeigt Harpagosid bei zu hohen Temperaturen einen leichten Abbau.

Vergleicht man die ethanolischen Extrakte miteinander, liegen in dem Hp-E50-Extrakt (Ethanol 50 %, 50°C) minimal erhöhte Konzentrationen an Iridoiden (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) vor. Aufgrund dessen und infolge des hohen Gehaltes an Phenylethanoiden ist dieser Extraktionsmethode den Vorrang zu geben. Die Abbildung 2.2.2-1 (S.45) zeigt die Konzentrationen der Hauptverbindungen in den hergestellten Extrakten.

Die Substanzen 8-Feruloylharpagid, 8-O-Cinnamoylmyoporosid und Kaffeesäure wurden, wie oben bereits angedeutet, nur für den Sertürner-Extrakt bestimmt (Tab. 2.2.2-1, S.47). Die Quantifizierung erfolgte mit demselben System wie in Kapitel 9.1.2.1 (S.208) beschrieben und mit der Methode des externen Standards. Dabei wurde 8-Feruloylharpagid als 8-PCHG und 8-O-Cinnamoylmyoporosid als Harpagosid berechnet. Für die Kaffeesäure wurde eine eigene Kalibriergerade mit käuflich erworbener Kaffeesäure aufgestellt (Kap. 9.1.2.3, S.211). Diese Substanzen kommen nur in sehr geringen Mengen in dem Extrakt vor. Kaffeesäure weist einen Gehalt von 0.005 %, 8-Feruloylharpagid von 0.045 % und 8-O-Cinnamoylmyoporosid von 0.011 % auf.

Extrakt <i>H. procumbens</i>	Harpagosid / 8-PCHG	8-PCHG- Kennzahl
Sertürner	6	14
Hp-HS	8	11
Hp-ES	10	9
Hp-H90	10	9
Hp-E90	10	9
Hp-H50	10	9
Hp-E50	10	9
Hp-HU	11	8
Hp-EU	10	9

Tab. 2.2.2.1-1 Harpagosid/8-PCHG-Quotient und 8-PCHG-Kennzahl der verschiedenen *H. procumbens* Extrakte

Aus den Konzentrationen von 8-PCHG und Harpagosid wurde weiterhin sowohl der Harpagosid/8-PCHG-Quotient [Baghdikian et al., 1997] als auch die 8-PCHG –Kennzahl [Eich et al., 1998] berechnet. Diese Kennzahlen sollten einen Hinweis darauf geben, ob es sich bei dem hier vorliegenden Materialien um reine *H. procumbens* Droge oder um mit *H. zeyheri* versetztes Drogenmaterial handelt.

Für *H. procumbens* wird ein Harpagosid/8-PCHG-Quotient zwischen 20 und 38 erwartet. Die hier ermittelten Werte liegen zwischen 6 und 11 (Tab. 2.2.2.1-1). Das würde nach Baghdikian et al. (1997) daraufhin hindeuten, dass das hier untersuchte Drogenmaterial Beimischungen von *H. zeyheri* enthält.

Die 8-PCHG-Kennzahl darf für *H. procumbens* nach Feistel und Gaedcke (2000) maximal 12 betragen. Außer dem „Sertürner“ Extrakt entsprechen die weiteren Extrakte diesen Anforderungen. Da die 8-PCHG-Kennzahl genauere Ergebnisse als der reine Quotient liefern soll, kann man davon ausgehen, dass das hier untersuchte Drogenmaterial aus *H. procumbens* besteht. Die höhere 8-PCHG-Kennzahl von 14, die sich bei dem „Sertürner“-Extrakt ergibt, zeigt ebenfalls eine deutliche Tendenz zu reiner *H. procumbens* Droge, insbesondere wenn man die hohen Kennzahlen (69-76, Tab. 2.2.2.1-2, S.47) von *H. zeyheri* betrachtet.

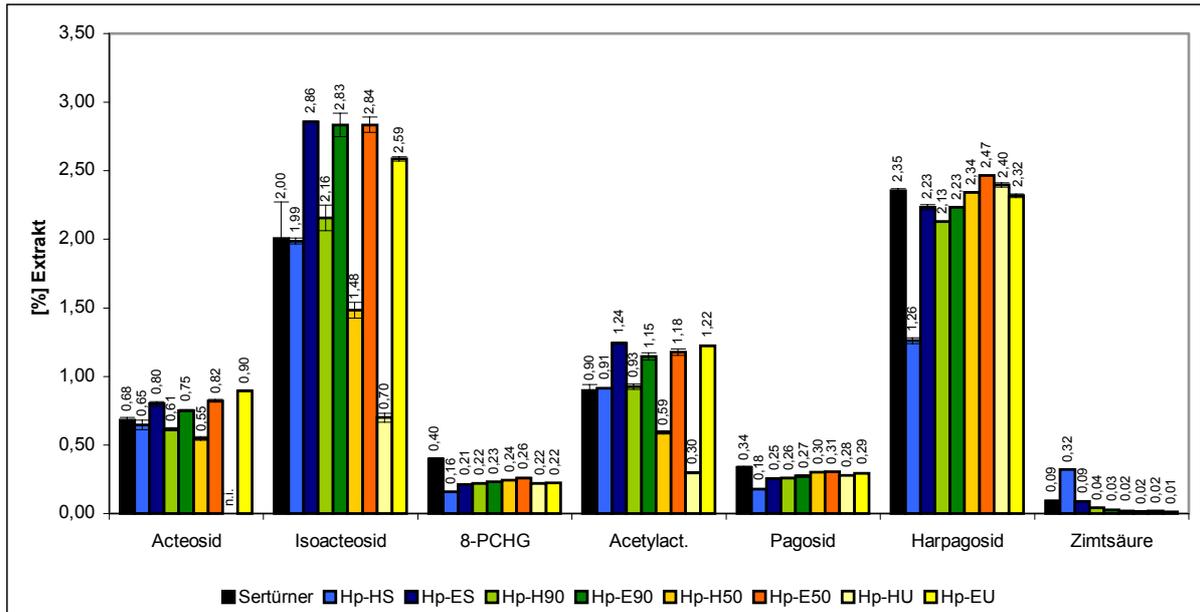


Abb. 2.2.2-1: Quantifizierung der Inhaltsstoffe aus verschiedenen Extrakten (Kap 8.1.1) von *Harpagophytum procumbens* DC. mittels HPLC; Extraktbezeichnungen werden in Tab. 2.2.2-1 (S.42) näher erläutert

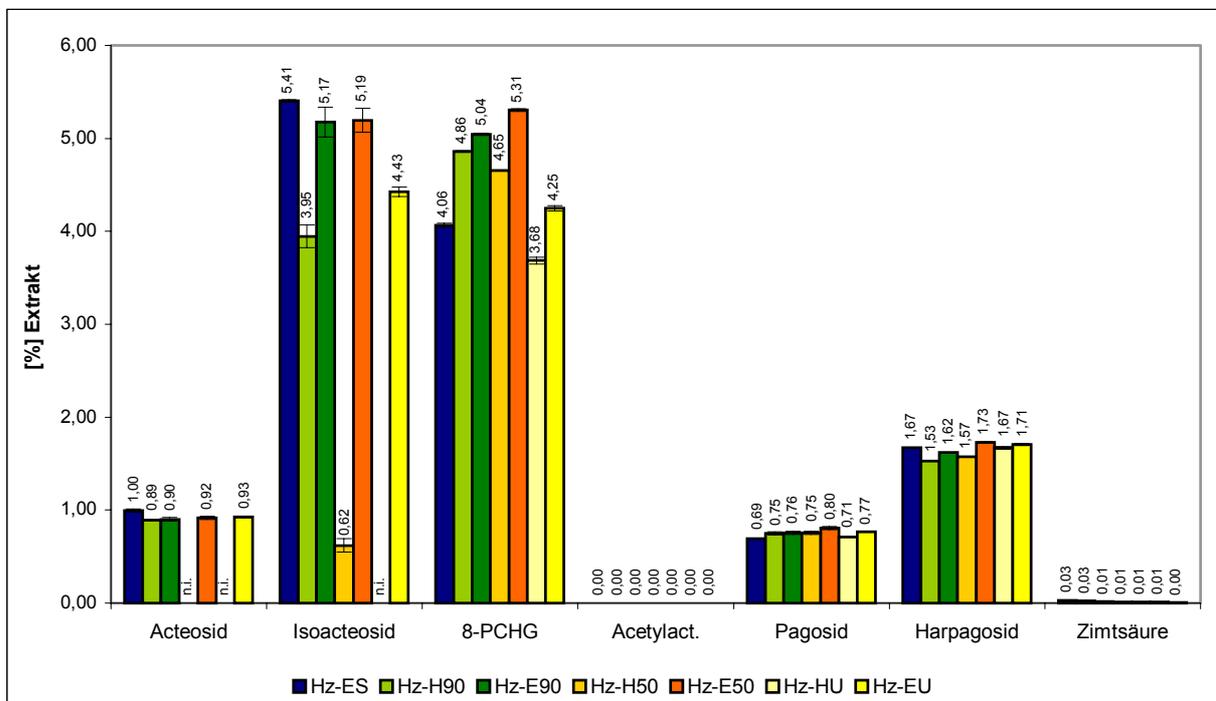


Abb. 2.2.2-2: Quantifizierung der Inhaltsstoffe aus verschiedenen Extrakten (Kap 8.1.2) von *Harpagophytum zeyheri* DC. mittels HPLC; Extraktbezeichnungen werden in Tab. 2.2.2-1 (S.42) näher erläutert

2.2.2.2 *Harpagophytum zeyheri* Decne

Die obengenannten Temperatur- und Lösungsmittelleffekte können auch zum Teil bei den Extrakten von *Harpagophytum zeyheri* beobachtet werden (Abb. 2.2.2-2, S.45). Die Phenylethanoide zeigen in ethanolhaltigen Auszugsmitteln eine höhere Konzentration, während in wässrigen mit sinkender Temperatur die Gehalte abnehmen, bis die Peaks bei Acteosid und Isoacteosid bei 50 °C und im Eisbad nicht mehr detektierbar sind. Harpagosid und Pagosid zeigen weder eine Abhängigkeit vom Lösungsmittel noch von der Temperatur. Das trifft bei *H. zeyheri* auf 8-PCHG nicht zu. Im ethanolischen Milieu nimmt die Konzentration mit steigender Temperatur ab, während im wässrigen die Löslichkeit im Extraktionsmittel mit der Temperatur ansteigt. Begründet werden kann das mit einem Konzentrationseffekt, da 8-PCHG in *Harpagophytum zeyheri* (3.68 % - 5.31 %) in weitaus höheren Konzentrationen vorkommt als in *H. procumbens* (0.26 % - 0.4 %).

Wie bereits häufig beschrieben [Baghdikian et al., 1997], weist *H. zeyheri* einen deutlich höheren Gehalt an 8-PCHG auf als *H. procumbens* und einen geringeren an Harpagosid. Dieses Verhältnis von Harpagosid und 8-PCHG wird, wie oben bereits erwähnt, häufig zur Unterscheidung beider Drogen verwendet. Die Konzentrationen von Acteosid, Isoacteosid und Pagosid sind in dem Extrakt der *H. zeyheri* Droge im Vergleich zur *H. procumbens* Droge in geringem Maße erhöht. Weitere quantitative Untersuchungen des Drogenmaterials sind erforderlich, um diese Aussage zu bestätigen. Auffallend ist, dass das Chromatogramm der Extrakte von *H. zeyheri* kein 6'-O-Acetylacteosid-Signal aufweist. Würde dieses Ergebnis durch weitere quantitative Untersuchungen bestätigt werden, wäre das eine zusätzliche Möglichkeit, *Harpagophytum procumbens* von *Harpagophytum zeyheri* zu unterscheiden. Da weiteres authentisches Drogenmaterial von *H. zeyheri* nicht erhalten werden konnte, sind derartige Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden.

Wie bei *H. procumbens* wurde auch für *H. zeyheri* zur Reinheitsüberprüfung der Harpagosid/8-PCHG-Quotient und die 8-PCHG-Kennzahl bestimmt. Nach Baghdikian et al. (1997) liegt der Harpagosid/8-PCHG-Quotient für *H. zeyheri* unter 1. Die Quotienten des hier verwendeten Drogenmaterials liegen zwischen 0.31 und 0.45 (Tab. 2.2.2.1-2, S.47) und entsprechen somit den Anforderung für *H. zeyheri*. Durch die 8-PCHG-Kennzahl wird weiterhin bestätigt, dass es sich bei dem hier untersuchten Drogenmaterial um *H. zeyheri* handelt. Nach Feistel und Gaedcke (2000) soll diese Kennzahl für *H. zeyheri* mindestens 30 betragen. Wie man in der Tabelle 2.2.2.1-2 (S.47) sehen kann, liegt die Kennzahl für die hier verwendete Droge deutlich über 30, zwischen 69 und 76.

Extrakt <i>H. zeyheri</i>	Harpagosid / 8-PCHG	8-PCHG- Kennzahl
Hz-ES	0.41	71
Hz-H90	0.31	76
Hz-E90	0.32	76
Hz-H50	0.34	75
Hz-E50	0.33	75
Hz-HU	0.45	69
Hz-EU	0.40	71

Tab. 2.2.2.1-2 Harpagosid/8-PCHG-Quotient und 8-PCHG-Kennzahl der verschiedenen *H. zeyheri* Extrakte

2.2.2.3 Handelsübliche Extrakte von *H. procumbens*

Zur weiteren Bestätigung der Inhaltsstoffe und deren Konzentration im Extrakt werden noch vier Extrakte (Li 174) der Teufelkrallenwurzel unterschiedlicher Charge untersucht. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Li 174 Ch. 01020100	Li 174 Ch. 00070100	Li 174 Ch. 02011435	Li 174 Ch. 99070200
Kaffeensäure (%)	0,006 ± 0,0003	0,005 ± 0,0001	0,003 ± 0,0001	0,003 ± 0,0001
Acteosid (%)	0,64 ± 0,005	0,64 ± 0,005	0,49 ± 0,004	0,74 ± 0,005
Isoacteosid (%)	3,46 ± 0,032	3,44 ± 0,036	1,05 ± 0,013	1,70 ± 0,017
8-PCHG (%)	0,42 ± 0,004	0,37 ± 0,008	0,14 ± 0,002	0,29 ± 0,002
8-Feruloylharpagosid (%)	0,047 ± 0,0030	0,044 ± 0,014	0,035 ± 0,0001	0,027 ± 0,0018
6'-O-Acetylaceosid (%)	0,77 ± 0,007	0,68 ± 0,005	0,74 ± 0,009	0,65 ± 0,004
Pagosid (%)	0,34 ± 0,002	0,30 ± 0,001	0,18 ± 0,001	0,16 ± 0,001
Harpagosid (%)	2,81 ± 0,025	2,64 ± 0,022	1,89 ± 0,020	2,20 ± 0,019
8-O-Cinnamoyl- myoporosid (%)	0,014 ± 0,0005	0,014 ± 0,0003	0,009 ± 0,0003	0,011 ± 0,0004
Zimtsäure (%)	0,027 ± 0,002	0,027 ± 0,0004	0,031 ± 0,0004	0,027 ± 0,0002
Harpagosid Im Nativanteil (%)* ¹	3.23	3.37	2,42	2.80
Verfalldatum* ¹	10.12.2001	9.01.2002	07.01.2002	01.01.2002

Tab. 2.2.2-1 Ergebnisse der Quantifizierung der handelsüblichen Extrakte und Herstellerangabe des Harpagosidgehaltes und des Verfalldatums; *¹Angabe des Herstellers

In diesen 4 Extrakten können alle Verbindungen, die aus dem „Sertürner Extrakt“ isoliert worden sind, identifiziert werden. Auch die meisten Gehalte dieser Verbindungen in den

Extrakten liegen in derselben Größenordnung wie in dem Sertürner Extrakt vor. Auffällig ist nur die sehr niedrige Konzentration an Harpagosid in den Extrakten mit der Chargen Nummer 02011435 und 99070200. Im Vergleich der hier ermittelten Harpagosid Gehalte mit denen vom Hersteller liegen die Herstellerangaben in einem höheren Bereich. Die Begründung liegt darin, dass der Hersteller den Harpagosidgehalt im Nativanteil des Extraktes ohne Beimischung von Hilfsstoffen bestimmt hat. Die hier untersuchten Extrakte enthalten einen Hilfsstoffanteil von 20 %. Der Nativanteil beträgt damit 80 %. Rechnet man den hier erhaltenen Harpagosidgehalt auf den Nativanteil um, stimmen die hier ermittelten Ergebnisse mit den denen des Herstellers weitgehend überein (Ch. 01020100 – 3.51% Harpagosid, Ch. 00070100 3.3% Harpagosid, Ch. 02011435 – 2.36 % Harpagosid, Ch. 99070200 – 2.75 % Harpagosid).

Vergleicht man die Konzentrationen der Inhaltsstoffe mit dem festgesetzten Verfalldatum, ist keine Gesetzmäßigkeit erkennbar.

2.2.3 QUANTITATIVE CE

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den HPLC-Untersuchungen wurde eine CE-Methode entwickelt (Kap. 9.2, S.215), bei der mit der Methode des internen Standards gearbeitet wurde. Jeder Kalibrierlösung wurde die gleiche Konzentration an internem Standard hinzugegeben. Das Verhältnis der Flächen von internem Standard und Kalibriersubstanz gegenüber dem Verhältnis der Konzentrationen ergab eine Gerade durch den Nullpunkt, deren Steigung zur Berechnung der Konzentration verwendet wurde. Durch die Verwendung eines internen Standards werden volumenbedingte Fehler minimiert.

Als Kalibriersubstanzen wurden wieder die isolierten Verbindungen (Harpagosid, 8-PCHG und Acteosid) genutzt. Die Phenylethanoide wurden als Acteosid berechnet. Pagosid wurde wie bei der HPLC-Methode als 8-PCHG berechnet.

Als interner Standard wird 4-Hydroxymandelsäure in einer Konzentration von 1.25 mg/mL eingesetzt. Diese Substanz zeigt ein ähnliches Chromophor wie die Phenylethanoide und Iridoide. Die Verbindung kommt nicht genuin im Extrakt vor, ihre Migrationszeit liegt bei ungefähr 12 min und koeluiert somit mit keiner Verbindung des Extraktes. Die Phenylethanoide, 8-PCHG und Pagosid werden bei einer Wellenlänge von 330 nm erfasst, während Harpagosid bei 280 nm detektiert wird.

Untersucht wurden der Sertürner Extrakt, Hp-H50, Hp-HU, Hp-E50, Hp-EU, Hz-H90, Hz-HU, Hz-H50 und HzE50 (Kap. 8.1.2, S.205). Die Bezeichnung der Extrakte wurde in Tabelle

2.2.2-1 (S.42) näher erläutert. Die ermittelten Werte werden in der Tabelle 2.2.3-1 (S.50) dargestellt.

Der Vergleich der Ergebnisse der CE-Quantifizierung mit den Ergebnissen der HPLC-Untersuchung zeigt, dass die Werte beider Methoden in derselben Größenordnung liegen. Die Summe der Konzentrationen von Acteosid und Isoacteosid in der HPLC-Bestimmung entspricht ungefähr der Konzentration, die über den gemeinsamen Peak in der CE ermittelt werden konnte.

Mittels der CE-Methode können die Ergebnisse der HPLC-Quantifizierung bestätigt werden. Wie in Kapitel 2.1.4 (S.37) bereits erwähnt, liegt der Nachteil der schnelleren CE-Methode darin, dass Acteosid und Isoacteosid nicht getrennt quantifiziert werden können. Die Summe der Konzentrationen jedoch entspricht dem Gehalt der Einzelverbindungen in der HPLC. Ein weiterer Nachteil liegt in der geringen Massen-Konzentration der CE-Methode. Während die Bestimmungsgrenze bei der CE zwischen 4.2 µg/mL und 10.2 µg/mL (Kap. 9.2.1, S.216) liegt, können bei der HPLC-Methode noch Konzentrationen bis 0.03 µg/mL (Kap. 9.1.2.3, S.211) detektiert werden. Wie bereits erwähnt liegt ein großer Vorteil der CE-Methode in der kürzeren Analysenzeit. Die CE-Methode könnte somit zur schnelleren Bestimmung des Harpagosid/8-PCHG Quotienten bzw. der 8-PCHG-Kennzahl eingesetzt werden, da diese beiden Substanzen in höheren Konzentrationen vorliegen und innerhalb von 8 min getrennt bestimmt werden können. Auch das Fehlen des 6'-O-Acetylacteosids und damit eventuell eine weitere Unterscheidung zwischen *H. procumbens* und *H. zeyheri* könnte schneller als mit der HPLC Methode untersucht werden.

	Act [%] ± S _{rel}		Iso [%] ± S _{rel}		Iso+Act [%] ± S _{rel}		8-PCHG [%] ± S _{rel}		Acetylacteosid [%] ± S _{rel}		Pagosid [%] ± S _{rel}		Harpagosid [%] ± S _{rel}	
	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE
Hp-Sert	0.68 ± 0.02	3.37 ± 0.053	2.00 ± 0.27	0.57 ± 0.022	0.40 ± 0.01	0.31 ± 0.044	0.90 ± 0.04	0.74 ± 0.003	0.34 ± 0.03	0.41 ± 0.011	2.35 ± 0.02	2.33 ± 0.15	2.34 ± 0.001	2.33 ± 0.15
Hp-H50	0.55 ± 0.01	2.20 ± 0.087	1.48 ± 0.06	0.31 ± 0.044	0.24 ± 0.001	0.31 ± 0.044	0.59 ± 0.01	0.68 ± 0.036	0.30 ± 0.001	0.31 ± 0.009	2.34 ± 0.001	2.77 ± 0.03	2.34 ± 0.001	2.77 ± 0.03
Hp-E50	0.82 ± 0.01	3.29 ± 0.104	2.84 ± 0.06	0.27 ± 0.012	0.26 ± 0.001	0.27 ± 0.012	1.18 ± 0.02	0.76 ± 0.018	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.006	2.47 ± 0.001	2.76 ± 0.07	2.47 ± 0.001	2.76 ± 0.07
Hp-HU	n.i.	0.60 ± 0.017	0.7 ± 0.032	0.32 ± 0.017	0.22 ± 0.001	0.32 ± 0.017	0.30 ± 0.006	0.47 ± 0.006	0.28 ± 0.003	0.33 ± 0.013	2.40 ± 0.016	2.95 ± 0.36	2.40 ± 0.016	2.95 ± 0.36
Hp-EU	0.90 ± 0.01	2.98 ± 0.072	2.59 ± 0.02	0.29 ± 0.014	0.22 ± 0.001	0.29 ± 0.014	1.22 ± 0.001	0.72 ± 0.013	0.29 ± 0.001	0.29 ± 0.015	2.32 ± 0.01	2.54 ± 0.14	2.32 ± 0.01	2.54 ± 0.14
Hz-H90	0.89 ± 0.001	5.26 ± 0.152	3.95 ± 0.12	4.96 ± 0.193	4.86 ± 0.01	4.96 ± 0.193	n.v.	n.v.	0.75 ± 0.02	0.81 ± 0.032	1.53 ± 0.001	1.94 ± 0.12	1.53 ± 0.001	1.94 ± 0.12
Hz-H50	n.i.	0.62 ± 0.006	0.62 ± 0.07	4.47 ± 0.093	4.65 ± 0.01	4.47 ± 0.093	n.v.	n.v.	0.75 ± 0.02	0.75 ± 0.016	1.57 ± 0.001	1.90 ± 0.07	1.57 ± 0.001	1.90 ± 0.07
Hz-E50	0.92 ± 0.02	6.13 ± 0.236	5.19 ± 0.13	4.45 ± 0.181	5.31 ± 0.01	4.45 ± 0.181	n.v.	n.v.	0.80 ± 0.02	0.73 ± 0.028	1.73 ± 0.01	1.95 ± 0.06	1.73 ± 0.01	1.95 ± 0.06
Hz-HU	n.i.	0.29 ± 0.033	n.i.	4.57 ± 0.110	3.68 ± 0.03	4.57 ± 0.110	n.v.	n.v.	0.71 ± 0.001	0.81 ± 0.02	1.67 ± 0.01	1.92 ± 0.15	1.67 ± 0.01	1.92 ± 0.15

Tab. 2.2.3-1 Vergleich der Ergebnisse der Quantifizierung mittels HPLC und CE; Iso – Isoacteosid, Act – Acteosid, n.i. – Signal war nicht zu identifizieren, n.v. – Signal war nicht vorhanden; Erläuterungen zu den Extraktbezeichnungen wurden in Tab. 2.2.2-1 (S.42) erläutert

2.3 Fraktionierung des Extraktes

Der erste Schritt der Fraktionierung (Kap. 9.4.1, S.220) war eine Auftrennung des Extraktes mittels Verteilungschromatographie an Celite[®] 545 (Kap. 9.1.3.1, S.212), ein Filtrierhilfsmittel auf Kieselgurbasis. Der Extrakt wurde in mit Ethylacetat gesättigtem Wasser suspendiert und auf die trockene Säule aufgegeben. Erst wurde mit wassergesättigtem Ethylacetat eluiert und zwar solange, bis keine Substanzen mehr von der Säule erhalten werden konnten. Die Vollständigkeit der Elution wurde mittels DC kontrolliert. Der auf der Säule verbliebene polare Anteil des Extraktes wurde mit Wasser von der Säule gespült. Der Vorteil der Verteilung des Extraktes an Kieselgur anstelle einer Ausschüttelung im Scheidetrichter liegt in der saubereren Trennung. Bei einer Ausschüttelung befinden sich in der Ethylacetat-Phase noch Reste an Stachyose und anderen oligomeren Kohlenhydraten. Mittels der Celite[®] Säule verbleiben diese Bestandteile in der wässrigen Phase an dem Säulenmaterial. Bei der Ausschüttelung bildet sich außerdem durch den hohen Anteil an Kohlenhydraten ein beständiger Schaum, der die Trennung der Phasen erschwert. Durch den Einsatz der Säulenchromatographie kann das verhindert werden.

In der Ethylacetat Phase befinden sich solche Verbindungen, deren R_f -Wert in dem in Kapitel 9.1.1 (S.207) beschriebenen DC-System größer als 0.49 sind. Es sind rot und grün gefärbte Zonen erkennbar, die den Iridoiden und den Phenylethanoiden zugeordnet werden können (Abb. 2.1.2-1, S.33). Das HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat-Phase (Fraktion B, 5.7 %) zeigt, dass die Hauptverbindungen des Extraktes in dieser Phase angereichert werden können. Diese Fraktion wurde daraufhin weiter aufgearbeitet.

Die wässrige Phase (Fraktion A, 94.3 %) enthält nach DC-Detektion die oligomeren Kohlenhydrate, unter anderem Stachyose, Raffinose, Saccharose und verschiedene Monosaccharide. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie nicht weiter behandelt.

Die Fraktion B wurde mittels der MLCCC, wiederum eine Verteilungschromatographie, weiter aufgearbeitet (Kap. 9.1.4, S.213). Das Lösungsmittelsystem bestand aus Ethylacetat, Propanol und Wasser, wobei die untere Phase als stationäre Phase eingesetzt wurde. Da die Aufgabekapazität der verwendeten MLCCC-Säule nur bei etwa 2g liegt, wurde zur Gewinnung größerer Fraktionsmengen diese MLCCC-Trennung der Fraktion B dreimal (MLCCC I – MLCCC III; Abb. 2.3-1, S.54) durchgeführt. Die römischen Ziffern vor den B-Fraktionen geben an, aus welchem MLCCC-Lauf sie gewonnen worden sind. MLCCC-Lauf I

und II wurden nach demselben dünn-schichtchromatographischen Bild geschnitten. Zur Gewinnung des Pagosids (IIIB5) wurde in dem MLCCC III-Lauf leicht von diesem Schema abgewichen.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC und HPLC kontrolliert. In den ersten Fraktionen erscheinen Zimtsäure (IB2, IIB2) und Kaffeesäure (IIB2). In folgenden Fraktionen können 6'-O-Acetyllacteosid (IB3) und Pagosid (IIIB5) detektiert werden. Die anschließenden Fraktionen, die Acteosid (IIB6), Isoacteosid (IB7, IIB6) und Harpagosid (IB7, IIB6) enthalten, nehmen den größten Anteil ein. Zum Schluss erscheint das 8-Feruloylharpagid (IIIB8) und darauf das 8-PCHG (IB10).

Diese Fraktionen wurden mit der präparativen (Kap. 9.1.2.2, S.208) HPLC (Rp-18) weiter aufgereinigt, so dass die Verbindungen in reiner Form erhalten werden konnten. Die verwendeten Gradienten werden in Kapitel 9.1.2.2 beschrieben. Die Verbindungen Acteosid, Isoacteosid und Harpagosid wurden auch noch aus der Fraktion B6 mittels MPLC (RP-18) isoliert. Dadurch bestand die Möglichkeit, größere Mengen dieser Substanzen zu gewinnen. Entsprechend der Elutionsreihenfolge bei der HPLC auf RP-18 Material erscheint erst Acteosid, anschließend Isoacteosid und zum Schluss Harpagosid. Diese Methode wird in Kapitel 9.1.5 (S.214) erwähnt.

Die Struktur der isolierten Verbindungen wurde mit verschiedenen Methoden, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden, aufgeklärt.

Zur Routineuntersuchung gehörte die Aufnahme eindimensionaler Spektren wie ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren. In den tabellarisch aufgeführten Zuordnungen der Signale der ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren wird die chemische Verschiebung δ in ppm und die Aufspaltung J in Hz angegeben. Zur weiteren Aufklärung und Bestätigung der ersten Ergebnisse wurden auch zweidimensionale Spektren (^1H - ^1H -Korrelation, ^1H - ^{13}C -NMR-Korrelation) aufgenommen (Kap. 9.3.2, S.218). Bei einigen Verbindungen wurden die ermittelten Kopplungskonstanten mittels einer Simulation überprüft. Die Simulationen wurden mit NUTS (Kap. 9.3.2, S.218) durchgeführt und im Kapitel 3 bei den jeweiligen Substanzen dargestellt.

Die Masse der Moleküle wurde mit Hilfe der Massenspektroskopie (Kap. 9.3.3, S.19) ermittelt. Es wurde das ESI-MS Verfahren verwendet - eine schonende Ionisierung, bei der das Molekül nur wenig fragmentiert wird.

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ (Kap. 9.3.4, S.219) und der molare Absorptionskoeffizient ϵ (Kap. 9.3.1, S.217) wurden zur Charakterisierung und Identifizierung der Verbindungen bestimmt.

Da mittels NMR-spektroskopischer Methoden nicht zwischen D- und L-Form der verknüpften Zuckerbausteine unterschieden werden kann, wurde eine kapillarelektrophoretische Methode (Kap. 9.2.2, S.216) zur Überprüfung dieses Sachverhaltes verwendet. Die Zucker wurden durch eine saure Hydrolyse abgespalten, mit einem chiralen Amin (S-(-)-1)Phenylethylamin und Natriumcyanoborohydrid reaktiv aminiert und damit zu Diastereomeren umgesetzt. Durch Koelution mit den entsprechenden Vergleichen konnte der jeweilige Zucker der D- oder L-Reihe zugeordnet werden.

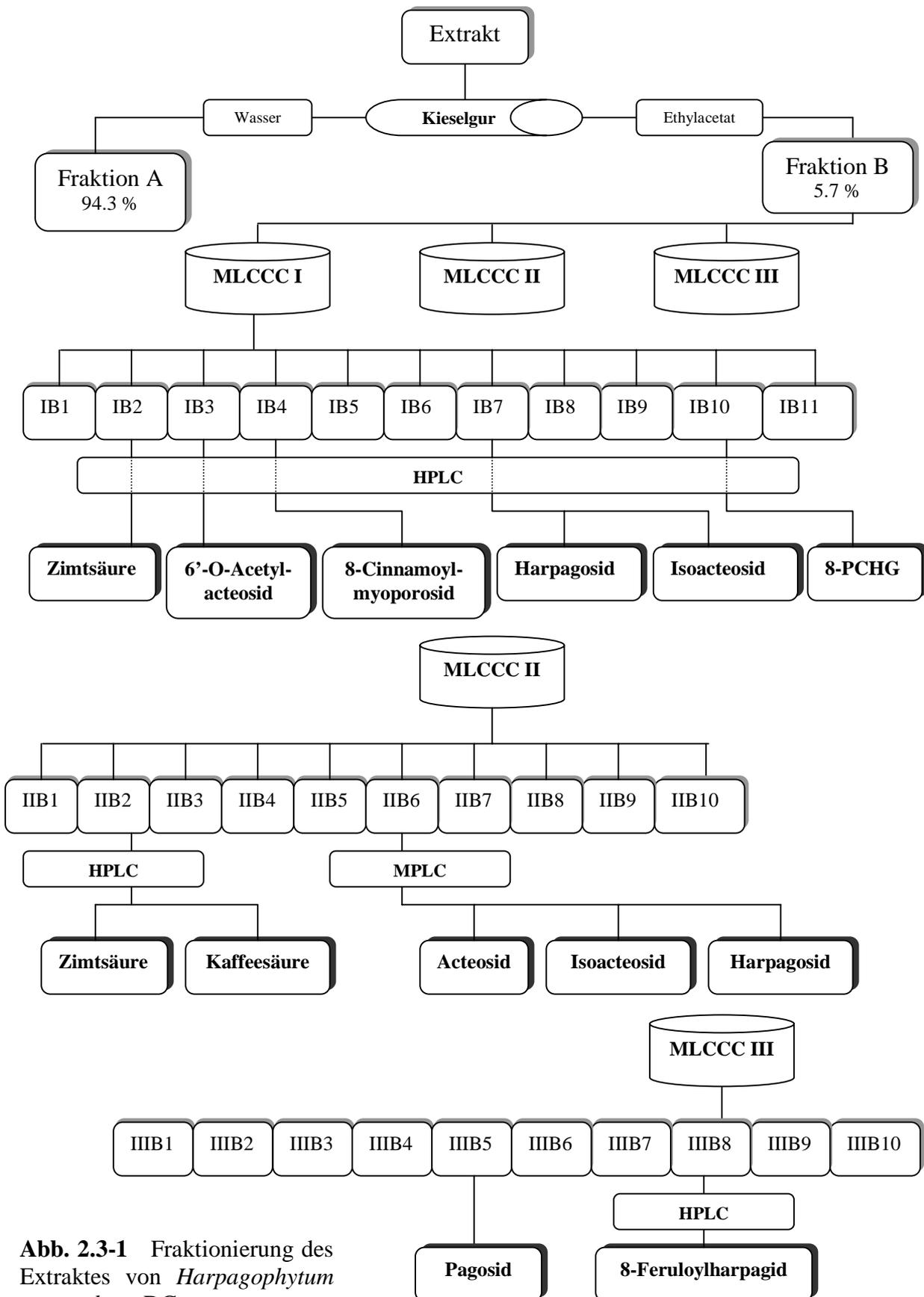


Abb. 2.3-1 Fraktionierung des Extraktes von *Harpagophytum procumbens* DC.

2.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Zur analytischen Überprüfung von Fraktionen und Extrakten von *H. procumbens*, eine als Antirheumatikum bekannte Droge, wurde sowohl ein HPLC- als auch ein CE-System entwickelt. Die isolierten Verbindungen konnten alle im HPLC-Chromatogramm zugeordnet werden. Im Elektropherogramm wurden nur die höher konzentrierten Verbindungen bestimmt. In bisherigen HPLC-Untersuchungen wurden dagegen nur Harpagosid, 8-PCHG und Zimtsäure zugeordnet. Gegenüber der HPLC-Methode zeichnete sich die CE-Methode durch eine schnellere Analysenzeit aus. Die detektierbaren Verbindungen können innerhalb von 12 anstelle von 23 min bei der HPLC getrennt werden. Ein Nachteil der hier durchgeführten kapillarelektrophoretischen Untersuchung liegt jedoch darin, dass Acteosid und Isoacteosid nicht getrennt werden können.

Mit Hilfe des HPLC- und des CE-Systems wurden die Inhaltsstoffe aus *Harpagophytum procumbens* und *Harpagophytum zeyheri* quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die hier untersuchte *H. zeyheri* - Droge nicht nur einen höheren Gehalt von 8-PCHG, wie bereits in einigen Untersuchungen festgestellt worden ist, enthielt, sondern dass auch Isoacteosid, Pagosid und Acteosid in höherer Konzentration vorlagen. Interessanterweise war 6'-O-Acetylacteosid in dem vorliegenden Drogenmaterial von *H. zeyheri* gar nicht vorhanden. Kann das Fehlen von 6'-O-Acetylacteosid in *H. zeyheri* mit weiterem Drogenmaterial bestätigt werden, wäre dieser Unterschied zwischen den Arten eine weitere Möglichkeit, sie voneinander zu unterscheiden. Die Zuordnung von Drogenmaterial zu einer der beiden Arten erfolgte bisher an Hand des Harpagosid-8-PCHG-Quotienten [Baghdikian et al., 1997] bzw. der 8-PCHG-Kennzahl [Eich, 1998]. Für die hier untersuchte *H. zeyheri* Droge entsprach sowohl der Quotient als auch die Kennzahl den genannten Anforderungen (Quotient < 1; Kennzahl > 30). Die Droge von *H. procumbens* und auch der „Sertürner-Extrakt“ wiesen einen zu niedrigen Quotienten auf, was auf eine Beimischung von *H. zeyheri* hindeutet. Die entsprechende Kennzahl des Drogenmaterials, die nach Feistel und Gaedcke (2000) einen genaueren Hinweis gibt, lag jedoch in dem geforderten Bereich (< 12). Damit wäre bestätigt, dass es sich bei der Droge um *H. procumbens* handelt. Die Kennzahl des Sertürner-Extraktes (14) war dagegen zu hoch. Nach den Hersteller-Angaben handelt es sich bei dem „Sertürner-Extrakt“ aber um nachgewiesenermaßen reine *H. procumbens* Droge. Beachten sollte man sowohl bei dem Quotienten als auch bei der 8-PCHG-Kennzahl, dass es sich um keine festen Anforderungen, sondern um Richtlinien handelt, die mit einer begrenzten Anzahl von Untersuchungen ermittelt worden sind. Der Wert für den Sertürner-Extrakt ist nur minimal zu

hoch. Es ist eine Tendenz der Kennzahl zu reiner *H. procumbens* Droge zu erkennen, insbesondere wenn man die hohe Kennzahl des hier untersuchten *H. zeyheri* (> 69) dem geforderten Wert von > 30 gegenüberstellt.

Durch die Herstellung unterschiedlicher Extrakte von *H. procumbens* und *H. zeyheri* mit wechselnden Lösungsmitteln (Ethanol und Wasser) und unterschiedlicher Temperatur (Raumtemperatur, 50°C, 90°C, Siedetemperatur), sollte die Abhängigkeit der Extraktion der Inhaltsstoffe von den genannten Faktoren beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die Erfassung der Iridoide weitgehend von der Temperatur und dem Lösungsmittel unabhängig ist. Auch bei einer Extraktion mit 90 °C werden die ansonsten als instabil beschriebenen Iridoide nicht zerstört. Nur bei 100 °C wird Harpagosid langsam abgebaut. Die Phenylethanoide liegen in ethanolisch hergestellten Extrakten in höherer Konzentration vor. Im wässrigen Milieu steigt die Löslichkeit dieser Verbindungen mit der Temperatur.

An Hand dieser Untersuchungen ergibt sich, dass Ethanol-Wasser-Mischungen gegenüber reinem Wasser zur Herstellung von Extrakten aus *Harpagophyti radix* den Vorrang zu geben ist. Insbesondere bei 50% Ethanol als Auszugsmittel und einer Extraktionstemperatur von 50°C liegen sowohl die Phenylethanoide als auch die Iridoide in hoher Konzentration vor.

3 Strukturaufklärung

3.1 Iridoidglucoside

3.1.1 HARPAGOSID

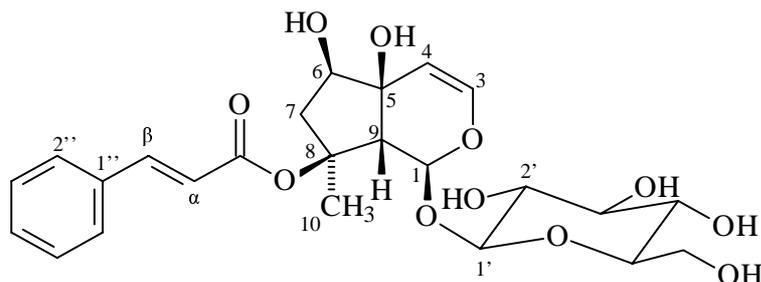


Abb. 3.1.1-1 Strukturformel von Harpagosid

Harpagosid wurde mittels präparativer HPLC (Kap. 9.1.2.2, S.208) aus der MLCCC Fraktion IB7 isoliert (Abb. 2.3-1, S.54). Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung (Abb. 2.1.2-1, S.33) fällt die Verbindung bei einem R_f -Wert von 0.56 durch eine intensiv rot gefärbte Bande nach Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz auf. Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) erscheint sie bei einer Retentionszeit von 19.8 min und stellt bei 280 nm den Peak mit der größten Fläche dar.

Harpagosid wurde bereits 1960 von Lux im Rahmen seiner Dissertation aus einem mit Petroliumbenzin entfetteten ethanolschen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* DC. isoliert. Er schlug für die Summenformel des Harpagosids $C_{22}H_{28}O_{10}$ vor. Die Ermittlung der chemischen Struktur des Aglykons gelang jedoch erst Lichti et al. 1966. Er korrigierte auch die Summenformel zu $C_{24}H_{30}O_{11}$.

Zur eigenen Strukturaufklärung und –absicherung wurden moderne spektroskopische Methoden zur Hilfe genommen. Die Signale der 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit der Literatur überein [Pardo et al., 1998; Pachaly et al., 1994; Chaudhuri et al., 1980; Yi-Ming et al., 1999; Kajimoto et al., 1989] und werden in den Tabellen 3.1.1-1 (S.59) und 3.1.1-2 (S.61) aufgeführt.

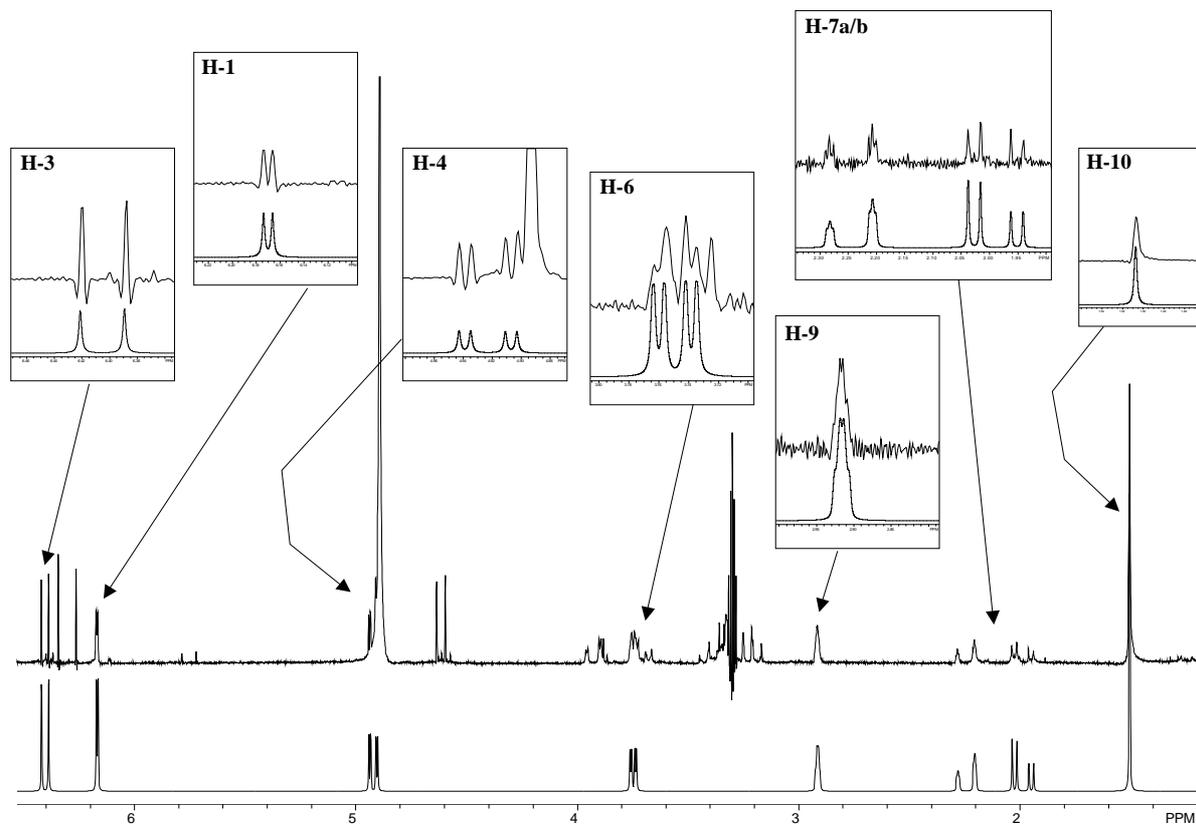


Abb. 3.1.1-2 Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (200 MHz) von Harpagosid gemessen (oben); Simulation des Irindoidgerüsts (unten).

Die aromatischen Protonen der Zimtsäure (H2''- H6'') erzeugen im tiefen Feld zwei Multipletts bei δ 7.59 ppm und δ 7.40 ppm. Die Dubletts bei δ 6.51 und δ 7.67 ppm mit einer Kopplungskonstante von 16.0 Hz weisen auf eine E-konfigurierte olefinische Seitenkette hin. Die Z-Form mit einer kleineren Kopplungskonstante ist nicht zu erkennen.

Das anomere Proton der Glucose erzeugt ein Signal bei δ 4,62 ppm und zeigt durch die glykosidische Bindung an das Irindoid gegenüber einer ungebundenen Glucose eine Tieffeldverschiebung von etwa 0.5 ppm. Die große Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz des H-1' weist auf die β -Konfiguration des Zuckers hin. Die Signallagen des H-4' und H-5' konnten nur mit Hilfe zweidimensionaler Experimente ermittelt werden, da sie zum Teil mit dem Methanol-Signal zusammenfielen. Die weiteren Protonen der Glucose konnten zugeordnet werden.

¹ H	Harpagosid ^{*1} (CD ₃ OD, 200MHz)	Harpagosid ^{*2} (CD ₃ OD, 300MHz)	Harpagosid ^{*3} (CD ₃ OD, 400MHz)	Harpagosid ^{*4} (CD ₃ OD, 300MHz)
Zimt-säure				
α	6.51 d (16.1)	6.31 d (16.0)	6.35 d (16.0)	6.52 d (16)
β	7.67 d (16.1)	7.54 d (16.0)	7.49 d (16.0)	7.67 d (16)
2 ^{''}	7.59 m	7.36-7.41 m	7.42 m	7.60 m
3 ^{''}	7.40 m	7.36-7.41 m	7.24 m	7.40 m
4 ^{''}	7.40 m	7.36-7.41 m	7.24 m	7.40 m
5 ^{''}	7.40 m	7.36-7.41 m	7.24 m	7.40 m
6 ^{''}	7.59 m		7.42 m	7.60 m
Iridoid				
1	6.17 d (1.5)	6.18 d (2)	6.01 s	6.18 s
3	6.41 d (6.4)	6.41 d (6.5)	6.25 d (6.4)	6.41 d (6.4)
4	4.93 dd (6.4/1.6)	4.93 dd (6.5/2.0)	4.77 dd (6.4/1.4)	4.90 m
6	3.76 ddd (4.4/1.4/0.3)	3.76 dd (4.5/1.5)	3.60 d (4)	4.90 m
7a	2.27 ddd(15.1/1.4/0.9)	2.00 dd (15.5/4.5)	1.85 dd (14.5/4.0)	2.27 d (15)
7b	2.00 dd (15.1/4.4/0.3)	2.27 ddd(15.5/1.5)	2.11 d (14.5)	2.02 dd (15/4.5)
9	2.93 m (1.6/ 1.5/0.9/ 0.3/0.3/0.2/)	2.93 bd (2)	2.77 s	2.93 s
10	1.52 m (0.3/0.2)	1.45 s	1.37 s	1.53 s
Glucose				
1'	4.62 d (7.8)	4.62 d (8.0)	4.46 d (8.0)	4.61 d (7.9)
2'	3.21 dd (9.0/7.7)	3.22 dd (9.0/8.0)	3.05 t (8.4)	3.40-3.20
3'	3.41 dd (9.0)	3.41 dd (9.0)	3.24 t (8.6)	3.40-3.20
4'	3.33 m	3.28-3.36 m	3.14 t (8.1)	3.75
5'	3.34 m	3.28-3.36 m	3.18 dd (5.8/2.1)	3.40-3.20
6'a	3.93 dd (12.0/2.1)	3.72 dd(12.5/5.75)	3.55 dd (12.5/5.8)	3.92
6'b	3.7112.0/5.4)	3.93 dd (12.5/2.0)	3.77 dd (12.5/2.1)	3.75

Tab 3.1.1-1 Vergleich der eigenen ¹H-NMR-Daten von Harpagosid^{*1} mit denen aus der Literatur [^{*2}Pachaly et al., 1994; ^{*3}Yi-Ming et al., 1999; ^{*4}Pardo et al., 1998]; Kursiv gedruckte Zahlen geben die durch Simulation ermittelten Werte wieder; δ = ppm, *J* = Hz

Die restlichen Signale konnten den Protonen des Aglykons zugeordnet werden. Die genaue Ermittlung der Kopplungskonstanten gestaltete sich zum Teil schwierig, da sich durch Fernkopplungen Multipletts ergaben. Das Proton H-4 koppelt nicht nur mit H-3 (*J*=6.4 Hz). Mittels Simulation wurde noch eine Kopplung zu H-9 mit einer Kopplungskonstante von *J* = 1.6 Hz nachgewiesen. Dadurch ergibt sich für dieses Proton ein Doppeldublett bei δ 4.93 ppm. Die Resonanzlage des H-3 liegt durch die Nähe der Doppelbindung und der Sauerstofffunktion noch weiter im Tieffeld bei 6.41 ppm. Das Proton H-6 fällt mit dem Signal H-6' der Glucose zusammen. Durch Kopplung zu den Protonen der Methylengruppe am C-7 und durch eine Fernkopplung wahrscheinlich zu H-9 erscheint dieses Signal als ddd. Die Kopplungskonstante zwischen H-9 und H-6 konnte nur mit einer Simulation bestimmt werden (*J* = 0.3 Hz). Die Methylengruppe zeigt Signale bei δ 2.27 (H-7a) und δ 2.00 (H-7b). H-7b spaltet sich durch die Kopplung mit H-7a, H-6 und H-9 zu einem ddd auf, während H-7a durch eine zusätzliche Kopplung eventuell zu der Methylgruppe (Simulation) ein dddd

darstellt. Beide Signale der Methylengruppe erscheinen in dem Spektrum als Multiplett. H-9 wurde in einigen Veröffentlichungen als Singulett [Yi-Ming et al., 1999] bzw. als breites Dublett beschrieben [Pachaly et al., 1994]. Bei höherer Feldstärke kann man jedoch erkennen, dass sich dieses Signal zu einem Multiplett aufspaltet. Mittels Simulation ist es weiterhin möglich zu sehen, dass dieses Multiplett durch Kopplungen mit H-1, H-4, H-6, H-7a, H-7b und H-10 zu Stande kommt (Abb. 3.1.1-2, S.58). Die Methylgruppe erzeugt ein Signal im Hochfeld bei 1.52 ppm.

¹³C-NMR

(Tab. 3.1.1-2, S.61)

Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt 24 Signale, von denen 6 der Glucose, 9 der Zimtsäure und 9 dem Iridoidanteil zugeordnet werden können (Tab. 3.1.1-2, S.61). Die Zuordnung der C-3', C-5' und C-6 war in der Literatur nicht immer einheitlich. Mit Hilfe des HETCORs konnten die korrekten chemischen Verschiebungen ermittelt werden. C-6 zeigt die gleiche Resonanzlage wie C-3', während C-5' um 0.5 ppm ins tiefere Feld verschoben wird. Durch die substituierte Hydroxylgruppe am C-8 erfährt das Methylsignal eine Verschiebung zu 22.7 ppm [Damtoft et al., 1981].

Chaudhuri et al. (1980) stellten nach Untersuchungen verschiedener Iridoide bestimmte Gesetzmäßigkeiten auf bezüglich der Signallage im ¹³C-NMR-Spektrum je nach Substitutionsmuster des Grundgerüsts. Auch die Lage des C-4 bei 106.9 ppm und die des C-3 bei 143.9 ist charakteristisch für Iridoid-Aglyka, die am C-4 unsubstituiert sind und am C-5 eine Hydroxylgruppe tragen (109 ± 1 ppm, 142 ± 1). Durch die äquatoriale Stellung der Hydroxylgruppe am C-8 weist C-1 eine chemische Verschiebung zu 93.7 ± 0.5 und C-9 zu 50 ± 2 auf, eine axiale zeigt bei C-1 eine Verschiebung zu 95.7 ± 0.5 ppm und bei C-9 zu 44.5 ± 1 ppm auf. Die Resonanzlagen des Harpagosids (C-1 = 94.7 ppm, C-9 = 55.6 ppm) weisen auf eine äquatoriale Stellung der Hydroxylgruppe hin und stimmen somit mit der oben angegebenen Formel (Abb. 3.1.1-1, S.57) überein.

Die Signalzuordnungen können mit HETCOR und Cosy bestätigt werden. Mit Hilfe der zweidimensionalen Spektren gelingt es auch die Lage aller Glucosesignale zu bestimmen.

¹³ C	Harpagosid ^{*1} (CD ₃ OD, 50 MHz)	Harpagosid ^{*2} (CD ₃ OD, 75 MHz)	Harpagosid ^{*3} (CD ₃ OD, 100 MHz)	Harpagosid ^{*4} (CD ₃ OD, 75 MHz)	Harpagosid ^{*5} (CD ₃ OD, 25.2 MHz)	Harpagosid ^{*6} (C ₅ D ₅ N)
Zimtsäure						
CO	168.7	168.5	169.2	168.7	168.28	166.9
α	120.2	120.0	120.5	146.1	145.77	135.6
β	146.1	145.9	146.5	120.1	119.79	144.5
1 ^{''}	135.8	135.6	136.2	135.8	135.24	130.5
2 ^{''}	130.0	129.9	130.4	130.0	129.73	129.2
3 ^{''}	129.2	129.0	129.6	129.2	128.96	128.5
4 ^{''}	131.5	131.3	131.9	131.5	131.26	120.2
5 ^{''}	129.2	129.1	129.6	129.2	128.96	128.5
6 ^{''}	130.0	129.9	130.4	130.0	129.73	129.2
Iridoid						
1	94.7	94.6	95.1	94.6	94.4	94.7
3	143.9	143.8	144.3	143.9	143.81	142.3
4	106.9	106.8	107.3	106.9	106.36	107.9
5	73.4	73.5	73.8	73.5	73.18	73.2
6	77.7	77.6	78.1	74.6	77.22	76.9
7	46.2	46.2	46.6	46.2	45.90	46.0
8	88.8	88.7	89.2	88.8	88.33	87.6
9	55.6	55.6	56.0	55.6	55.10	55.4
10	22.7	22.7	23.0	22.6	22.64	22.7
Glucose						
1'	100.0	99.9	100.4	100.0	99.69	99.4
2'	74.6	74.5	75.0	78.2	74.11	74.8
3'	77.7	77.6	78.5	77.7	77.22	78.6
4'	71.8	71.7	72.0	71.8	71.40	71.7
5'	78.2	78.1	78.0	77.6	77.22	78.6
6'	63.0	63.0	63.4	63.0	62.75	62.9

Tab 3.1.1-2 Vergleich der eigenen ¹³C-NMR-Daten von Harpagosid^{*1} mit denen aus der Literatur [^{*2}Pachaly et al., 1994; ^{*3}Yi-Ming et al., 1999; ^{*4}Pardo et al., 1998; ^{*5}Chaudhuri et al., 1980; ^{*6}Kajimoto et al., 1989]; δ = ppm

MS

Zur weiteren Bestätigung der Struktur wurde mittels ESI-MS im positiven Modus die Masse der Verbindung bestimmt. Bei 517 (m/z) ist das Signal für [M+Na]⁺ zu sehen. Die Masse der Substanz ist demnach 494 und entsprach somit den Erwartungen.

Drehwert

Mit einer Konzentration von 2.1 mg/mL, gelöst in Methanol, liegt der spezifische Drehwert der Verbindung bei -41.2°. Der Wert stimmt mit Daten aus der Literatur überein.

$[\alpha]_D^{20}$

Eigene Daten	Pachaly et al. (1994)	Kajimoto et al. (1989)	Lichti et al. (1966)	Seifert et al. (1982)
-41.2° (c = 0.21, CH ₃ OH)	-41.3° (c = 1.0, CH ₃ OH)	-44.9° (c = 0.5, CH ₃ OH)	-42.6° (c = 0.990, CH ₃ OH)	-46.0° (c = ?, CH ₃ OH)

Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der Absorptionsmaxima ($\lambda = 280$ nm, $\lambda = 223$ nm) diente der weiteren Strukturbestätigung und Reinheitsüberprüfung. Die $\log \epsilon$ Werte stimmen annähernd mit der Literatur überein.

Eigene Daten (ϵ)	Lichti et al. (1966) (ϵ)
4.330 ($\lambda = 280$ nm)	4.36 ($\lambda = 276$ nm)
3.994 ($\lambda = 223$ nm)	4.12 ($\lambda = 221.5$ nm)
	4.19 ($\lambda = 215.5$ nm)

CE

Nach der in Kapitel 9.2.2 (S.216) beschriebenen, kapillarelektrophoretischen Methode konnte D-Glucose als Bestandteil des Moleküls ermittelt werden. L-Glucose konnte ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz im ¹H- NMR-Spektrum weist darauf hin, dass Glucose in der β -Form vorliegt.

3.1.2 8-PCHG

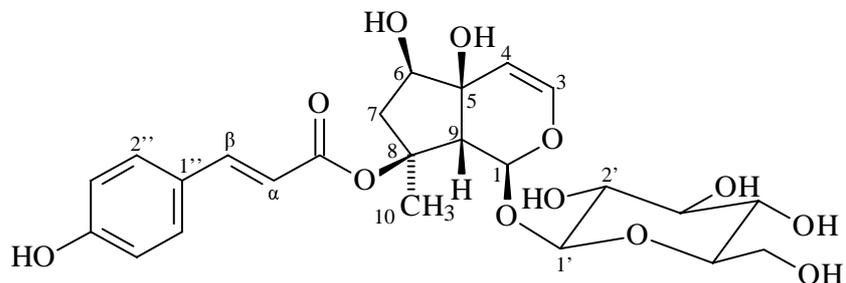


Abb. 3.1.2-1 Strukturformel 8-PCHG

Die Aufreinigung der Fraktion IB10 mittels präparativer HPLC an einer RP-18 Phase führte zu 8-O-p-Cumaroylharpagid (8-PCHG) (Abb. 2.3-1, S.54). Der R_f -Wert dieser Verbindung liegt mit R_f 0.53 nahe unter der Zone des Harpagosids (Abb. 2.1.2-1, S.33). Im Extrakt von *Harpagophytum procumbens* DC. ist diese Zone nur als Schatten unterhalb des Harpagosids erkennbar, während sie im Extrakt von *Harpagophytum zeyheri* DC. die auffälligste Bande darstellt. 8-PCHG färbt sich wie Harpagosid mit Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz rot an. Die Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm ist bei 17.2 min (Abb. 2.1.3-1, S.36). Das UV-Maximum der Substanz liegt bei 312 nm.

8-PCHG wurde 1983 von Kikuchi et. al aus einem ethanolischen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* zum ersten Mal isoliert. Spätere HPLC-Untersuchungen von Harpagophytum-Arten zeigten, dass es sich bei dieser Verbindung um das Hauptiridoid aus den Wurzeln von *Harpagophytum zeyheri* handelt. Das Verhältnis von Harpagosid und 8-PCHG wird zur chemotaxonomischen Unterscheidung der Arten *H. zeyheri* und *H. procumbens* genutzt.

Zur Aufklärung der Struktur wurden spektroskopische Methoden zu Hilfe genommen. Die Resonanzlagen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit Literaturdaten [Kikuchi et. al., 1983] überein.

¹H-NMR

¹ H	8-PCHG ^{*1} (CD ₃ OD, 200 MHz)	8-PCHG ^{*2} (CD ₃ OD, 200 MHz)
Cumarsäure		
α	6.30 d (15.9)	6.40 d (16)
β	7.59 d (15.9)	7.65 d (16)
2''	7.44 dd (8.7/2.0)	5.98 d (8.5)
3''	6.79 dd (8.7/2.0)	6.94 d (8.5)
4''	-----	-----
5''	6.79 dd (8.7/2.0)	6.94 d (8.5)
6''	7.44 dd (8.7/2.0)	5.98 d (8.5)
Iridoid		
1	6.17 d (1.3)	6.18 bs
3	6.40 d (6.4)	6.49 d (6.5)
4	4.92 dd (6.4/1.6)	5.04 d (6.5)
6	3.74 m	3.88 d (4)
7a	2.25 d (15.1)	2.28 d (15)
7b	1.99 dd (15.1/4.4)	2.08 dd (15/4)
9	2.92 m	2.95 s
10	1.51 s	1.50 s
Glucose		
1'	4.61 d (7.8)	
2'	3.21 dd (8.9/7.7)	
3'	3.37 t (8.9)	
4'	3.29	
5'	3.35	
6'a	3.93 dd (12.1/2.0)	
6'b	3.71 m	

Tab. 3.1.2-1 ¹H-NMR Datenvergleich von 8-PCHG; eigene Messung^{*1} und Literatur^{*2} [Kikuchi et al., 1983]; Kursiv gedruckte Daten geben die Kopplungskonstanten wieder, die durch Simulation ermittelt worden sind; δ = ppm, *J* = Hz

Bei der Betrachtung des ¹H-NMR-Spektrums fällt die fast vollständige Übereinstimmung der Signallagen im Aglykon- und Glucosyl-Teil mit denen von Harpagosid auf. Abweichungen zeigen sich lediglich im aromatischen Bereich. Das AA'XX'-Spinsystem des in para-Stellung substituierten Aromaten erzeugt 2 Dubletts von Dubletts bei δ 7.44 ppm und 6.79 ppm mit einer ausgeprägten ortho-Kopplung (*J* = 8.7 Hz) und einer schwächeren meta-Kopplung (*J* = 2 Hz).

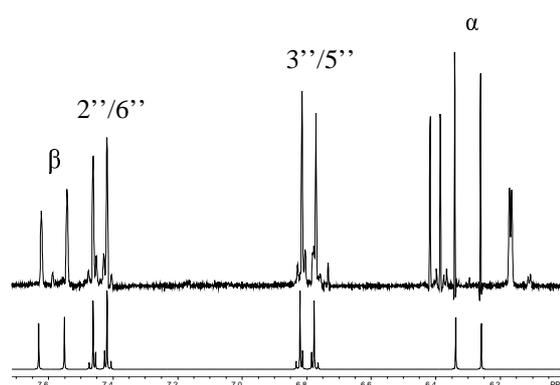


Abb. 3.1.2-2 Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von 8-PCHG (p-Cumarsäurerest); gemessene Daten (200 MHz, oben), simulierte Daten (unten)

Die kleine Kopplungskonstante konnte durch Simulation bestätigt werden. Durch Integration der aromatischen Signale wurde bestätigt, dass die Dubletts von Dubletts jeweils 2 Protonen

zuzuordnen sind. Die Dubletts bei einer chemischen Verschiebung von δ 6.30 ppm und δ 7.59 ppm weisen auf die E-konfigurierte olefinische Seitenkette hin.

Kikuchi et al. (1983) erkannten für H-1 und H-9 des Iridoid-Aglykons nur Singulets. Bei höheren Feldstärken ist jedoch erkennbar, dass sich diese Signale aufspalten. Das Proton an Position 1 erzeugt ein schmales Dublett und H-9 bildet durch Kopplungen mit H-1, H-4, H-6, H-7a, H-7b und H-10, nachgewiesen durch Simulation, ein Multiplett. Im Gegensatz zu seiner Interpretation (Tab. 3.1.2-1, S.64) konnte infolge Simulation und Nachbearbeitung des Spektrums H-4 (δ 4.92 ppm) als dd und H-6 (δ 3.74 ppm) als Multiplett identifiziert werden. Verschiebungen der Resonanzlagen kamen durch unterschiedliche Lösungsmittel zustande. Kikuchi et al. lösten 8-PCHG in deuteriertem Wasser, während zur Aufnahme dieser Spektren die Substanz in deuteriertem Methanol gelöst wurde. Die Protonen der Glucose ordnete er nicht zu.

¹³C-NMR

Die Signallagen der Glucose und des Aglykon stimmen ebenfalls mit denen des Harpagosids überein. Die Resonanzlagen im aromatischen Bereich weisen Unterschiede auf. C-4'' des aromatischen Restes ist durch die Bindung der Hydroxylgruppe weit ins Tieffeld verschoben (δ 161.2 ppm). Die Hydroxylgruppe zeigt auch Auswirkungen auf die benachbarten Kohlenstoffe, die nun eine Signallage im höheren Feld erzeugen.

¹³ C	8-PCHG ^{*1} (CD3OD, 50 MHz)	8-PCHG ^{*2} (CD3OD, 50 MHz)
Cumarsäure		
CO	169.3	169.3
α	116.5	116.3
β	146.3	146.5
1''	127.3	127.0
2''	131.1	131.0
3''	116.9	116.7
4''	161.2	161.1
5''	116.9	116.7
6''	131.1	131.0
Iridoid		
1	94.8	94.6
3	143.9	143.9
4	106.9	106.7
5	73.4	73.3
6	77.7	77.5
7	46.3	46.2
8	88.4	88.4
9	55.7	55.5
10	22.7	22.7
Glucose		
1'	100.0	99.9
2'	74.6	74.4
3'	77.7	78.0
4'	71.8	71.6
5'	78.2	78.0
6'	63.0	62.8

Tab. 3.1.2-2 ¹³C-NMR Daten von 8-PCHG eigene Messung^{*1} und Literatur^{*2} [Kikuchi et al., 1983]; δ = ppm

2D-NMR-Experimente

Die oben ermittelten Resonanzlagen konnten mit 2D-NMR-Experimenten bestätigt werden. Mit Hilfe des HETCORs können im ^1H -NMR Spektrum die Signale der Glucose zugeordnet werden. In dem ^{13}C -NMR-Spektrum fallen die Signale C-6 und C-3' zusammen, während C-5' im tieferen Feld liegt. Im Gegensatz dazu beschrieb Benkrief et al. (1997), dass C-3' und C-5' dieselbe chemische Verschiebung aufweisen und C-6 im tieferen Feld liegt. Die in Tab. 3.1.2-2 (S.65) genannte Zuordnung konnte mittels HETCOR und Integralberechnung bestätigt werden.

MS

Zur Ermittlung der Molekülmasse und damit zur weiteren Bestätigung der Strukturaufklärung wurde ein ESI-MS Spektrum im positiven Modus aufgenommen. Bei 533 (m/z) ist das $[\text{M} + \text{Na}]^+$ -Signal zu sehen und bei 549 (m/z) befindet sich das weniger ausgeprägte $[\text{M} + \text{K}]^+$ -Signal. Demnach beträgt wie erwartet die Masse der Verbindung 510.49 (m/z). Die Abspaltung der Glucose aus dem Molekül führt zu einem Fragment mit der Masse 369 [M - Glucose]. Aus diesem Molekülteil wird weiterhin Wasser mit einer Masse von 18 (m/z) und Zimtsäure mit einer Masse von 147 (m/z) abgespalten. Das Fragment mit unbekannter Struktur weist eine Masse von 203 (m/z) auf.

Drehwert

Mit einer Konzentration von 2.97 mg/ml, gelöst in Methanol, liegt der Drehwert der Verbindung bei -32.2° . Der Wert stimmt mit Daten aus der Literatur überein.

$$[\alpha]_D^{20}$$

Eigene Daten	Kikuchi et. al. (1983)
-32.2° (c = 0.29, CH ₃ OH)	-30.5° (c = 1.09, CH ₃ OH)

Spezifischer Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der Absorptionsmaxima ($\lambda = 312$ nm, $\lambda = 225$ nm) diente der weiteren Strukturaufklärung und Reinheitsüberprüfung. Die $\log \epsilon$ -Werte stimmen annähernd mit der Literatur überein.

Eigene Daten (ϵ)	Kikuchi et. al. (1983) (ϵ)
4.240 ($\lambda = 312$ nm)	4.17 ($\lambda = 313$ nm)
4.032 ($\lambda = 225$ nm)	3.97 ($\lambda = 224$ nm)

CE

Nach der in Kapitel 9.2.2 (S.216) beschriebenen, kapillarelektrophoretischen Methode konnte D-Glucose als Bestandteil des Moleküls ermittelt werden. L-Glucose konnte ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz im ^1H - NMR-Spektrum weist darauf hin, dass Glucose in der β -Form vorliegt.

3.1.3 8-FERULOYLHARPAGID

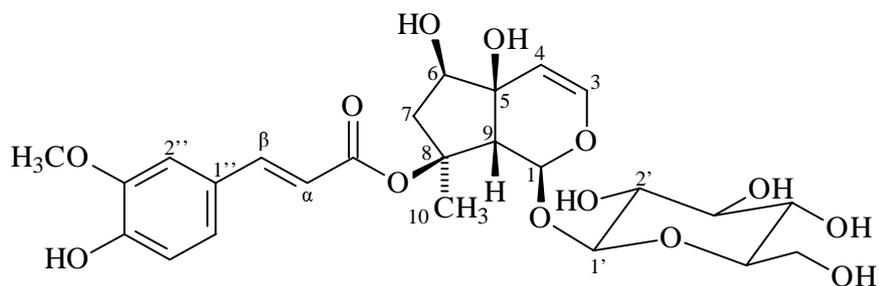


Abb. 3.1.3-1 Strukturformel von 8-Feruloylharpagid

Die Aufreinigung der MLCCC-Fraktion IIIB8 mittels präparativer HPLC führte zu 8-Feruloylharpagid (Abb. 2.3-1, S.54). Der R_f -Wert dieser Verbindung liegt bei 0.49. Im Dünnschichtchromatogramm des Extraktes liegt diese Zone unterhalb des 8-PCHGs und ist auf Grund der geringen Konzentration nur als Schatten zu erkennen (Abb.2.1.2-1, S.33). Es färbt sich wie die anderen Iridoide mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz rot.

Im HPLC-Chromatogramm erscheint der Peak mit 17.4 min kurz hinter dem 8-PCHG Signal (Abb. 2.1.3-1, S.36). Infolge des gebundenen Ferulasäureanteils liegt das Maximum im UV-Spektrum dieser Verbindung bei 326 nm.

Das 8-Feruloylderivat des Harpagids ist als Struktur bereits bekannt. 1999 isolierten Yi-Ming et al. 8-Feruloylharpagid aus den Wurzeln von *Scrophularia ningpoensis*, einer chinesischen Heilpflanze aus der Familie der Scrophulariaceae.

Die Isolierung aus einem Teufelskrallen-Extrakt wird in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Infolge der engen verwandtschaftlichen Beziehung der Pedaliaceen zu den Scrophulariaceen, beide gehören zur Ordnung der Scrophulariales, wundert es auch nicht, dieses Harpagid-Derivat in einer Harpagophytum-Art zu finden.

Mittels spektroskopischer Methoden konnte die Struktur aufgeklärt werden. Die hier gewonnenen Daten stimmten mit den Daten von Yi-Ming et al. (1999) überein. Auf Grund gerätespezifischer Parameter oder unterschiedlicher Eichung liegen die chemischen Verschiebungen des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Yi-Ming et al. 0.15 ppm niedriger.

$^1\text{H-NMR}$

(Tab. 3.1.3-1, S.70)

Bei dem Vergleich der chemischen Verschiebungen des Spektrums der vorliegenden Verbindung mit denen des Harpagosids fällt auf, dass die Signale des Aglykons und des Glucosid-Restes übereinstimmen. Es liegt demnach wieder ein C-9 Iridoid vor, das über das C-1 des Iridoid Gerüsts mit einer β -Glucose verknüpft ist. Da dieses Spektrum mit einer höheren Feldstärke (400 MHz) als das des Harpagosids (200 MHz) aufgenommen worden ist, waren die Signale des H-6 und H-6' aufgelöst. Auf diese Weise konnte man die Kopplungskonstanten von H-6 zu H-7a ($J = 1.4$ Hz) und zu H-7b ($J = 4.4$ Hz) erkennen. Durch eine weitere Nachbearbeitung des Spektrums (vergl. Nuts, Kap. 9.3.2, S.218) konnte noch sichtbar gemacht werden, dass dieses Doppeldublett durch Fernkopplungen beeinflusst wird.

Unterschiede sind nur in dem aromatischen Bereich des Spektrums zu erkennen. Die beiden Dubletts mit einer chemischen Verschiebung von 6.33 ppm und 7.58 ppm und einer Kopplungskonstante von $J = 16.1$ Hz weisen auf eine olefinische Doppelbindung mit E-Konfiguration hin. Des Weiteren kann man die Signallage des AMX-Spinsystems eines 1, 3, 4-trisubstituierten Aromaten erkennen. Bei δ 7.17 ppm liegt das Signal für H-2'' des Aromaten, welches eine schwache Meta-Kopplung ($J = 2.0$ Hz) zu H-6'' (δ 7.06 ppm) zeigt. Das Signal des H-5'' liegt bei δ 6.79 ppm und zeigt eine ausgeprägte ortho-Kopplung ($J = 8.4$ Hz) zu H-6''. Zusätzlich erscheint noch bei δ 3.88 ppm ein Signal, das sowohl durch seine Resonanzlage als auch durch die Integration (3H) auf eine Methoxygruppe deutet. Der Vergleich mit den Resonanzlagen der unsubstituierten Kaffeesäure ergibt, dass das Signal des H-2'' der hier bearbeiteten Verbindung leicht ins Tieffeld verschoben worden ist (Δ 0.15 ppm). Durch die Methylierung der Hydroxylgruppe an Position 3 des Aromaten wird das benachbarte Proton (H-2') abgeschirmt und dessen Signallage in das tiefere Feld verschoben. Demnach scheint es sich bei dem aromatischen Substituenten um Ferulasäure zu handeln. Einen Vergleich mit den Spektren der Ferula- und Isoferulasäure [Dissertation Kruse, 2000] bestätigt diese Zuordnung. Die Resonanzlage stimmt mit denen der Ferulasäure überein.

¹ H	Feruloylharppagid* ¹ (CD ₃ OD, 400 MHz)	Feruloylharppagid* ² (CD ₃ OD, 400 MHz)
Ferulasäure		
α	6.33 d (16.0)	6.18 d (15.8)
β	7.58 d (16.1)	7.42 d (15.8)
2''	7.17 d (2.1)	7.01 d (1.6)
5''	6.79 d (8.4)	6.64 d (8.4)
6''	7.06 d (8.4 / 2.1)	6.90 dd (8.4 / 1.6)
7''	3.88 s	3.72 s
Iridoid		
1	6.17 d (1.3)	6.01 s
3	6.41 d (6.3)	6.25 d (6.4)
4	4.93 dd (6.4 / 1.5)	4.77 dd (6.4 / 1.4)
6	3.76 dd (4.4 / 1.4)	3.59 d (4.0)
7a	2.25 dt (15.2 / 1.4)	2.08 d (15.3)
7b	2.00 dd (15.1 / 4.4)	1.85 dd (15.3 / 4.0)
9	2.94 bs	2.76 s
10	1.51 s	1.35 s
Glucose		
1'	4.62 d (7.9)	4.46 d (7.9)
2'	3.22 dd (9.2 / 8.0)	3.05 t (9.1)
3'	3.39 t (8.8)	3.24 t (8.8)
4'	3.35	3.14 t (7.9)
5'	3.33	3.19 dd (5.7 / 2.0)
6'a	3.93 dd (12.1 / 2.2)	3.77 dd (12.1 / 2.0)
6'b	3.7 dd (12.2 / 5.5)	3.55 dd (12.1 / 5.7)

Tab. 3.1.3-1 ¹H-NMR- Datenvergleich von Feruloylharppagid; eigene Daten*¹ und Literatur*² [Yi-Ming et al., 1999]; δ = ppm, J = Hz

¹³C-NMR

(Tab. 3.1.3-2, S.71)

Entsprechend dem ¹H-NMR-Spektrum stimmen auch hier die Signallagen des Aglykons und des Glucosidteils (Tab. 3.1.3-2, S.71) mit denen des Harpagosids überein. 10 weitere Signale können dem Phenylpropansubstituenten zugeordnet werden. Bei 56.49 ppm erzeugt die Methoxygruppe ein Signal. Die chemischen Verschiebungen des aromatischen Bereiches gleichen denen der Kaffeesäure. Die Hochfeldverschiebung des C-2'' (Δ 4.3 Hz), die Tieffeldverschiebung des C-3'' (Δ 2.9 Hz) und die schwächeren Verschiebungen von C-4'' (1.5 Hz) und C-5'' (0.5 Hz) unterstützen die Annahme, dass sich die Methoxygruppe an Position 3 (Ferulasäure) und nicht an Position 4 (Isoferulasäure) des Aromaten befindet.

^{13}C	8-O-Feruloylharpagid ^{*1} (CD ₃ OD, 100 MHz)	8-O-Feruloylharpagid ^{*2} (CD ₃ OD, 100 MHz)
Ferulasäure		
CO	169.34	169.6
α	146.66	117.3
β	116.61	144.4
1 [“]	127.76	128.1
2 [“]	111.78	112.2
3 [“]	149.47	147.1
4 [“]	150.92	149.9
5 [”]	116.1	117.0
6 [“]	124.17	124.6
7 [“]	56.49	57.0
Iridoid		
1	94.74	95.2
3	143.95	144.4
4	106.89	107.4
5	73.48	73.9
6	78.21	78.2
7	46.36	46.8
8	88.42	88.9
9	55.75	56.2
10	22.7	23.4
Glucose		
1 [']	100.10	100.6
2 [']	74.63	75.2
3 [']	77.79	78.2
4 [']	71.84	72.3
5 [']	77.70	78.7
6 [']	63.03	63.6

Tab. 3.1.3-2 ^1H -NMR- Datenvergleich von Feruloylharpagid; eigene Daten ^{*1} und Literatur ^{*2} [Yi-Ming et al., 1999]; δ = ppm

2D-NMR-Experimente

Die Signalzuordnungen konnten über COSY, HSQC und HMBC-Experimente bestätigt werden. Infolge einer ^3J Kopplung im HMBC-Spektrum vom C-3[”] zu den Protonen der Methoxygruppe wird die Annahme bestätigt, dass es sich bei dem Substituenten um Ferulasäure handelt. Ebenso zeigt das HMBC-Spektrum durch eine ^3J Kopplung zwischen dem H-1 und dem C-1['], dass die Hydroxylgruppe am C-1['] der Glucose über das C-1 des Iridoid-Aglykons gebunden ist.

MS

Zur Ermittlung der Molekülmasse wurde ein ESI-MS im positiven und negativen Modus aufgenommen. Das Signal für $[M+Na]^+$ liegt im positiven Modus bei 563.2 m/z. Weitaus schwächer ist das $[M+K]^+$ Signal bei 579.2 m/z. Demnach ergibt sich für die Verbindung ein Molekulargewicht von 540.2. Das Signal für $[2M+Na]^+$ befindet sich bei 1103.1 m/z.

Das Molekulargewicht von 540.2 wird im negativen Modus durch das $[M-H]^-$ Signal bei 539.6 und das $[M]^-$ Signal bei 540.5 bestätigt. Bei 1079.3 befindet sich das Signal für $[2M]^-$ und bei 1080.3 für $[2M-H]^-$.

Drehwert

Mit einer Konzentration von 1.5 mg/mL, gelöst in Methanol, liegt der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ der Verbindung bei -40.8° . Eine spätere HPLC Untersuchung der Substanz zeigt, dass sie nicht stabil ist und sich in mehrere Substanzen zersetzt. Die Abweichung des hier gemessenen Drehwertes könnte auf das Vorliegen von Zersetzungsprodukten wie z.B. Harpagid zurückzuführen sein. Harpagid besitzt nach Kajimoto et al. (1989) einen Drehwert von -135.7° (CH_3OH , c 0.5) und würde den Drehwert des 8-Feruloylharpagids weiter in den negativen Bereich verschieben.

$[\alpha]_D^{20}$

Eigene Daten	Yi-Ming et al. (1999)
-40.8° (c = 0.15, CH_3OH)	-24.2° (c = 0.231, CH_3OH)

CE

Nach der in Kapitel 9.2.2 (S.216) beschriebenen, kapillarelektrophoretischen Methode konnte D-Glucose als Bestandteil des Moleküls ermittelt werden. L-Glucose konnte ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstante von $J = 7.9$ Hz im 1H -NMR-Spektrum weist darauf hin, dass Glucose in der β -Form vorliegt.

3.1.4 8-O-CINNAMOYLMYOPOROSID

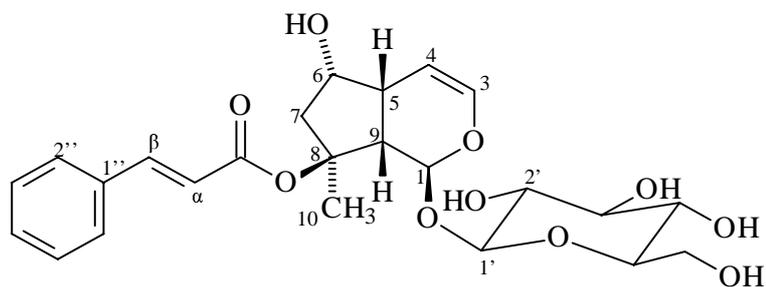


Abb. 3.1.4-1 Strukturformel des 8-O-Cinnamoylmyoporosids

8-O-Cinnamoylmyoporosid wurde aus der MLCCC Fraktion IB4 mittels präparativer HPLC isoliert (Abb. 2.3-1, S.54). Auf Grund der geringen Konzentration ist es dünnschichtchromatographisch im Extrakt kaum zu erkennen. Isoliert aufgetragen hat die Verbindung einen R_f -Wert von 0.75 und zeigt mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz die typische rote Färbung der anderen Iridoidglykoside (Abb.2.1.2-1, S.33). Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) eluiert sie kurz nach Harpagosid und gibt im UV-Spektrum ein Maximum bei 280 nm.

8-O-Cinnamoylmyoporosid konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus pflanzlichem Material isoliert werden. Das 6-Epimer, das Lateriosid, wurde bereits 1981 von Swiatek et al. aus *Scrophularia laterifolia* (Scrophulariaceae) isoliert. Ebenso wurde es 1982 von Seifert et al. aus *Verbascum nigrum* (Scrophulariaceae) und von Parda et al. 1998 aus *Verbascum thapsus* (Scrophulariaceae) gewonnen.

Bedenkt man die enge Beziehung der Scrophulariaceen zu den Pedaliaceen, hätte man auch in *Harpagophytum procumbens* das Vorkommen von Lateriosid vermuten können. Außerdem wurde Lateriosid neben Harpagosid aus einigen *Verbascum* Arten [Seifert et al., 1985] isoliert. Bei dem Vergleich der NMR-Spektren der hier isolierten Substanz mit Lateriosid stimmen jedoch die chemischen Verschiebungen der Protonen nicht überein.

Die Struktur-Aufklärung dieser Verbindung wird im weiteren Verlauf an Hand spektroskopischer Methoden noch näher ausgeführt.

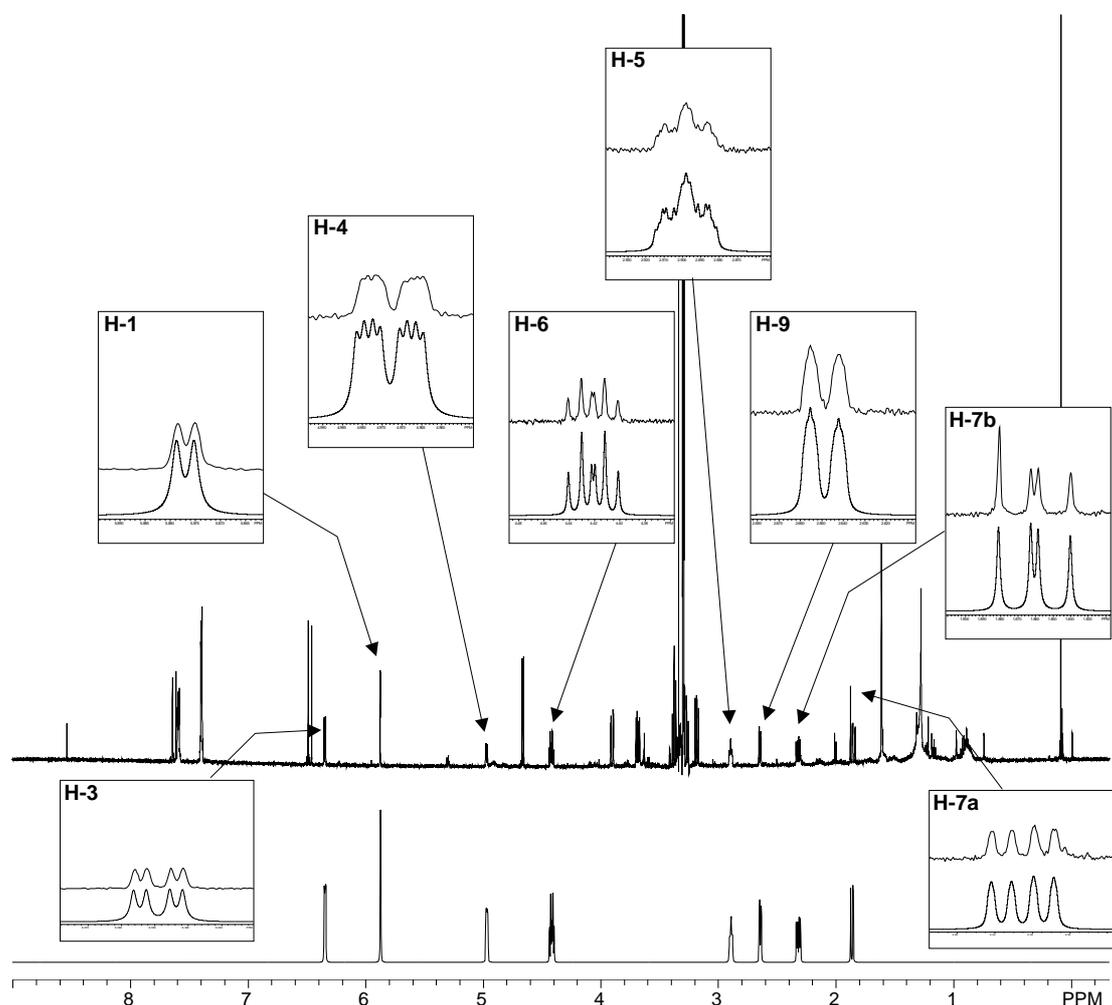


Abb. 3.1.4-2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 8-Cinnamoylmyoporosid (600 MHz, CD_3OD); gemessenes Spektrum (oben) und simuliertes Teilspektrum (unten)

Das Protonenspektrum (Abb. 3.1.4-2) von 8-O-Cinnamoylmyoporosid zeigt die Anwesenheit einer Zimtsäure und einer β -Glucose. Im Vergleich mit dem Harpagosid-Spektrum stimmen diese Strukturmerkmale in chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten mit denen des Harpagosids überein.

Die Signale der Protonen des Aglykons weisen zwar charakteristische Merkmale eines Iridoids auf, sind jedoch im Vergleich zu den Signalen des Harpagosid in ihrer Resonanzlage verschoben und zeigen andere Aufspaltungsmuster. H-1 ist um 0.3 ppm ins höhere Feld verschoben. Die Verschiebung von H-3 ist mit 0.07 ppm in das Hochfeld nicht ausgeprägt, zeigt aber im Gegensatz zu dem entsprechenden Signal des Harpagosids eine Aufspaltung zu einem Doppeldublett. H-4 zeigt ebenfalls eine komplexere Aufspaltung zu einem ddd.

¹ H	8-O-Cinnamoyl-myoporosid (CD ₃ OD, 600MHz)	8-O-Acetylmyoporoside (D ₂ O, 250MHz)	Lateriosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	Ajugosid (D ₂ O)
Iridoid				
1	5.87 d (1.9)	5.83 d (1.5)	5.97 d (1.0)	5.93 s
3	6.34 dd (6.5/ 2.3)	6.32 dd (6.5/ 2.0)	6.24 dd (2.0/6.0)	6.32 dd (6.5/ 1.5)
4	4.96 ddd (6.5/2.5/1.2)	5.00 dd (6.5/ 1.5)	4.72	4.6-5.0
5	2.89 m (8.1/6.2/2.5/2.3/1.2)	2.89 m (7.6/2/1.5)	2.80 – 3.02	2.91 m
6	4.42 dd (6.5/6.2)	4.47 m (11.2/6/5.8)	4.06 m	4.18 m
7a	2.32 m (13.2/ 6.5/1.2/0.7)	2.30 dd (13.5/ 5.8)	2.06 – 2.42 m	2.22 m
7b	1.86 dd (13.2/10.7)	1.84 bd (13.5/ 11.2)		
9	2.64 m (8.1/1.9/1.2/0.7)	2.69 dd (7/1.5)	2.80 – 3.02 m	2.91 d
10	1.61 s	1.53 s	1.62 s	1.47 s
OAc		2.03 s		
Cinnamoyl				
2''	7.58 m			
3''	7.39 m			
4''	7.39 m			
5''	7.39 m			
6''	7.58 m			
α	7.62 d (16.1)			
β	6.47 d (16.0)			
Glucose				
1'	4.66 d (7.8)	4.76 d (7.5)		
2'	3.37 t (9.0)			
3'	3.31 m			
4'	3.31 m			
5'	3.31 m			
6'a	3.90 dd (12.0/2.3)			
6'b	3.68 dd (12.0/6.3)			

Tab. 3.1.4-1 ¹H-NMR-Datenvergleich von 8-Cinnamoylmyoporosid mit 8-O-Acetylmyoporosid [Boros et al., 1990], Lateriosid [Swiatek et al., 1981] und Ajugosid [Guiso et al., 1974] ; kursiv gedruckte Kopplungskonstanten sind mit Hilfe der Simulation ermittelt worden; δ = ppm, J = Hz; Formeln der Vergleichssubstanzen s. Abb. 3.1.4-3 (S.75)

Auffällig ist die Tieffeld-Verschiebung des H-6 zu δ 4.42 ppm. Das entspricht einer Differenz zu dem H-6 des Harpagosids von 0.66 ppm. Weitere Verschiebungen der Resonanzlagen treten bei H-7b (Δ 0.14 ppm) und H-9 (Δ 0.29 ppm) auf.

Zusätzlich erscheint in diesem Spektrum ein Multipllett bei 2.89 ppm. Mittels einer ¹H-¹H-Korrelation konnte durch crosspeaks mit H-3, H-4, H-6 und H-9 gezeigt werden, dass dieses Signal durch ein Proton am C-5 des Iridoidgerüsts erzeugt wird. Demnach fehlt an dieser Stelle im Gegensatz zu den bisher isolierten Iridoiden (Harpagosid, 8-PCHG, 8-Feruloylharpagid) die Hydroxylgruppe. Die fehlende Hydroxylgruppe erklärt somit die oben erwähnten Verschiebungen der Signale und das vorhandene Proton erklärt die weiteren Aufspaltungen des H-3, H-4, H-6 und H-7b. Die Kopplungskonstanten der korrelierenden Protonen konnten mit Hilfe einer Simulation (NUTS-Software), wie in Abb. 3.1.4-2 (S.74) gezeigt, bestätigt werden.

Die chemischen Verschiebungen des vorliegenden Spektrums wurden daraufhin mit denen des Lateriosids, ein 8-O-Cinnamoylderivat des Ajugols (Formel: Abb. 3.1.4-5, S.80), verglichen. Bei diesem Spektrum erscheint ebenfalls ein Signal des H-5 bei δ 2.84 ppm, womit die Annahme eines Desoxyderivates an Position C-5 weiter bekräftigt wird. Ebenso stimmen die Aufspaltung des H-3 zum Doppeldublett und eine große Kopplungskonstante des H-9 ($J = 8.4$ bei Pardo et al., 1998) überein. Die Protonen H-4, H-6, H-7b und H-9 des Lateriosids zeigen jedoch eine andere Resonanzlage.

Die ausgeprägte Tieffeldverschiebung des Signals des H-6 der vorliegenden Struktur um Δ 0.36 ppm gegenüber dem H-6 des Lateriosids, deutet auf eine Konfigurationsänderung an der Position C-6 hin. Eine ähnliche Differenz von Δ 0.29 ppm ergibt sich bei dem Vergleich von 8-O-Acetylmyoporosid (6- α -OH) und Ajugosid (6- β -OH), wobei die Position des Protons der α -ständigen OH-Gruppe im tieferen Feld liegt. Der Vergleich dieser Verschiebungen und die Übereinstimmung der Resonanzlagen mit 8-O-Acetylmyoporosid (6- α -OH), bestätigt die Annahme, dass die hier vorliegende Verbindung am C-6 eine α -ständige Hydroxylgruppe besitzt. Weitere Aufschlüsse zu der Konfiguration des Moleküls liefern das ^{13}C -NMR-Spektrum und die NOE-Experimente.

^{13}C -NMR

(Tab. 3.1.4-2, S.78)

Das Signal des C-5 der hier vorliegenden Verbindung ist im Vergleich mit Harpagosid infolge der fehlenden Abschirmung durch die Hydroxylgruppe um Δ 36.2 ppm in das höhere Feld verschoben worden. Das entsprechende Signal des Lateriosidspektrums zeigt nur eine Differenz von Δ 31.8 ppm [Chaudhuri et al., 1980] zu Harpagosid. Ebenso wie die Resonanzlage des H-5 sind gegenüber dem Lateriosid die Signale des C-3 (Δ 0.6 ppm), C-4 (Δ 2.8 ppm), C-6 (Δ 4.8 ppm) und C-7 (Δ 1.3 ppm) ins höhere Feld verschoben worden. Auf Grund der Annahme, dass es sich bei der hier isolierten Verbindung um das 6-OH-Epimer des Lateriosids handeln könnte, wurden die chemischen Verschiebungen des Aglykons mit denen des 8-O-Acetylmyoporosids verglichen. Die Signale des 8-O-Cinnamoylmyoporosids stimmen mit denen des Acetylmyoporosids überein, während das Spektrum des Lateriosids dem des Ajugosids gleichen. Die Differenz des C-8 zwischen 8-O-Cinnamoylmyoporosid und Acetylmyoporosid von Δ 0.9 ppm kommt durch den unterschiedlichen Substituenten der Hydroxylgruppe an dieser Position zu Stande.

Damtoft et al. analysierte 1981 die relative Konfiguration von Iridoiden mittels ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Bezüglich der Konfiguration an der Position 6 des Aglykons beobachtete er an C-4 substituierten Iridoiden von einer 6- β -substituierten Hydroxylgruppe zu

einer 6- α -Stellung im ^{13}C -NMR-Spektrum eine C3-Verschiebung von ca. $\Delta +1.5$ ppm und eine C-4 Verschiebung von ca. $\Delta -3.0$ ppm. Weiterhin ergab die Differenz der Resonanzlagen von δ C3 (ppm) und δ C4 (ppm) für 6 β -OH substituierte Iridoide einen kleineren Wert als für 6 α -OH substituierte Iridoide. Die Tieffeldverschiebung des C-1 von 6 β -OH Iridoide zu 6 α -OH Iridoide um 0.6 - 4.9 ppm ist bei C4 unsubstituierten Iridoiden nicht so ausgeprägt wie bei C4 substituierten und wird in diesem Fall nicht weiter beachtet. Die C-3-Verschiebung von Lateriosid zu 8-O-Cinnamoylmyoporosid beträgt $\Delta +0.6$ ppm und die C4-Verschiebung $\Delta -2.8$ ppm. Die Differenz der chemischen Verschiebungen von C3 und C4 ist bei dem 6 β -OH-Derivat, Lateriosid ($\Delta 37.4$), kleiner als bei 8-O-Cinnamoylmyoporosid ($\Delta 40.8$), dem 6 α -OH-Derivat. Die Untersuchungen von Damtoft et al. (1981) bestätigen somit unsere Zuordnung der Konfiguration.

Mit weiteren Untersuchungen von ^1H -NMR-Spektren verschiedener Iridoide konnte Damtoft zeigen, dass eine schwache Kopplung zwischen H-5 und H-6 ($J < 1\text{Hz}$) und eine größere Kopplung zwischen H-1 und H-9 ($J > 8\text{ Hz}$) auf eine β -Position der OH-Gruppe an der Position 6 hinweist. H-5 ist in dem hier vorliegenden Spektrum nur als Multiplett erkennbar. Durch Simulation konnte jedoch für $J_{5,6}$ eine Kopplungskonstante von 6.2 Hz ermittelt werden. Die Kopplungskonstante zwischen H-9 und H-1 ist 2.0 Hz, eine stärkere Kopplung ist zwischen H-5 und H-9 sichtbar ($J = 8.0\text{ Hz}$). Diese Werte konnten ebenfalls mittels einer Simulation bestätigt werden. Der kleine Wert für $J_{5,6}$ bestätigt die Annahme einer 6- α -OH Gruppe, während die kleinere Kopplungskonstante für $J_{1,9}$ auf eine 6- β -OH-Gruppe hindeutete. Diese Berechnungen von Damtoft et al. erfolgten immer an Hand eines Epimeren-Paares und dienten somit mehr zur Unterscheidung zwischen α - und β - Formen. Aus dem Grund ist es mittels dieser Berechnungen und den chemischen Verschiebungen bei nur einem vorliegenden Epimer nicht mit letzter Sicherheit möglich, Rückschlüsse auf dessen Konfiguration zu ziehen. Diese Werte können allerdings, wie im Verlauf dieser Ausführung gezeigt, Hinweise auf die vermutete Konfiguration geben und sind in sich schlüssig.

Die fehlende OH-Gruppe an der Position C-5 des Aglykons wird noch durch Untersuchungen von Bianco et al. (1981) bestätigt, der ^{13}C -NMR-Spektren von 24 Iridoiden verglich. Die chemische Verschiebung des Kohlenstoffes C-5 hydroxylierter Verbindungen liegt zwischen 74.61 und 64.17 ppm, während das Signal für nicht hydroxylierte Iridoide viel weiter im Hochfeld, zwischen 30.75 ppm und 43.32 ppm, liegt. Im Falle einer 5-Hydroxylierung ergibt sich für C5 ein α -Effekt (+31.09 - +32.74 ppm), C9 ein β -Effekt (+7.21 - +8.32 ppm), C8 ein γ -Effekt (-1.16 - -3.21 ppm) und für C7 ein δ -Effekt (-1.86 - -2.83 ppm). Bei 8-O-Cinnamoylmyoporosid und Harpagosid ergeben sich für den α -Effekt + 36.2 ppm, den

β -Effekt +6.1 ppm, den γ -Effekt -0.1 ppm und für den δ -Effekt -1-3 ppm. Die leichte Abweichung der Effekte könnte auf Grund der unterschiedlichen Konfiguration am C-6 von Harpagosid und 8-O-Cinnamoylmyoporosid zu Stande kommen. Die Tendenz der Werte bestätigt allerdings die fehlende Hydroxylgruppe am C-5.

^{13}C	8-O-Cinnamoylmyoporosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	8-O-Acetylmyoporosid (CD ₃ OD)	Lateriosid (CD ₃ OD, 25.2 MHz)	Ajugosid (D ₂ O)
Iridoid				
1	94.2	94.1	94.59	94.5
3	142.1	142.0	141.47	140.5
4	101.3	101.3	104.05	104.3
5	37.2	37.1	41.61	40.6
6	72.0	71.9	76.76	76.4
7	47.5	47.4	48.81	47.7
8	88.9	88.0	90.09	90.1
9	49.5	49.3	49.42	48.4
10	22.6	22.4	23.00	22.5
CO		173.3		174.8
CH ₃		22.2		22.4
Cinnamoyl				
1''	135.7		135.59	
2''	129.3		129.82	
3''	130.0		129.04	
4''	131.6		131.27	
5''	130.0		129.04	
6''	129.3		129.82	
α	146.2		145.72	
β	120.0		120.13	
CO	168.7		168.51	
Glucose				
1'	100.2	100.0	99.98	99.1
2'	74.8	74.8	74.63	73.6
3'	78.2	78.0	77.84	76.6
4'	71.7	71.6	71.54	70.5
5'	78.1	78.0	77.84	77.1
6'	63.1	62.9	62.95	61.6

Tab. 3.1.4-2 ^{13}C -NMR-Datenvergleich von 8-Cinnamoylmyoporosid mit 8-O-Acetylmyoporosid [Boros et al., 1990], Lateriosid [Swiatek et al., 1981] und Ajugosid [Boros et al., 1990]; δ = ppm

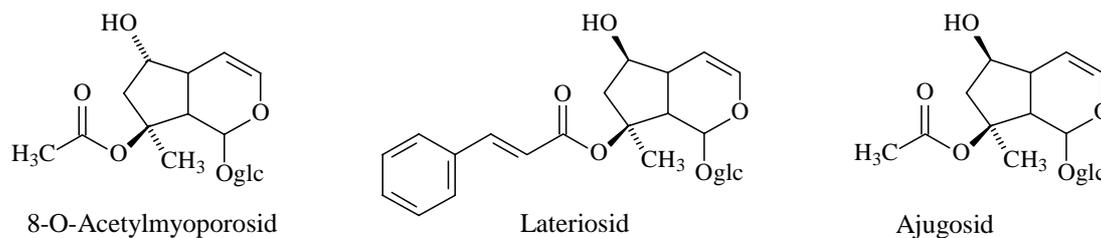


Abb. 3.1.4-3 Formeln der in den Tabellen 3.1.4-1 (S.75) und 3.1.4-2 (S.78) angegebenen Vergleichssubstanzen

NOE-Effekt

Bei einem NOE-Experiment (Nuclear Overhauser Effekt) wird auf die Resonanzfrequenz eines Protons eingestrahlt, um die räumliche Nähe von weiteren Protonen nachzuweisen. Dieses Experiment kann weiterhin Aufschluss darüber geben, welche relative Konfiguration die Protonen zu einander haben.

Es wurde auf die Protonen H-1, H-5, H-6, H-7a, H-9, H-10 und H-1' eingestrahlt. In der folgenden Tabelle ist aufgeführt, welche Protonen jeweils mit einem positiven NOE reagieren:

Eingestrahltetes Proton	Protonen mit positivem NOE
H-1	H-9, H-10, H-1'
H-5	H-6, H-9
H-6	H-5, H-7a, H-9
H-7a	H-6, H-7b
H-9	H-1, H-5, H-6
H-10	H-1
H-1'	H-1, H-2', H-3'

Diese Experimente zeigen, dass sich die Protonen H-5, H-6, H-7a und H-9 in räumlicher Nähe zueinander befinden. Auf Grund der Lage dieser Protonen im Molekül liegt nahe, dass sie dieselbe Ausrichtung in Bezug auf den Iridoidring aufweisen. Ebenso liegen die Protonen der Methylgruppe und des H-1 auf derselben Seite des Moleküls. Die Reaktion von H-1 und H-9 beruht auf der räumlichen Nähe dieser Protonen im Molekül zueinander. Würden beide Protonen dieselbe Ausrichtung zeigen, müsste infolge der Einstrahlung auf H-9 auch die Methylgruppe eine Reaktion zeigen. Da sie nicht reagiert, muss H-9 eine andere Lage besitzen als H-10 und H-1.

Die Auswertung der NOE-Experimente und die Annahme, dass sich die Hydroxylgruppe am C-1 wie bei allen Iridoiden in der β -Stellung befindet, führten zu der oben in der Formel (Abb. 3.1.4-1, S.73) dargelegten Konfiguration des Moleküls.

Mittels der zweidimensionalen Experimente, COSY, HSQC und HMBC, konnte die getroffene Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffatome bestätigt werden. Wie oben bereits erwähnt, war es mit Hilfe dieser Experimente möglich, das Signal für das Proton H-5 korrekt zuzuordnen.

Konfiguration von Ajugol-Derivaten und Myoporosid

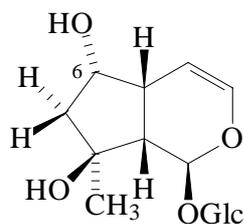


Abb. 3.1.4-4
Myoporosid

Ajugol und Ajugosid wurden 1974 von Guiso et al. (1974) isoliert und ihre Struktur aufgeklärt. Mittels Horeau's Methode wurde an der Position C6 eine α -Konfiguration ermittelt und darauf dem Ajugol vorerst die in Abb. 3.1.4-4 abgebildete Struktur zugewiesen. 1975 isolierten Bianco et al. (1975)

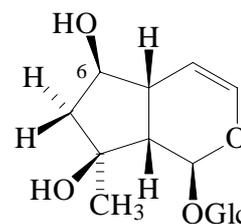


Abb. 3.1.4-5
Ajugol

Mioporosid (Myoporosid). Er erkannte dieses Molekül als Epimer des Ajugols. Mit Hilfe der Horeau's Methode und mittels Spektrenvergleich zu Ajugol ermittelte er für die OH-Gruppe an der Position C6 die β -Konfiguration. Somit wurde dem Myoporosid die Struktur in Abb. 3.1.4-5 zugeordnet. Die Konfiguration einiger Derivate dieser Verbindungen wurde durch den Vergleich mit diesen Spektren festgelegt. Das betraf unter anderem die Struktur des Lateriosids, das 1981 von Swiatek et al. aus *Scrophularia laterifolia* isoliert werden konnte. Nach einem Vergleich der NMR-Spektren wurde Lateriosid als Ajugol Derivat erkannt und infolge dessen wurde der Hydroxylgruppe am C6 eine α -Position zugewiesen. 1982 isolierte Agostini 5-Deoxylamiosid und ermittelte für diese Struktur die β -Konfiguration der 6-OH-Gruppe. Ein Vergleich der NMR-Spektren mit Ajugol zeigte, das eine typische Tieffeldverschiebung des C-1 von einer 6β -OH Position zu einer 6α -OH-Position fehlte. Außerdem zeigte Ajugol im Gegensatz zu allen anderen α -Epimeren eine zu kleine Kopplungskonstante zwischen H-1 und H-9. Nach weiteren Experimenten korrigierten sie die Struktur des Ajugols zu dem β -Epimer (Abb. 3.1.4-5), entsprechend dem 5-Deoxyharpagid. Von Damtoft et al. erfolgte 1982 die Revision der Struktur von Ajugol (Abb. 3.1.4-5), Myoporosid (Abb. 3.1.4-4) und Lateriosid (Abb. 3.1.4-3, S.78).

Die Konfigurationsprobleme der Position 6 von Myoporosid und Ajugol erschwerte die korrekte Bestimmung der Konfiguration des hier isolierten Iridoids. Bis einschließlich 1982 wurde Ajugol als 6α -OH Epimer und Myoporosid als 6β -OH Epimer beschrieben [Guiso et al., 1974; Bianco et al., 1975; Swiatek et al., 1981; Chaudhuri et al., 1980; Seifert et al., 1982; Damtoft et al., 1981]. Nach der Strukturrevision 1982 wurden Ajugol (6β -OH Epimer) und Myoporosid (6α -OH Epimer) größtenteils korrekt dargestellt [Agostini et al., 1982; Boros et al., 1990; Damtoft et al., 1982; Warashina et al., 1991]. Allerdings verließen sich Pardo et al. 1998 auf die Literatur vor 1982 und gaben der Position des C-6 von Ajugol und Lateriosid wiederum die α -Stellung. Seifert et al. (1985) gab ebenfalls die Struktur des Lateriosids als Myoporosid-Derivat wieder.

An Hand der NMR-Daten in Tab. 3.1.4-1 (S.75) ist zu erkennen, dass das hier isolierte Molekül ein Myoporosid Derivat und dass Lateriosid ein Ajugol-Derivat darstellt. Die Konfiguration des 8-O-Cinnamoyl-Derivates wurde an Hand der NMR-Spektren und der NOE-Experimente eindeutig bewiesen.

MS

Die Ermittlung der Molekülmasse erfolgte mittels ESI-MS im positiven Modus. Bei 501 m/z befindet sich das Signal für $[M+Na]^+$. Demnach hat das Molekül die erwartete Molekülmasse von 478. Mit dieser Masse bestätigt sich auch wieder der fehlende Sauerstoff gegenüber Harpagosid (16 m/z). Die Töchter des Molekülpeaks ergeben noch Signale bei 353 m/z, der durch die Abspaltung der Glucose entstanden sein könnte, und bei 203 m/z.

Spezifischer Drehwert

Der Drehwert der Verbindung (1.495 mg/mL in Methanol) liegt bei -28.6° . Die große Differenz zwischen dem Drehwert des Lateriosids gegenüber dem gemessenen für 8-O-Cinnamoylmyoporosid deutet bereits auf eine Konfigurationsänderung im Molekül hin.

$$[\alpha]_D^{20}$$

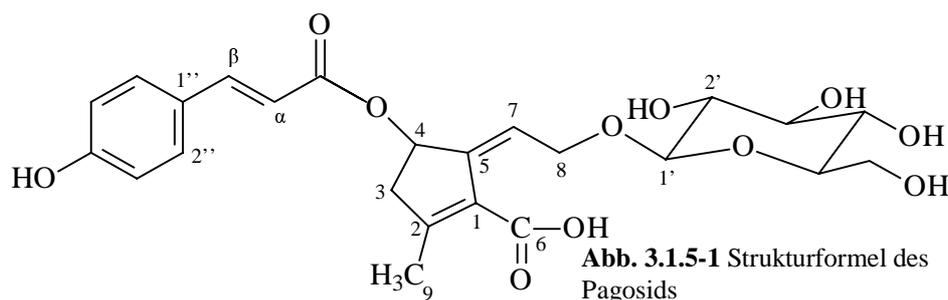
Eigene Daten	Lateriosid Swiatek et al., 1981	Lateriosid Seifert et al. (1982)
-28.6° (c = 0.15, CH ₃ OH)	-68.9° (c = 0.83, CH ₃ OH)	-68.9° (c = ?, CH ₃ OH)

CE

Nach der in Kapitel 9.2.2 (S.216) beschriebenen, kapillarelektrophoretischen Methode konnte D-Glucose als Bestandteil des Moleküls ermittelt werden. L-Glucose konnte ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstante von $J = 7.8$ Hz im ^1H - NMR-Spektrum weist darauf hin, dass Glucose in der β -Form vorliegt.

3.1.5 PAGOSID



Pagosid konnte aus der Ethylacetat-Fraktion (Fraktion B) mittels MLCCC (Abb. 2.3-1, S.54) durch Vereinigung der Unterfraktionen 64-76 zu IIIB5 gewonnen werden (MLCCC III, Kap. 9.1.4, S.213). Die Substanz lag in genügend hoher Reinheit vor, so dass eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC nicht notwendig war.

Dünnschichtchromatographisch fällt die Substanz bei einem R_f -Wert von 0.66 durch ihre blaue Färbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz auf. Im Extrakt kann man diese Zone nicht beobachten, da Pagosid von Isoacteosid und Acteosid überdeckt wird (Abb. 2.1.2-1, S.33). Die blaue Färbung durch die Reaktion mit Anisaldehyd-Schwefelsäure weist darauf hin, dass es sich weder um eine Iridoid- noch um eine Phenylethanoidstruktur handelt, die bisher aus diesem Extrakt isoliert worden sind. Die bisher isolierten Iridoidglykoside färbten sich mit dem Detektionsmittel rot, die Phenylethanoide grün.

Pagosid erscheint im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) bei einer Retentionszeit von 18.7 min nach dem 6'-O-Acetylacteosid-Signal. Das Maximum im UV-Spektrum liegt bei 312 nm. Der Verlauf des UV-Spektrums und die Lage des Maximums bei 312 nm ähneln dem Spektrum von 8-PCHG und weisen somit darauf hin, dass p-Cumarsäure das Chromophor bildet.

Die oben dargestellte Verbindung konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus pflanzlichem Material isoliert werden und erhielt den Namen Pagosid. Die Struktur gleicht dem Harpagogenin (Abb. 3.1.5-2), welches von Vanhaelen et al. (1981) enzymatisch und hydrolytisch aus Harpagid und Harpagosid dargestellt werden konnte.

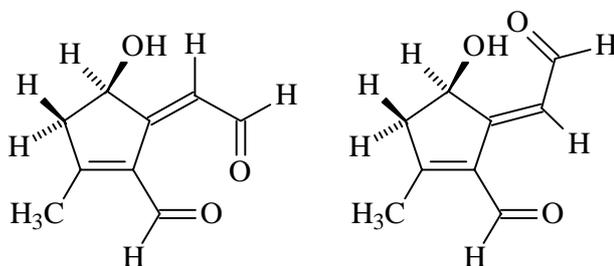


Abb. 3.1.5-2 Strukturen des Harpagogenins

Sie vermuteten, dass Harpagogenin im Magen als aktiver Metabolit freigesetzt wird

und für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich ist. Vanhaelen et al. gelang die

Strukturaufklärung mittels MS-Daten, ^1H -NMR-Daten, UV- und IR-Spektrum. Der Vergleich der Signalzuordnungen im ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Substanz mit denen von Harpagogenin (Tab. 3.1.5-1, S.87) bestätigte zum Teil unsere Ergebnisse. ^{13}C -Daten standen nicht zur Verfügung. Zu weiteren Verbindungen mit ähnlicher Struktur gehören z.B. Nepetariasid, ein Cyclopentanderivat aus *Nepeta cataria*, Lamiaceae [Murai et al., 1987] und Crescentine I-III, Cyclopentenderivate aus *Crescentia cujete*, Bignoniaceae [Kaneko et al., 1997]. Auch bei diesen Verbindungen liegt der Lactonring in der geöffneten Form vor. ^1H - und ^{13}C -Daten des Crescentin I unterstützen ebenfalls die hier getroffenen Zuordnungen (Tab. 3.1.5-1, S.87; Tab. 3.1.5-2, S.89).

Die Bezifferung des Pagosids, wie in Abb. 3.1.5-1 (S.82) gezeigt, erfolgte nach Hellwinkel (1974). Zur Vereinfachung wird im Verlauf der Strukturaufklärung diese Bezifferung auch für den Vergleich mit anderen Verbindungen (z.B. 8-PCHG, Crescentin I, Harpagogenin) verwendet.

Wie bei dem Harpagogenin liegt die acetalische Struktur des „Iridoids“ in offener Form vor. Anstelle eines Aldehyds hat sich an der Position 1 eine Carbonsäure Funktion gebildet. Im Gegensatz zum Harpagogenin ist an der Hydroxylgruppe des C-8 des Pagosids eine Glucose gebunden. Ebenso wie bei den Iridoiden ist das Aglykon mit einem Zimtsäurederivat verknüpft. Wie bei 8-PCHG liegt hier eine p-Cumarsäure vor. Die aromatische Carbonsäure ist jedoch nicht über die Hydroxylgruppe am C-2, sondern, wie bei einigen Ajugol-Derivaten [Boros et al., 1990], über die des C-4 verknüpft. Vermutlich ist die Hydroxylgruppe am C-2 unter Wasserabspaltung und Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 verloren gegangen. Der dadurch entstandene Cyclopentenring liegt auch bei Harpagogenin vor. Auch die Hydroxylgruppe an der Position C-5 ist nicht mehr vorhanden. Anstelle dessen erscheint zwischen C-5 und C-7 eine Doppelbindung.

Die Struktur von Pagosid wurde mittels spektroskopischer Daten (^1H -NMR, ^{13}C -NMR und 2D-NMR-Experimente) ermittelt. Die Resonanzlagen wurden mit denen des Harpagogenins, Crescentins I und denen des 8-PCHGs verglichen (Tab.3.1.5-1, S.87; Tab. 3.1.5-2, S.89).

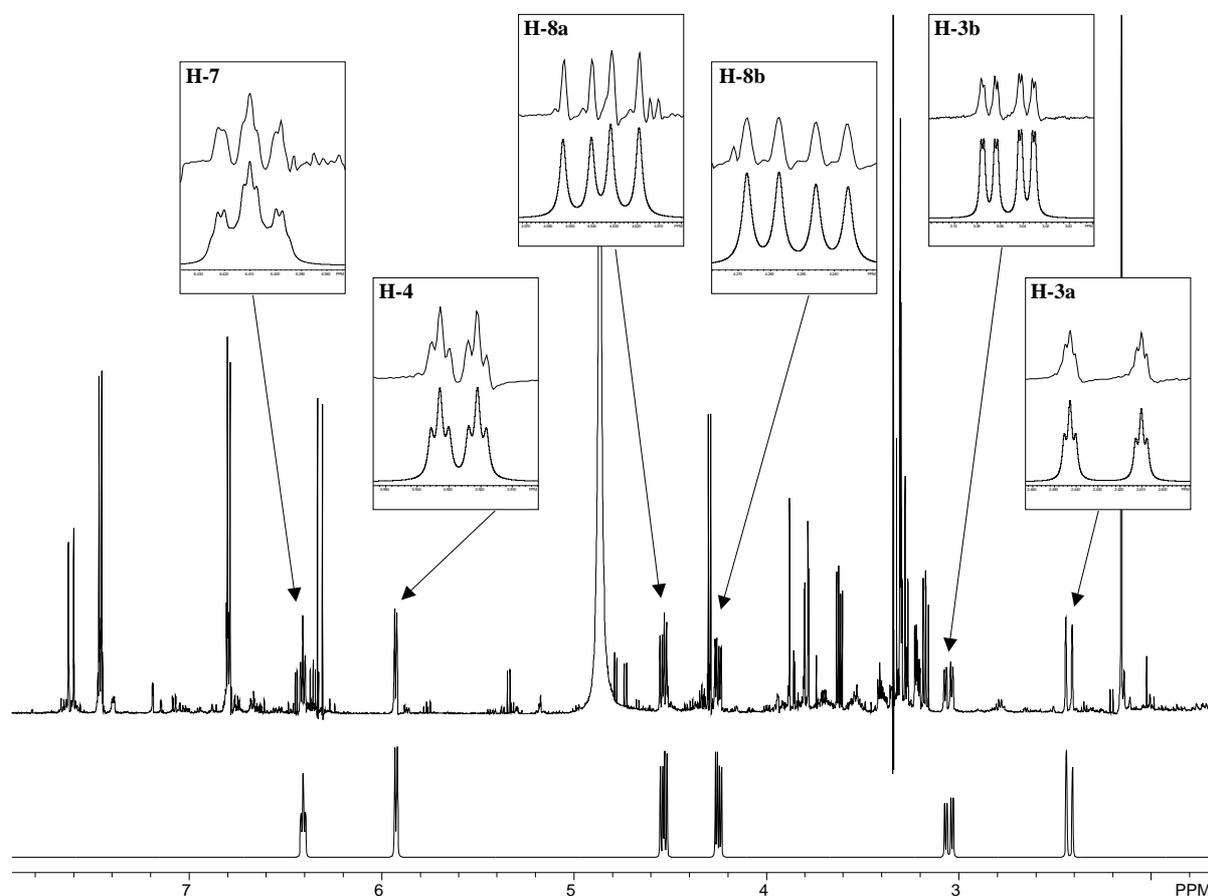


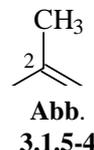
Abb. 3.1.5-3 ¹H-NMR-Spektrum von Pagosid; gemessen (oben, 600MHz, CD₃OD) und Simulation des Aglykons (unten)

Wie bereits an Hand des UV-Spektrums erwartet, kann man im Protonenspektrum den *p*-Cumarsäurerest zuordnen. Bei δ 7.62 ppm und δ 6.32 ppm erzeugen die Protonen der *E*-konfigurierten, olefinischen Doppelbindung zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von $J = 16.1$ Hz. Die Resonanzlage der Protonen des disubstituierten Aromaten erscheinen bei δ 7.46 ppm und δ 6.79 ppm mit einer großen ortho-Kopplung ($J = 8.5$ Hz) und einer kleineren meta-Kopplung ($J = 2$ Hz). Die Daten stimmen mit denen des 8-PCHGs überein.

Das Signal des anomeren Protons der Glucose erscheint bei 4.29 ppm. Die Kopplungskonstante von $J = 8.0$ Hz weist darauf hin, dass die Glucose in der β -Form vorliegt. Die weiteren Protonen konnten mit Hilfe der 2D-NMR-Experimente zugeordnet werden. Die Protonen H-1', H-6'a und H-6'b dieses Moleküls weisen gegenüber den Protonen des 8-PCHGs eine andere chemische Verschiebung auf. H-1' ist auf Grund der nicht mehr vorhandenen Acetalstruktur um Δ 0.32 ppm ins höhere Feld verschoben. Die Protonen H-6'a

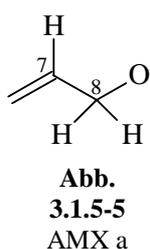
(Δ 0.14 ppm) und H-6'b (Δ 0.09 ppm) zeigen dagegen eine geringere Verschiebung ins höhere Feld. Demnach ist die Glucose über die Hydroxylgruppe am C-1 an das Aglykon verknüpft.

Weitere sieben Signale des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums können dem Aglykon zugeordnet werden. Bei δ 2.15 ppm liegt ein Singulett, das durch eine Methylgruppe (3H) erzeugt wird. Im Unterschied zu 8-PCHG ist dieses Signal um Δ 0.64 ppm ins Tieffeld verschoben. Diese Verschiebung wird durch die Nähe einer Doppelbindung hervorgerufen (vergl. Harpagogenin in Tab. 3.1.5-1, S.87) und führt zu dem Strukturelement in Abb. 3.1.5-4.

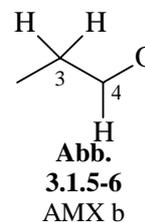


Des weiteren kann man die typischen Signale zweier AMX-Spinsysteme erkennen. Das Spinsystem AMX a (H-7, H-8a, H-8b) erzeugt Signale bei δ 6.41 ppm, δ 4.25 ppm und δ 4.54 ppm. Die Signale bei δ 5.92 ppm, δ 3.05 ppm und δ 2.42 ppm können dem Spinsystem AMX b zugeordnet werden. Die Zusammengehörigkeit der Protonen der Spinsysteme konnte durch COSY bestätigt werden.

Die Protonen der Methylengruppe des Systems AMX a (δ 4.25 ppm, δ 4.54 ppm) zeigen eine charakteristische geminale Kopplungskonstante von $J = -12.9$ Hz [Friebolin, 1999]. Die weitere Aufspaltung der Signale für H-8a und H-8b zu Doppel-doublets erfolgt durch das Proton H-7. Dabei zeigt H-8a eine stärkere Kopplung ($J = 7.7$ Hz) als H-8b ($J = 6.0$ Hz). Die Verschiebung der Resonanzlagen des Protons H-7 in das tiefere Feld wird durch die Doppelbindung zwischen der Position 5 und 7 verursacht. Die Tieffeldverschiebung der Signallagen der Methylengruppe erfolgt durch die Abschirmung einer Sauerstofffunktion in der Nähe des Spinsystems. Infolge der Resonanzlagen und der Kopplungskonstanten ist das Vorliegen des Strukturelements in Abbildung 3.1.5-5 wahrscheinlich.



Ebenso wie bei dem Spinsystem AMX a zeigen die Protonen der CH_2 -Gruppe des AMX b (H-3a, H-3b) eine ausgeprägte Kopplung mit einer Kopplungskonstante von $J = -19.7$ Hz. Schwächere Kopplungen ($J = 7.1$ Hz bei H-3b, $J = 1.7$ Hz bei H-3a) kommen durch das vicinale Proton H-4 zu Stande. Die Lage des H-4 im Tieffeld bei δ 5.92 ppm wird durch die Abschirmung einer Sauerstofffunktion verursacht. Die Signallagen der CH_2 -Gruppe bei δ 3.05 ppm und δ 2.42 ppm deuten daraufhin, dass weder eine Sauerstoffgruppe noch eine Doppelbindung mit dem Spinsystem verknüpft ist. Infolge dieser Datenlage wurde für das AMX b Spinsystem die Struktur in Abbildung 3.1.5-6 ermittelt.



Die Verknüpfung dieser drei Strukturelemente (Abb. 3.1.5-4 – 6, S.85) wurde durch die Bearbeitung der Spektren mit NUTS-Software (Simulation) und 2D-NMR-Experimente ermittelt.

Die Simulation der NMR-Daten (Abb. 3.1.5-3, S.84) der beiden Spinsysteme zeigt, dass sie noch durch weitere, entferntere Protonen aufgespalten werden. H-3a zeigt eine schwache Kopplung von $J = 1.3$ Hz, H-3b ebenfalls eine schwache von $J = 1.5$ Hz und H-4 zeigt noch eine kleine Kopplungskonstante von $J = 1.7$ Hz. Alle Kopplungen werden verursacht durch das Proton H-7, das infolge dieser Fernkopplungen ein dddd ausbildet. Für die Protonen der Methylengruppe (H-8a, H-8b) des AMX a Spinsystems konnte keine weitere Aufspaltung ermittelt werden. Das bedeutet, dass die beiden Spinsysteme nahe beieinander liegen. H-8a und H-8b scheinen infolge keiner weiteren Aufspaltungen weiter entfernt zu sein von AMX b als das Proton H-7.

Auffällig ist noch die für geminale Protonen große Kopplungskonstante von H-3a und H-3b von $J = -19.7$ Hz, die darauf hindeutet, dass sich diese Protonen innerhalb eines Ringsystems befinden [Friebolin, 1999]. Die Protonen H-7a und H-7b des 8-PCHGs (Kap. 3.1.2, S.63), die sich an einem Kohlenstoff des Cyclopentanrings befinden, weisen ebenfalls eine große Kopplungskonstante von $J = -15.1$ Hz auf. Die noch größere Kopplungskonstante bei den Protonen des Pagosids wird durch eine Vergrößerung des Torsionswinkels infolge einer Doppelbindung in dem Cyclopentanring verursacht. Die Resonanzlagen der analogen Protonen des Harpagogenins (Tab. 3.1.5-1, S.87) sind zwar ähnlich, jedoch koppeln die Protonen der CH₂-Gruppe mit nur einer kleinen Kopplungskonstanten von $J = 6.4$ Hz. Die Kopplungskonstante von $J = -19.8$ Hz steht in Übereinstimmung mit Literaturdaten ähnlicher Ringsysteme (Harpagosid Kap. 3.1.1, S.57; Boros et al., 1990), z.B. beträgt die Kopplungskonstante der Methylengruppe des Cyclopentenrings von Crescentin I $J = -18.1$ Hz. Eventuell bedarf es damit einer neuen Erhebung der Daten des Harpagogenins.

¹ H	Pagosid (CD ₃ OD, 600 MHz)	8-PCHG (Kap. 3.1.2, S.63)	Harpagogenin* ¹ CDCl ₃	Crescentin I* ² (D ₂ O, 400 MHz)
p-Cumarsäure				
α	6.32 d (16.1)	6.30 d (15.9)		
β	7.62 d (16.1)	7.59 d (15.9)		
2 ^{''}	7.46 d (8.5)	7.44 m		
3 ^{''}	6.79 d (8.5)	6.79 m		
5 ^{''}	6.79 d (8.5)	6.79 m		
6 ^{''}	7.46 d (8.5)	7.44 m		
Iridoid				
3a	2.42 ddd (19.7/1.7/1.3)	2.25 d (15.1)	3.02 dd (6.6/1.2)	2.04 d (18.1)
3b	3.05 ddd (19.7 / 7.1 / 1.5)	1.99 dd (15.1/4.4)	3.23 dd (6.5/1.1)	2.67 dd (18.1/4.6)
4	5.92 ddd (7.1 / 1.7/1.7)	3.74 m	5.04/4.98 dt (1.5)	3.91 dd (4.6/2.6)
5				2.64 m
7	6.41 ddd (7.7/6.0/1.7/1.5/1.3)	4.92 dd (6.4/1.6)	7.34 dd (1.6/1.6)	1.52 dt (13.9/6.8)
8a	4.54 dd (12.9 / 7.7)	6.40 d (6.4)	9.71 d (2.4)	1.39 dt (13.9/6.8)
8b	4.25 dd (12.9 / 6.0)			3.45 t (6.8), 2H
9	2.15 s	1.51 s	2.40 s	1.69 s
Glucose				
1'	4.29 d (8.0)	4.61 d (7.8)		
2'	3.17 dd (9.0 / 7.9)	3.21 dd (8.9/7.7)		
3'	3.28 t (9.3)	3.37 t (8.9)		
4'	3.32 t (8.9)	3.29		
5'	3.32 ddd (9.4 / 5.5 / 2.3)	3.35		
6'a	3.79 dd (12 / 2.2)	3.93 dd (12.1/2.0)		
6'b	3.62 dd (12.0 / 5.3)	3.71 m		

Tab. 3.1.5-1 NMR-Datenvergleich von Pagosid mit 8-PCHG, Crescentin I und Harpagogenin; die Bezifferung von 8-PCHG und Harpagogenin erfolgte analog der Bezifferung des Pagosids; kursiv gedruckte Kopplungskonstanten sind mittels Simulation ermittelt worden; *¹Vanhaelen et al. (1981), *²Kaneko et al. (1997) Δ = ppm, J = Hz

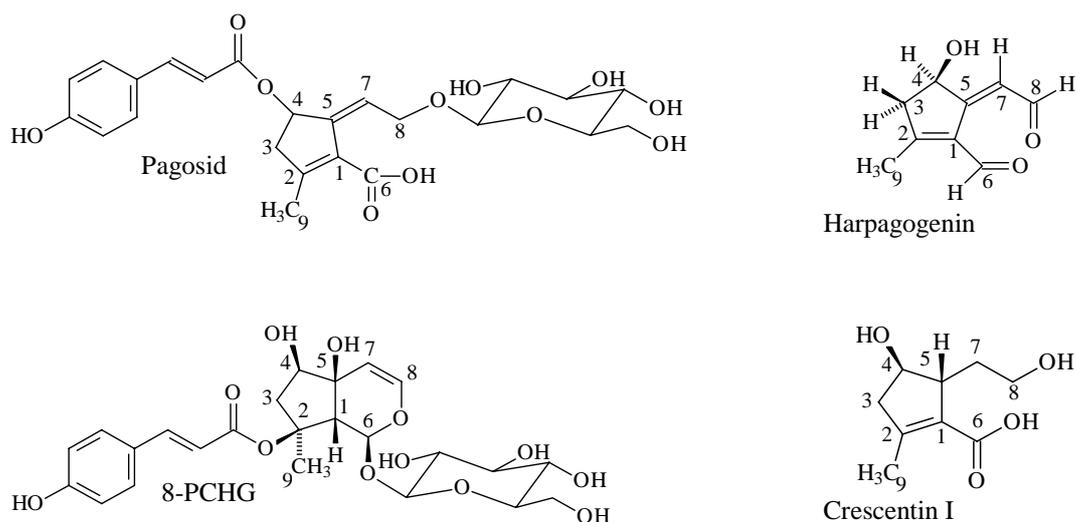


Abb. 3.1.5-7 Strukturformeln der in den Tabellen 3.1.5-1 und-2 erwähnten Verbindungen; die Bezifferung erfolgt analog zu Pagosid

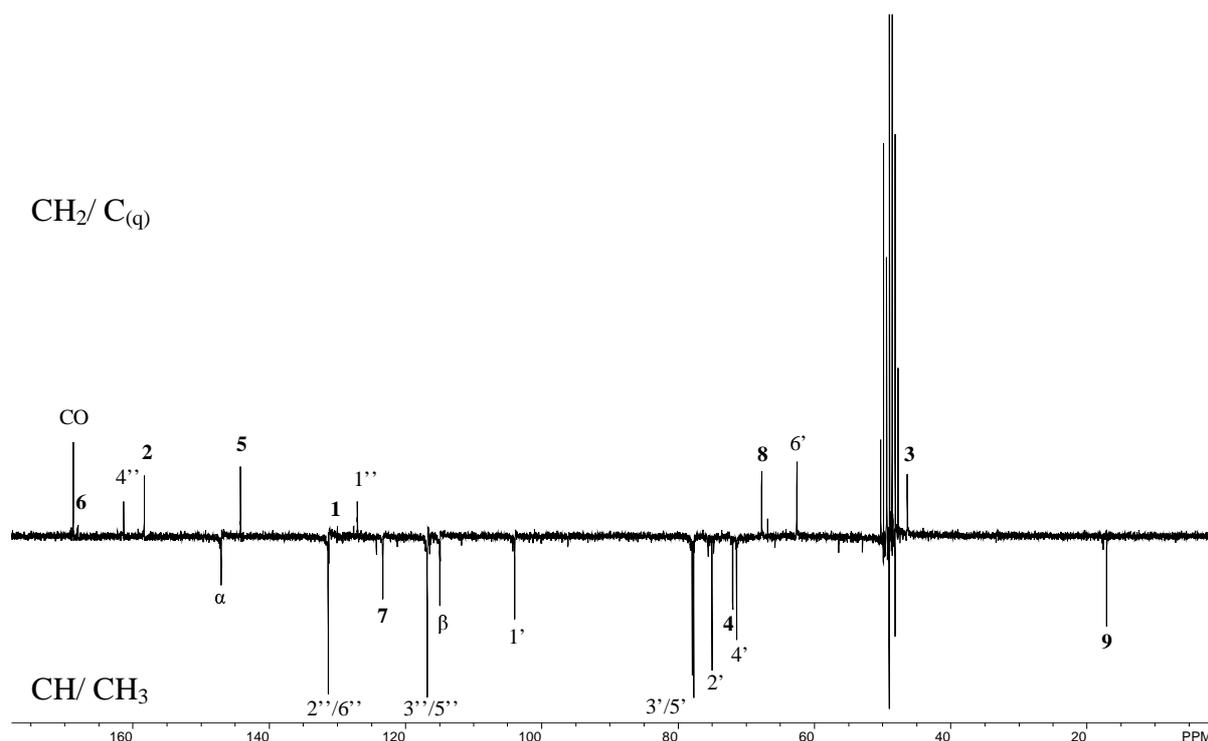


Abb. 3.1.5-8: APT-Spektrum von Pagosid, CD_3OD , 50 MHz

Mittels eines HSQC-Experimentes konnten die Kohlenstoffatome zugeordnet werden. Im Vergleich mit dem 8-PCHG stimmen die Resonanzlagen der Glucose und der p-Cumarsäure weitgehend überein. Die Signalverschiebungen von CO ($\Delta +0.5$ ppm), C- α ($\Delta +0.8$ ppm) und C- β ($\Delta -1.5$ ppm) der Cumarsäure weisen auf eine andere Verknüpfungsstelle am Gerüst des Aglykons hin. Da die Glucose an die Hydroxylgruppe der Seitenkette bindet, weisen diese C-Atome ebenfalls eine leichte Verschiebung zu der Glucose des 8-PCHGs auf.

Die verbliebenen C-Atome können dem Aglykon zugeordnet werden. Weit im Tieffeld bei δ 168.05 ppm liegt das Signal für den Carbonsäure-Kohlenstoff (C-6, Friebolin, 1999). Die geringe Höhe des Peaks und die Ausrichtung im APT-Spektrum bestätigen, dass es sich hierbei um ein quartäres C-Atom handelt (Friebolin 1999). Wie im Protonenspektrum beeinflussen die Doppelbindungen und die Sauerstofffunktionen die Resonanzlagen der Kohlenstoffatome in charakteristischer Weise. Das C-9 der Methylgruppe liegt im Gegensatz zu der Methylgruppe des 8-PCHGs (δ 22.7 ppm) auf Grund der benachbarten Doppelbindung bei δ 17.13 ppm. Die Kohlenstoffe, die direkt an eine Doppelbindung grenzen, liegen wie bei Friebolin (1999) angegeben im tieferen Feld als die übrigen C-Atome (Tab. 3.1.5-2, S.89). Friebolin gibt für die Resonanzen der Kohlenstoffe, die sich an einer Doppelbindung

¹³ C	Pagosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	APT-Spektrum (CD ₃ OD, 50 MHz)	8-PCHG (CD ₃ OD, 50 MHz)	Crescentin I ^{*1} (D ₂ O, 100 MHz)
p-Cumarsäure				
CO	168.77	C / CH ₂	169.3	
α	114.96	CH / CH ₃	116.5	
β	147.06	CH / CH ₃	146.3	
1''	127.09	C / CH ₂	127.3	
2''	131.37	CH / CH ₃	131.1	
3''	116.84	CH / CH ₃	116.9	
4''	161.38	C / CH ₂	161.2	
5''	116.84	CH / CH ₃	116.9	
6''	131.37	CH / CH ₃	131.1	
Aglykon				
1	130.03	C / CH ₂	55.7	133.7
2	158.28	C / CH ₂	88.4	141.3
3	46.35	C / CH ₂	46.3	45.4
4	71.99	CH / CH ₃	77.7	74.5
5	144.22	C / CH ₂	73.4	52.2
6	168.05	C / CH ₂	94.8	175.4
7	123.34	CH / CH ₃	106.9	33.2
8	67.74	C / CH ₂	143.9	59.6
9	17.13	CH / CH ₃	22.7	14.5
Glucose				
1'	103.99	CH / CH ₃	100.0	
2'	75.08	CH / CH ₃	74.6	
3'	77.94	CH / CH ₃	77.7	
4'	71.44	CH / CH ₃	71.8	
5'	77.77	CH / CH ₃	78.2	
6'	62.65	C / CH ₂	63.0	

Tab. 3.1.5-2 Resonanzlagen der Signale im ¹³C-NMR-Spektrum des Pagosids im Vergleich mit denen des 8-PCHGs und des Crescentin I und Auswertung des APT-Spektrums; ^{*1} Kaneko et al. (1997); δ = ppm

befinden, einen Bereich von ca. δ 100 bis 150 ppm an. Infolge der Substitution einer Methylgruppe (C-9) an diesen C-Atomen werden sie noch weiter ins tiefere Feld verschoben (C-2, δ 158.08 ppm; Friebolin, 2000). C-1 wird durch den Carbonsäuresubstituenten stärker abgeschirmt als das C-2 durch die Methylgruppe und erzeugt aus dem Grund ein Signal bei δ 130.03 ppm im höheren Feld als C-1. Die C-Atome des Spinsystems AMX b liegen im höheren Feld bei δ 71.99 (C-4) und δ 46.35 (C-3), wobei die Lage des C-4 im tieferen Feld durch die Sauerstofffunktion zu Stande kommt. Werden die NMR-Daten des Pagosids mit denen des Crescentins I verglichen, können die oben getroffenen Zuordnungen zum Teil bestätigt werden. Die Kohlenstoffatome der Methylgruppe (C-9), der Carbonsäurefunktion (C-6), der Doppelbindung im Cyclopenten (C-1, C-2) und die des AMX b Spinsystems (C-3, C-4) sind in demgleichen Bereich des ¹³C-NMR-Spektrums zu finden (Tab. 3.1.5-2). Durch die zusätzliche Doppelbindung im Pagosid zwischen C-5 und C-7 weichen die Resonanzlagen der C-Atome des AMX a Spinsystems deutlich voneinander ab.

Die zugeordneten Kohlenstoffatome stimmen weiterhin mit der Lage im APT-Spektrum (Abb. 3.1.5-8) überein. Bei C-1, C-2, C-5 und C-6 handelt es sich um quartäre, bei C-4 und C-7 um tertiäre, bei C-8 und C-3 um sekundäre C-Atome und C-9 stellt das einzige primäre Kohlenstoffatom dar.

Die Zuordnung der Signale im ^{13}C -Spektrum bestätigen den oben angegebenen Strukturvorschlag.

2D-NMR-Experimente

Die Zuordnung der Glucose- und Cumarsäuresignale konnten mittels der 2D-Experimente bestätigt werden.

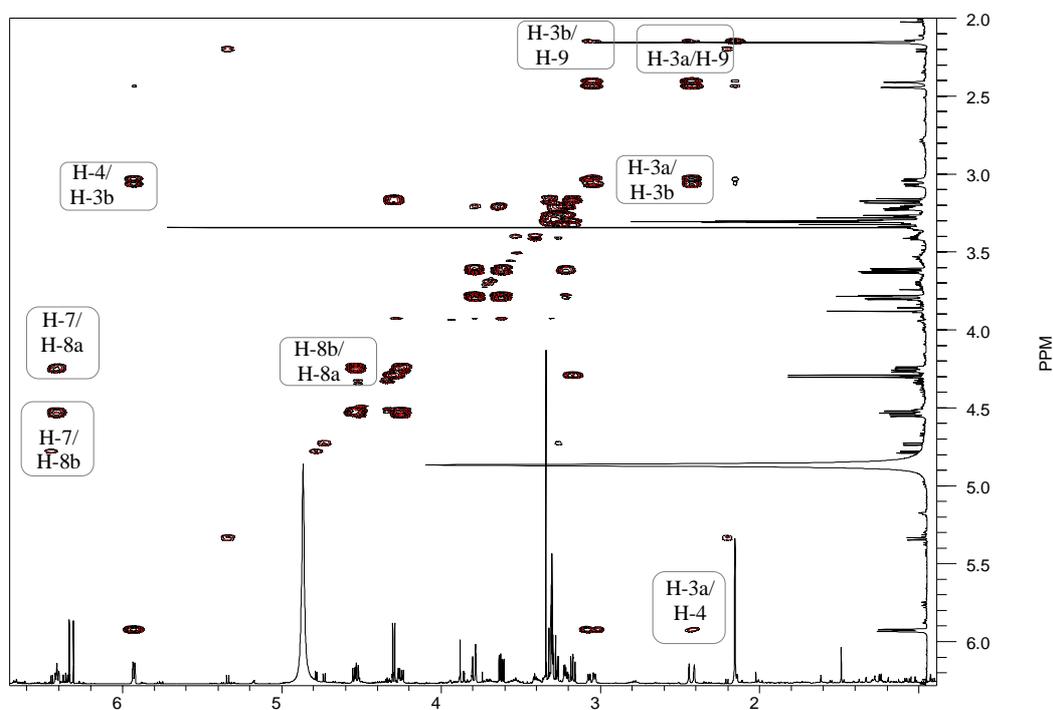


Abb. 3.1.5-9 Ausschnitt aus dem COSY von Pagosid

Das COSY-Spektrum bestätigt das Vorliegen der beiden Spin-Systeme AMX a und AMX b. Die entsprechenden Kopplungen zwischen den Protonen H-3a, H-3b, H-4 und H-7, H-8a, H-8b sind deutlich im Spektrum (Abb. 3.1.5-9) zu erkennen. Weiterhin sind Kopplungen zwischen den Protonen der Methylengruppe des AMX b Spinsystems (H-3a, H-3b) und der Methylgruppe H-9 zu erkennen. Das unterstützt die Vermutung, dass sich die Methylgruppe

an dem C-2 des Cyclopentanringes befindet. Wäre die CH₃-Gruppe an dem C-5 substituiert, würde auch H-4 mit der Methylgruppe koppeln. Eine ⁵J-Kopplung, die durch eine Methylgruppe an der Position 2 entstehen würde, wäre im COSY nur schwer zu identifizieren.

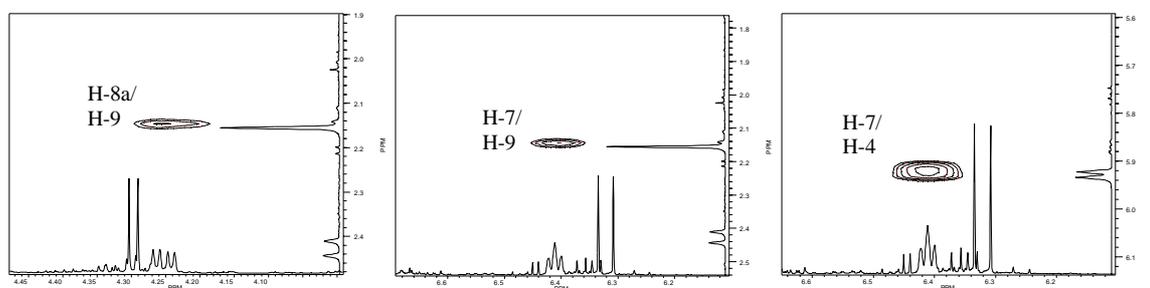


Abb. 3.1.5-10 Ausschnitte aus dem COSY des Pagosids; Crosspeak zwischen H-8a und H-9, H-7 und H-9, H-7 und H-4;

Untersucht man das Spektrum in einer geringeren Schnitttiefe (NUTS Software), kann man sogar Crosspeaks zwischen den Protonen H-8a und H-9, H-7 und H-9, H-7 und H-4 (Abb. 3.1.5-10) erkennen. Das Vorliegen eines konjugierten Doppelbindungssystems zwischen dem AMX a System und der Methylgruppe ermöglichen diese ⁶J und ⁷J-Kopplungen. Der Crosspeak zwischen H-7 und H-4 deutet neben den ermittelten Fernkopplungen im ¹H-NMR-Spektrum darauf hin, dass sich diese Protonen in der Nähe zueinander befinden.

Das HSQC-Experiment konnte die Zuordnungen im ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektrum bestätigen.

Die Kopplungen im HMBC-Spektrum (Tab. 3.1.5-3, S.92) bestätigen die ermittelte Strukturformel von Pagosid. ⁵J-Kopplungen (C-2/H-8a, H-8b; C-7/H-9) geben wieder einen Hinweis auf die konjugierten Doppelbindungen. Weiterhin ist eine Kopplung zwischen der Carboxylgruppe der Cumarsäure und dem H-4 des Pagosids zu erkennen, welche darauf hinweist, dass die Cumarsäure über die Hydroxylgruppe des C-4 an das Molekül gebunden ist. C-1' der Glucose koppelt mit den Protonen H-8a und H-8b. Der Zuckerrest ist demnach über die Hydroxylgruppe am C-8 mit dem Aglykon verknüpft. Eine Kopplung von C-8 mit H-1' bestätigt diese Verknüpfung.

¹³ C ¹ H	3a	3b	4	7	8a	8b	9	1'
1	³ J	³ J	⁴ J	³ J		(⁴ J)	³ J	
2	² J	² J	³ J		(⁵ J)	(⁵ J)	² J	
3							³ J	
4	² J			³ J				
5			² J		³ J	³ J	⁴ J	
6							⁴ J	
7			³ J		² J	² J	⁵ J	
8								³ J
9								
CO			³ J					
1'					³ J	³ J		

Tab. 3.1.5-3 Kopplungen aus dem HMBC des Pagosids; die in Klammern gestellten J-Kopplungen konnten erst bei einer tieferen Schnittebene identifiziert werden

NOE

Es wurde auf die Protonen H-3a, H-4, H-7 und H-9 eingestrahlt. In der folgenden Tabelle ist aufgeführt, welche Protonen jeweils mit einem positiven NOE reagieren:

Eingestrahltetes Proton	Reagierende Protonen
H-3a	H-3b, H-4
H-4	H-3a
H-7	H-8a, H-8b
H-9	-----

Die Einstrahlung auf die Protonen H-3a, H-4, H-7 und H-9 zeigt wieder das Vorhandensein der beiden Spinsysteme AMX a und AMX b. Bei der Einstrahlung auf H-3a reagieren die zugehörigen Protonen H-3b und H-4. Die Einstrahlung auf H-7 ruft eine Reaktion bei den Protonen H-8a und H-8b auf. Infolge der Einstrahlung auf H-4 zeigt nur H-3a, nicht H-3b eine Reaktion, was zeigt, dass H-4 und H-3a im Molekül dieselbe Ausrichtung aufweisen. Weitere Hinweise zur relativen Konfiguration konnten mit Hilfe der NOE-Experimente nicht ermittelt werden. Die Methylgruppe (H-9) zeigt bei Einstrahlung keine Reaktion. Es hätte

dadurch die Stellung der CH₃-Gruppe im Molekül, wie sie mit Hilfe des COSY-Experimentes ermittelt worden ist, bestätigt werden können.

MS

Zur Ermittlung der Molekülmasse und damit zur Bestätigung der Strukturaufklärung wurde ein ESI-MS Spektrum im positiven und negativen Modus aufgenommen. Bei 515 (m/z) war das [M + Na]⁺-Signal und bei 531 (m/z) befand sich das weniger ausgeprägte [M + K]⁺-Signal. Demnach betrug die Masse der Verbindung 592.2 (m/z), was der vermuteten Struktur entsprach.

Spezifischer Drehwert

Mit einer Konzentration von 4.86 mg/mL, gelöst in Methanol, liegt der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ der Verbindung bei -123.5° .

Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der Absorptionsmaxima ($\lambda = 312$ nm, $\lambda = 233$ nm) diente der weiteren Charakterisierung der Verbindung.

Wellenlänge λ [nm]	Spezifischer Absorptionskoeffizient ϵ
312	4.158
233	4.216

CE

Nach der in Kapitel 9.2.2 (S.216) beschriebenen, kapillarelektrophoretischen Methode konnte D-Glucose als Bestandteil des Moleküls ermittelt werden. L-Glucose konnte ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstante von $J = 8.0$ Hz im ¹H-NMR-Spektrum weist darauf hin, dass Glucose in der β -Form vorliegt.

3.2 Phenylethanoide

3.2.1 ACTEOSID

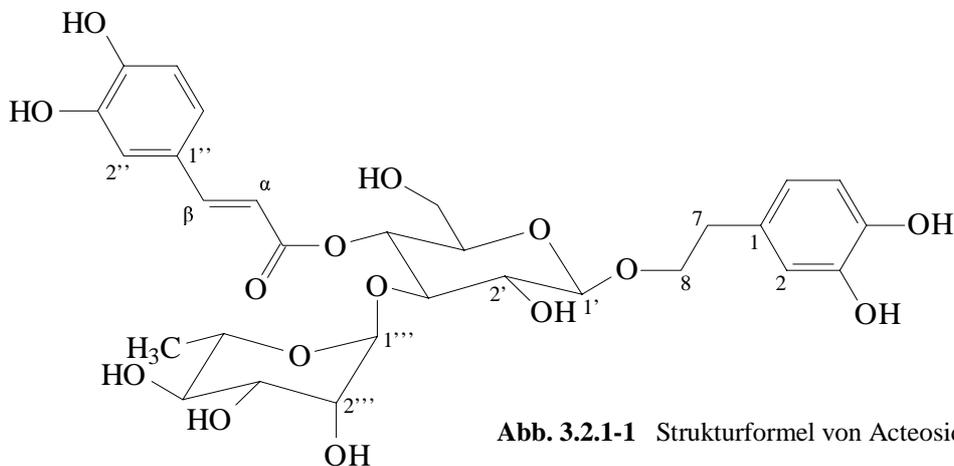


Abb. 3.2.1-1 Strukturformel von Acteosid

Acteosid konnte neben Harpagosid und Isoacteosid mittels MPLC aus der Fraktion IIB6 isoliert werden (Abb. 2.3-1, S.54). Im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 2.1.2-1, S.33) erscheint Acteosid bei einem R_f -Wert von 0.69. Bei der Detektion mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm fällt die Substanz durch eine schwache blaue Fluoreszenz auf. Mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz färbt sich die Verbindung grün im Gegensatz zu den Iridoiden, die sich mit diesem Detektionmittel rot anfärben. Die Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) beträgt 15.3 min. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 330 nm.

Acteosid ist bereits 1987 von Burger et al. (1987) aus *Harpagophytum procumbens* isoliert worden. Diese Verbindung ist im Pflanzenreich weit verbreitet und konnte bereits aus mehr als 60 Arten der unterschiedlichsten Familien isoliert werden [Cometa et al., 1993]. Ebenso konnte Acteosid aus *Scrophularia auriculata* [Giner et al., 1998], *Scrophularia ningpoensis* [Kajimoto et al., 1989], *Brandisia hancei* [Kong et al., 1999], *Pedicularis striata* [Zimin et al., 1991] und *Penstemon serrulatus* [Skrzypek et al., 1999], die aus der den Pedaliaceen nahe verwandten Familie der Scrophulariaceen stammen, gewonnen werden. In weiteren Arten der Familie der Pedaliaceen, *Sesamum angolense* [Potterat et al., 1988] und *Rogeria adenophylla* [Potterat et al., 1991], konnte Acteosid ebenfalls gefunden werden.

Zur Bestätigung der Struktur wurden spektroskopische Methoden verwendet. Die Resonanzlagen der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein [Fleer, 2000].

^1H -NMR

(Tab. 3.2.1-1, S.96)

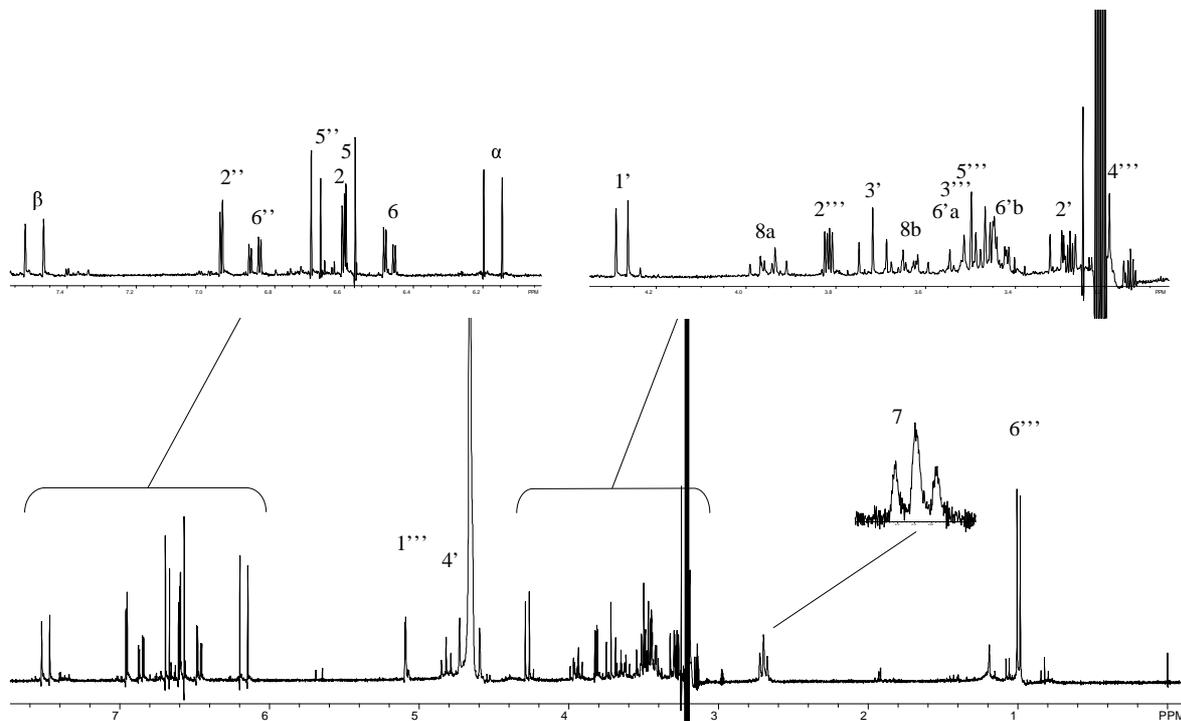


Abb. 3.2.1.2 ^1H -NMR-Spektrum von Acteosid (600 MHz, CD_3OD)

Charakteristisch im Spektrum der Phenylethanoide sind die Multipletts für H-7 bei δ 2.79 ppm, für H-8a bei δ 4.04 ppm und für H-8b bei δ 3.73 ppm, wobei das H-7 in der Literatur häufig nur als Triplet angeben wird. Durch die Aufnahme des Spektrums bei höheren Feldstärken und die Nachbearbeitung mit NUTS-Software kann man aber erkennen, dass dieses Proton ein Multiplett ausbildet. Aufgespalten wird das Signal von H-7 durch die Protonen H-8a, H-8b, H-2 und H-6. Im tiefen Feld kann man die typischen Signallagen trisubstituierter Aromaten beobachten. Das Proton H-6 des Phenylethanoidrestes bei δ 6.56 ppm zeigt dabei eine große meta-Kopplung ($J = 8.2$ Hz) zu H-5 (δ 6.67 ppm) und eine schwächere ortho-Kopplung ($J = 1.9$ Hz) zu H-2 (δ 6.69 ppm).

Ein weiteres ABX-Spinsystem, das gegenüber dem Spinsystem des Phenylethanol im tieferen Feld liegt, kann den aromatischen Protonen der Kaffeesäure zugeordnet werden. Die

E-konfigurierte olefinische Doppelbindung der Kaffeesäure erzeugt zwei Dubletts bei δ 6.26 ppm und δ 7.56 ppm mit einer Kopplungskonstante von $J = 16.1$ Hz.

¹ H	Acteosid (CD ₃ OD, 400 MHz)	Acteosid ^{*1} (CD ₃ OD, 600 MHz)
3.4-Dihydroxyphenyl-ethanol		
2	6.69 d (1.9)	6.71 d (1.9)
5	6.67 d (8.2)	6.69 d (8.2)
6	6.56 dd (8.2/1.9)	6.58 dd (1.9/8.2)
7	2.79 m	2.81 m
8a	4.04 m	4.05 m
8b	3.73 m	3.73 m
Kaffeesäure		
2''	7.05 d (2.2)	7.07 d (1.9)
5''	6.77 d (8.2)	6.80 d (8.2)
6''	6.95 dd (8.2/2.2)	6.98 dd (1.9/8.2)
7''	7.56 d (16.1)	7.61 d (15.9)
8''	6.26 d (16.1)	6.29 d (15.9)
Glucose		
1'	4.37 d (7.9)	4.38 d (7.9)
2'	3.38 dd (9.3/7.9)	3.40 dd
3'	3.81 t (9.3)	3.82 t (9.2)
4'	4.91 t (9.3)	4.94 t (9.6)
5'	3.53	3.56
6'a	3.60	3.62
6'b	3.50	3.52
Rhamnose		
1'''	5.18 d (1.9)	5.21 d (1.6)
2'''	3.91 dd (3.3/1.8)	3.94 dd (1.7/3.2)
3'''	3.57 dd (9.5/3.3)	3.58 dd (1.3/3.3)
4'''	3.28 t (9.5)	3.30 t (9.4)
5'''	3.55	3.59
6'''	1.08 d (6.4)	1.10 d (6.2)

Tab. 3.2.1-1 ¹H-NMR-Datenvergleich von Acteosid, *¹ Fleer (2000);
 δ = ppm, J = Hz

Weiterhin kann man noch die Signale zweier Zuckerbestandteile identifizieren. Das anomere Proton der Glucose erzeugt bei δ 4.37 ppm ein Signal mit einer Kopplungskonstante von $J = 7.9$ Hz. Demnach liegt die Glucose in der β -Form vor [Jiménez et al., 1994]. Vergleicht man weiterhin die Signale der hier gebundenen Glucose mit einer unsubstituierten Glucose, fallen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen auf, insbesondere bei den Protonen H-1', H-3' und H-4'. Das Proton H-4' bei δ 4.91 ppm ist um Δ 1.54 ppm in das tiefere Feld verschoben und H-3' bei 3.81 ppm ist um Δ 0.44 ppm in das höhere Feld verschoben. Das weist daraufhin, dass sich an diesen Stellen Substituenten befinden [Andary et al., 1982]. Weitere Aufschlüsse über die Verknüpfungsstellen gibt das HMBC-Experiment. Das anomere

Proton der Rhamnose bei δ 5.18 ppm weist eine weitaus kleinere Kopplungskonstante von $J = 1.9$ Hz auf und zeigt damit, dass die Rhamnose in der α -Form vorliegt [Jiménez et al., 1994]. Typisch für die Rhamnose ist das Dublett bei δ 1.08 ppm, das der Methylgruppe (H-6''') zugeordnet werden kann. Die weitere Zuordnung der Zucker-Protonen ist in Tab. 3.2.1-1 (S.96) aufgelistet. Die Signallagen einiger Protonen der Glucose und Rhamnose konnten nur mittels COSY und HETCOR ermittelt werden.

¹³C-NMR

Im dem ¹³C-Spektrum des Acteosids sind 29 Signale zu erkennen, von denen 8 dem Dihydroxyethanol, 9 der Kaffeesäure, 6 der Glucose und 6 der Rhamnose zugeordnet werden können. In dem Bereich von δ 114 ppm bis 169 ppm liegen die C-Atome der beiden aromatischen Substituenten, Phenylethanol und Kaffeesäure. Die Signale der Kaffeesäure sind meistens gegenüber den Signalen des Phenylethanol leicht in das tiefere Feld verschoben. Nur die Kohlenstoffe der Position 1 und 2 (C-1 / C-1'', C-2 / C-2'') weisen infolge der Doppelbindung der Kaffeesäure eine veränderte Reihenfolge auf. Charakteristisch für Phenylethanoide sind die Signale von C-7 bei δ 36.6 ppm und C-8 bei δ 72.2 ppm, inmitten der Zuckerkohlenstoffe.

Die anomeren Kohlenstoffe der Glucose und Rhamnose liegen bei δ 104.3 ppm und δ 103.0 ppm. Die weiteren Signale

¹³ C	Acteosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	Acteosid * ¹ (CD ₃ OD, 100 MHz)
Phenylethanol		
1	131.6	131.6
2	117.1	117.1
3	146.2	146.1
4	144.7	144.6
5	116.4	116.3
6	121.3	121.3
7	36.6	36.5
8	72.2	72.2
Kaffeesäure		
1''	127.7	127.7
2''	115.3	115.3
3''	146.8	146.8
4''	149.8	149.7
5''	116.5	116.5
6''	123.2	123.2
7''	148.0	148.0
8''	114.8	114.8
9''	168.3	168.3
Glucose		
1'	104.3	104.2
2'	76.3	76.2
3'	81.6	81.6
4'	70.7	70.7
5'	76.1	76.0
6'	62.4	62.4
Rhamnose		
1'''	103.0	103.0
2'''	72.4	72.3
3'''	72.1	72.1
4'''	73.9	73.8
5'''	70.4	70.4
6'''	18.4	18.4

Tab. 3.2.1-2 ¹³C-NMR Datenvergleich von Acteosid, *¹ Fler (2000); $\delta =$ ppm

der Zucker konnten an Hand von Literaturdaten zugeordnet und mittels 2D-NMR-Experimenten bestätigt werden.

2D-NMR-Experimente

Mittels des HETCORs und des COSYs konnten die Zuordnungen im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt werden.

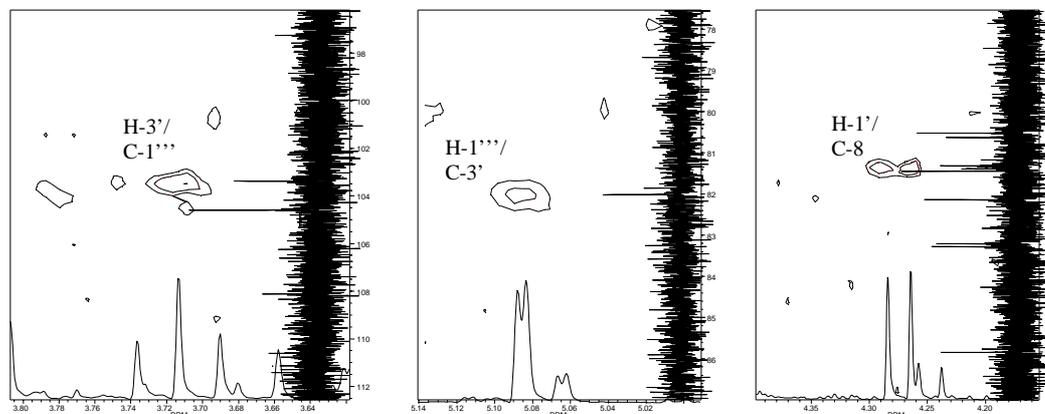


Abb. 3.2.1-3 Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von Acteosid

Infolge der in Abb. 3.2.1-3 dargestellten Kopplungen von H-3' der Glucose mit C-1''' der Rhamnose, H-1''' der Rhamnose mit C-3' der Glucose und H-1' der Glucose mit C-8 des Phenylethanol können die Verknüpfungen der Rhamnose, Glucose und des Phenylethanol bestätigt werden. Die ^3J -Kopplung zwischen dem CO der Kaffeesäure und dem H-4' der Glucose konnte auch in einer tieferen Schnittebene nicht gesehen werden. Da die chemischen Verschiebungen der Kaffeesäure und der Glucose mit den Acteosid-Daten aus der Literatur übereinstimmen und sich gegenüber der unsubstituierten Glucose an Position C-4' eine deutliche Verschiebung ergibt (siehe ^1H -NMR, S.96), kann man davon ausgehen, dass die Kaffeesäure an die Hydroxylgruppe des C-4' der Glucose gebunden ist. Da es sich hier weiterhin nur um eine Strukturbestätigung einer vollständig aufgeklärten Struktur handelt, wurde auf eine Wiederholung des HMBC-Experimentes mit höheren Substanzmengen verzichtet.

MS

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Verbindung wurde ein ESI-MS-Spektrum im negativen und positiven Modus aufgenommen. Im positiven Modus liegt das Signal für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ bei 647.4 m/z, im negativen liegt das Signal für $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei 623.6 m/z. Daraus ergibt sich für das Molekül ein Molekulargewicht von 624.6. Dies entspricht den Erwartungen.

Im positiven Modus sind noch die Signale für $[\text{M}+\text{Na}+1]^+$ bei 648.4 m/z, für $[2 \times \text{M}+\text{Na}]^+$ bei 1271.1 m/z und für $[2 \times \text{M}+\text{Na}+1]^+$ bei 1272.2 m/z zu erkennen.

Die Aufnahme im negativen Modus liefert Signale bei 624.4 [M]⁻, 1247.2 [2M – 2H]⁻, 1248.2 [2M - H]⁻ und 1249.2 [2M]⁻.

Die Daten der zugeordneten Signale entsprechenden denen der Literatur [Fleer, 2000].

Drehwert

3 mg Acteosid gelöst in 1 mL Methanol ergab einen spezifischen Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ von 84.8°.

Der Wert stimmte zum Teil mit den Daten aus der Literatur überein.

Eigene Daten	Sudo et al. (1997)	Fleer (2000)	Zimin et al., (1991)	Kobayashi et al. (1984)
-84.8° (c = 0.30, CH ₃ OH)	-82° (c = 1.67, CH ₃ OH)	-69° (c = 1.505, CH ₃ OH)	-41.5° (c = 1.1, CH ₃ OH)	-84.9° (c = 1.15, CH ₃ OH)

Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der spezifischen Absorptionskoeffizienten bei den angegebenen Wellenlängen diente der weiteren Strukturbestätigung. Die berechneten ε Werte stimmen in der Größenordnung mit den Literaturdaten überein.

Eigene Daten (ε)	Ravn et al. (1990) (ε)	Fleer (2000) (ε)
4.295 (λ = 330 nm)	4.10 (λ = 332 nm)	4.05 (λ = 332 nm)
	4.00 (λ = 291 nm)	3.96 (λ = 291 nm)
	3.98 (λ = 248 nm)	3.85 (λ = 248 nm)
4.445 (λ = 219 nm)	4.28 (λ = 216 nm)	4.20 (λ = 216 nm)

CE

Nach Abspaltung und Derivatisierung der Zuckerbestandteile konnten D-Glucose und L-Rhamnose nachgewiesen werden. L-Glucose und D-Rhamnose konnten durch Zuspritzexperimente mit authentischen Verbindungen ausgeschlossen werden.

Die Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum weisen darauf hin, dass Glucose in der β-Form (*J* = 7.9) und Rhamnose in der α-Form (*J* = 1.9) vorliegt.

3.2.2 ISOACTEOSID

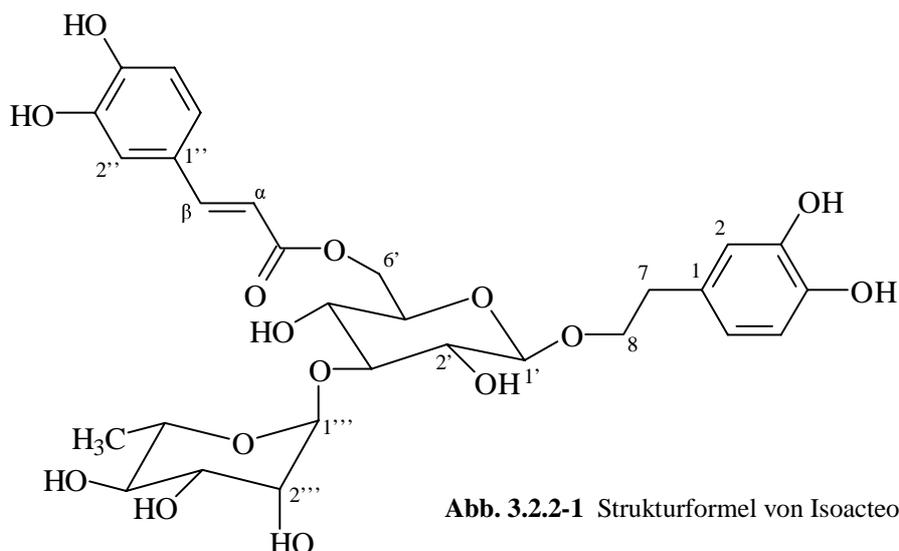


Abb. 3.2.2-1 Strukturformel von Isoacteosid

Isoacteosid konnte mittels präparativer HPLC neben Harpagosid aus der MLCCC-Fraktion IB7 isoliert werden (Abb. 2.3-1, S.54). In größeren Mengen konnte die Verbindung mit Hilfe der MPLC neben Harpagosid und Acteosid aus der Fraktion IIB6 gewonnen werden.

Bei Isoacteosid und Acteosid handelt es sich um Stellungsisomere. Während bei Acteosid die Kaffeesäure über die Hydroxylgruppe am C-4' der Glucose gebunden vorliegt, befindet sie sich bei Isoacteosid an der OH-Gruppe des C-6'. Der R_f -Wert im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 2.1.2-1, S.33) von Isoacteosid liegt bei 0.63. Wie Acteosid zeigt die Substanz im UV₃₆₆-Licht eine schwache blaue Fluoreszenz und färbt sich mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz grün. Im HPLC-Chromatogramm erscheint die Verbindung bei einer Retentionszeit 15.3 min (Abb. 2.1.3-1, S.36). Das Maximum im UV-Spektrum ist gegenüber dem des Acteosids schwach hypsochrom zu 326 nm verschoben. Auffällig ist dabei das unterschiedliche Verhalten bei der Dünnschichtchromatographie und der HPLC. Isoacteosid weist gegenüber dem Acteosid einen kleineren R_f -Wert auf, während die Retentionszeit an einer RP-Phase größer ist.

Das Vorkommen von Isoacteosid in *Harpagophytum procumbens* war bereits bekannt. 1987 wurde es neben Acteosid von Burger et al. zum ersten Mal aus dieser Art isoliert. Das Acteosid Isomer konnte auch in verschiedenen Scrophulariaceen identifiziert werden.

Zur Strukturaufklärung wurden spektroskopische Methoden (1D-, 2D-NMR-Experimente) verwendet. Die ermittelten NMR-Daten stimmten mit denen aus der Literatur überein [Burger et al., 1987; Kobayashi et al., 1987; Zimin et al., 1991].

¹H-NMR

¹ H	Isoacteosid ^{*1} (CD ₃ OD, 200 MHz)	Isoacteosid ^{*2} (CDCl ₃ , 500 MHz)	Isoacteosid ^{*3} (CD ₃ OD, 89.55 MHz)	Isoacteosid ^{*4} (DMSO, 400 MHz)
Phenyl-ethanol				
2	6.66 d (2.0)	6.70 d (1.5)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
5	6.63 d (8.0)	6.73 d (8.0)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
6	6.52 dd(8.0/2.0)	6.69 dd (1.5/8.0)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
7	2.77 m	2.81 t(7.0)	2.77 t (7)	2.72 br
8a	3.93 m	4.06 dt (7.0/9.5)		
8b	3.68 m	3.62 dt (7.0/9.5)		
Kaffee-säure				
2''	7.03 d (2.0)	6.99 d (1.5)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
5''	6.76 d (8.2)	6.84 d (8.0)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
6''	6.89 dd (8.2/2.0)	7.06 dd (1.5/8.0)	6.4-7.1	6.49 – 7.17
β	7.55 d (15.9)	7.63 d (16.0)	7.54 d (16)	7.53 d (15.9)
α	6.28 d (15.9)	6.21 d (16.0)	6.28 d (16)	6.35 d (15.9)
Glucose				
1'	4.32 d (7.9)	4.39 d (8.0)	4.33 d (8)	4.33 d (7.2)
2'	3.27 ²	5.05 dd (8.0/9.5)		
3'	3.52 ¹	3.77 t (9.5)		
4'	3.39 ²	5.12 t (9.5)		3.24 t (9)
5'	3.53 ²	3.60 dq (2.5/10.)		
6'a	4.49dd(11.9/1.9)	4.29dd(2.5/12.5)		4.43 m
6'b	4.33dd(11.9/5.5)	4.24dd(4.5/12.5)		4.26 m
Rhamnose				
1'''	5.17 d (1.8)	4.79 d (2.0)	5.18 bs	5.11 s
2'''	3.91	5.05 dd (2.0/3.3)		
3'''	3.69 dd (9.5/3.5)	5.08 dd (3.3/10.)		
4'''	3.39	4.89 t (10.0)		
5'''	3.59	3.88-3.81 m		
6'''	1.24 d (6.3)	1.12 d (6.3)	1.26 d (6)	1.15 d (5.8)

Tab. 3.2.2-1 ¹H-NMR-Datenvergleich von Isoacteosid; ^{*1} Eigene Daten, ^{*2} Burger et al. (1987); ^{*3} Kobayashi et al. (1987); ^{*4} Zimin et al. (1991); δ = ppm, J = Hz

Das Spektrum des Isoacteosids ähnelt sehr dem Spektrum des Acteosids. Im tieferen Feld kann man die Signale zweier trisubstituierter Aromaten erkennen, von denen 3 der Kaffeesäure (δ 7.03 ppm, δ 6.76 ppm, δ 6.89 ppm) und 3 dem Phenylethanol (δ 6.66 ppm, δ 6.63 ppm, δ 6.52 ppm) zugeordnet werden können. Die Protonen der Kaffeesäure liegen wiederum im tieferen Feld als die jeweils entsprechenden Protonen des Phenylethanol (Kap. 3.2.1, S.94). Die Signale der Protonen der E-konfigurierten Doppelbindung liegen bei δ 6.28 ppm und δ 7.55 ppm mit einer Kopplungskonstante von $J = 15.9$ Hz. Die Protonen H-7, H-8a und H-8b erzeugen bei δ 2.77 ppm, 3.93 ppm und δ 3.68 ppm die charakteristischen Multipletts der Phenylethanoide. Die Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein (Tab. 3.2.2-1, S.101).

Die Zuordnung der Zuckerprotonen gestaltete sich schwierig, da sie zum Teil zu einem Multiplett zusammenfielen. Literaturdaten des Isoacteosids konnten in dem Fall auch nicht

weiterhelfen, weil die Protonen der Glucose und der Rhamnose z.B. durch Kobayashi et al. (1987) und Zimin et al. (1991) nicht zugeordnet worden sind. Mittels 2D-NMR-Experimenten und einem Datenvergleich mit Acteosid konnten die Resonanzlagen der Protonen der Glucose und Rhamnose ermittelt werden. Große Abweichungen ergaben sich dabei infolge der Verwendung eines anderen Lösungsmittels gegenüber den Zuordnungen von Burger et al. (1987). Die anomeren Protonen für Glucose bei δ 4.32 mit $J = 7.9$ Hz und für Rhamnose bei δ 5.17 ppm mit $J = 1.8$ Hz, weisen darauf hin, dass die Glucose in der β -Form und die Rhamnose in der α -Form vorliegt.

Auffällig sind die Verschiebungen der Resonanzlagen der Glucoseprotonen H-3' ($\Delta +0.3$ ppm), H-4' ($\Delta +1.5$ ppm), H-6'a ($\Delta -0.89$ ppm) und H-6'b ($\Delta -0.83$ ppm) gegenüber denen des Acteosids. Die großen Differenzen, die sich insbesondere bei H-4', H-6'a und H-6'b ergeben, zeigen, dass die Kaffeesäure nicht mehr über die Hydroxylgruppe des C-4, sondern über die des C-6 gebunden vorliegt.

^{13}C -NMR

(Tab. 3.2.2-3, S.103)

Entsprechend dem Protonenspektrum stimmen die Signallagen im ^{13}C -Spektrum mit denen des Acteosids zum größten Teil überein. Unterschiede in den chemischen Verschiebungen treten nur bei den Kohlenstoffen der Kaffeesäure und Glucose auf. In der folgenden Tabelle werden die Verschiebungen zwischen Acteosid und Isoacteosid mit den errechneten Verschiebungen aus Daten der Literatur verglichen:

	Eigene Daten (Δ ppm)	Kobayashi et al. (Δ ppm)	Zimin et al. (Δ ppm)
C-β	+ 0.8	+ 0.7	+ 0.2
<u>C</u>O	- 0.8	- 0.9	- 1.0
C-2'	+ 0.6	+ 0.4	+ 0.2
C-3'	- 2.3	- 2.4	- 2.2
C-4'	+ 0.3	+ 0.3	+ 0.7
C-5'	+ 0.7	+ 0.4	+ 0.6
C-6'	- 2.2	- 2.3	- 2.9

Tab. 3.2.2-2 Verschiebungen zwischen den Kohlenstoffen des Acteosids und Isoacteosids; Berechnungen aus eigenen Daten und Berechnungen aus den Daten der Literatur

Auffällig sind die Verschiebungen des C-3' des Isoacteosids um $\Delta -2.3$ ppm und des C-6' um $\Delta -2.2$ ppm ins tiefere Feld. Durch die unsubstituierte Hydroxylgruppe am C-4' wird die Resonanzlage des C-4' leicht ins Hochfeld, und infolge des β -Effektes C-3' um $\Delta 2.3$ ppm in

das tiefere Feld verschoben. Die Verschiebung des C-6' weist darauf hin, dass die Kaffeesäure über diese Hydroxylgruppe an die Glucose gebunden ist.

Die schwachen Verschiebungen des C-β und der Carbonylfunktion der Kaffeesäure deuten ebenfalls an, dass die Kaffeesäure über eine andere Stelle an das Glucose-Molekül verbunden ist.

Die ermittelten Differenzen der Verschiebungen (Tab. 3.2.2-2, S.102) und die ¹³C-NMR-Daten des Acteosids stimmen mit denen der Literatur überein.

¹³ C	Isoacteosid ^{*1} (CD ₃ OD, 50 MHz)	Isoacteosid ^{*2} (CDCl ₃ , 75.4 MHz)	Isoacteosid ^{*3} (CD ₃ OD, 22.5 MHz)	Isoacteosid ^{*4} (DMSO, 100 MHz)
Phenyl-ethanol				
1	131.4	130.97	131.4	129.5
2	117.1	112.33	117.1	116.5
3	146.1	148.59	146.0	145.1
4	144.6	147.35	144.6	143.6
5	116.4	111.07	116.3	116.0
6	121.3	120.68	121.3	119.8
7	36.7	35.69	36.6	35.3
8	72.3	70.80	72.3	70.5
Kaffee-säure				
1''	127.7	127.14	127.7	125.8
2''	115.1	109.49	115.1	114.1
3''	146.8	151.12	146.7	145.5
4''	149.6	149.07	149.5	148.6
5''	116.5	110.87	116.5	115.0
6''	123.1	122.88	123.1	121.7
7'' (β)	147.2	145.39	147.2	145.7
8'' (α)	114.9	114.92	114.9	115.7
9'' (γ)	169.1	166.71	169.1	166.7
Glucose				
1'	104.4	100.92	104.3	102.8
2'	75.7	71.56	75.4	74.3
3'	83.9	81.62	84.0	81.3
4'	70.4	69.69	70.0	68.4
5'	75.4	72.07	75.6	73.9
6'	64.6	62.14	64.6	63.6
Rhamnose				
1'''	102.7	99.54	102.7	100.8
2'''	72.3	69.83	72.3	70.8
3'''	72.3	68.75	72.3	70.8
4'''	74.0	70.54	74.0	72.4
5'''	70.0	67.47	70.4	68.8
6'''	17.9	17.32	17.8	18.0

Tab. 3.2.2-3 ¹H-NMR-Datenvergleich von Isoacteosid; ^{*1} Eigene Daten, ^{*2} Burger et al. (1987); ^{*3} Kobayashi et al. (1987); ^{*4} Zimin et al. (1991); δ = ppm

MS

Zur Ermittlung der Molekülmasse und Absicherung der Strukturaufklärung wurde ein ESI-Massenspektrum im positiven Modus aufgenommen. Das Signal für $[M+Na]^+$ liegt bei 647.4 m/z, das für $[M + K]^+$ bei 663 m/z. Daraus ergibt sich für das Molekül ein Molekulargewicht von 624.6 und was somit den Erwartungen entspricht. Bei 501 m/z kann noch das Signal für $[M + Na - Glucose]^+$ bestimmt werden.

Drehwert

Der Drehwert von Isoacteosid wurde bei einer Konzentration von 1.57 mg/mL, gelöst in Methanol, bestimmt. Der Wert stimmte zum Teil mit den Daten aus der Literatur überein.

$$[\alpha]_D^{20}$$

Eigene Daten	Zimin et al., (1991)	Kernan et al. (1985)	Schilling et al. (1982)	Kasai et al. (1991)
-51.2° (c = 0.16, CH ₃ OH)	-31.7° (c = 1.2, CH ₃ OH)	-47.2° (c = 0.212, CH ₃ OH)	-51.8° (c = 1.0, CH ₃ OH)	-52.3° (c = 0.58, CH ₃ OH)

Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der spezifischen Absorptionskoeffizienten bei den angegebenen Wellenlängen diente der weiteren Strukturbestätigung. Die berechneten ϵ Werte stimmen annähernd mit den Literaturdaten überein.

Eigene Daten (ϵ)	Zimin et al. (1991) (ϵ)	Kasai et al. (1991) (ϵ)
4.250 ($\lambda = 326$ nm)	4.20 ($\lambda = 329$ nm)	4.19 ($\lambda = 329$ nm)
	4.05 ($\lambda = 291$ nm)	4.10 ($\lambda = 290$ nm)
4.427 ($\lambda = 219$ nm)	3.40 ($\lambda = 219$ nm)	
	4.28 ($\lambda = 208$ nm)	

CE

Nach Abspaltung und Derivatisierung der Zuckerbestandteile konnten D-Glucose und L-Rhamnose nachgewiesen werden. L-Glucose und D-Rhamnose konnten ausgeschlossen werden. Die Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum weisen darauf hin, dass Glucose in der β -Form ($J = 7.9$) und Rhamnose in der α -Form ($J = 1.8$) vorliegt.

3.2.3 6'-O-ACETYLACTEOSID

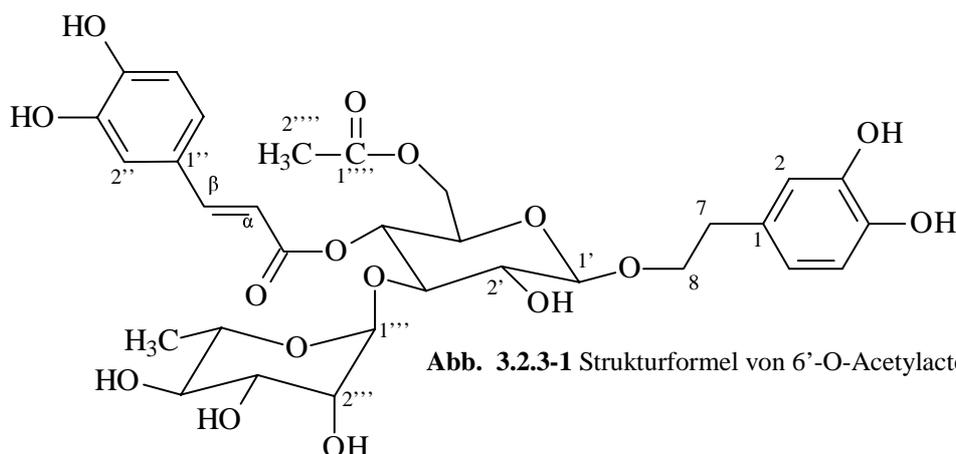


Abb. 3.2.3-1 Strukturformel von 6'-O-Acetylacteosid

6'-O-Acetylacteosid wurde durch Aufreinigung der MLCCC-Fraktion IB3 mittels präparativer HPLC gewonnen (Abb. 2.3-1, S.54).

Infolge der erhöhten Lipophilie gegenüber den anderen Phenylethanoiden (Acteosid Kap. 3.2.1, S.94; Isoacteosid Kap. 3.2.2, S.100) durch den zusätzlichen Acetylrest ist der R_f -Wert im verwendeten DC-System (Abb. 2.1.2-1, S.33) größer. Bei Bestrahlung mit UV₃₆₆-Licht zeigt die Verbindung ebenso wie die anderen Phenylethanoide eine schwache blaue Fluoreszenz und reagiert auf der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz zu einem grünen Produkt.

Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) kann die Substanz dem Signal bei einer Retentionszeit von 18.2 min zugeordnet werden. Das Maximum im UV-Spektrum liegt wie bei Acteosid bei einer Wellenlänge von $\lambda = 330$ nm.

6'-O-Acetylacteosid konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal aus pflanzlichem Material isoliert werden. Nur das 2'-O-Derivat des Acteosids ist bereits bekannt. Dieses acetylierte Acteosidderivat konnte in Cistanche-Arten [Scrophulariaceae; Kobayashi et al., 1984; Kobayashi et al., 1987; Xiong et al., 1998], in *Orobancha ramosa* [Scrophulariaceae; Lahloub et al., 1991], *Brandisia hancei* [Scrophulariaceae; Kong et al., 1999] und in *Sanango racemosum* [Loganiaceae; Jensen et al., 1996], neben Acteosid, gefunden werden.

Zur Aufklärung der Struktur des 6'-O-Acetylacteosids wurden spektroskopische Methoden, 1D-NMR- und 2D-NMR-Experimente, verwendet. Die ermittelten Daten wurden mit denen des Acteosids (Kap. 3.2.1, S.94) und denen des 2'-O-Acetylacteosids [Lahloub et al., 1991; Kobayashi et al., 1984; Kobayashi et al., 1987] verglichen. Anhand der chemischen

Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffe der acetylierten gegenüber der nicht acetylierten Glucose lässt sich die Position der Acetylgruppe leicht ermitteln.

¹H-NMR

(Tab. 3.2.3-1, S.107)

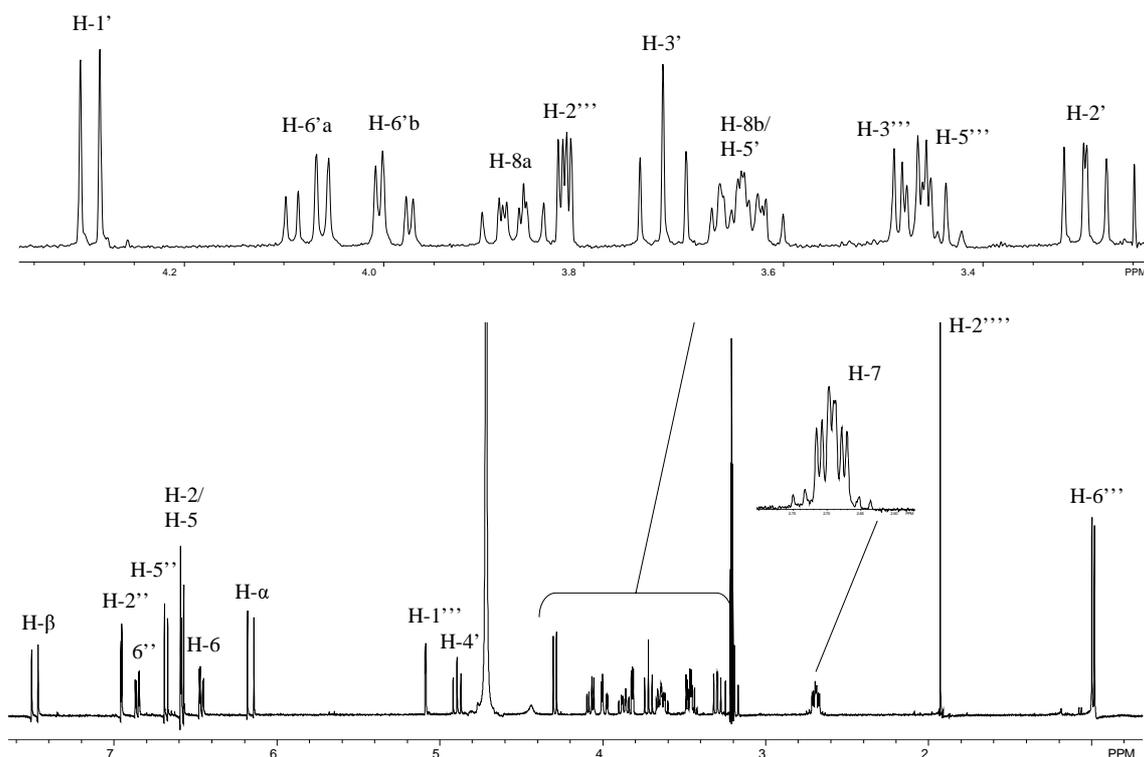


Abb. 3.2.3-2 ¹H-NMR-Spektrum von 6'-O-Acetylacteosid (CD₃OD, 400 MHz); gesamtes Spektrum (unten) und Darstellung des Zuckerbereiches (oben)

Die Multipletts bei δ 2.78 ppm, δ 3.96 ppm und δ 3.73 ppm (Abb. 3.2.3-2), erzeugt durch die Protonen H-7, H-8a und H-8b, weisen wieder darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindung um ein Phenylethanoid handelt. Im tieferen Feld, zwischen δ 6.5 ppm und δ 7.1 ppm, liegen die aromatischen Protonen der Kaffeesäure und des Phenylethanol. Die olefinische Doppelbindung liegt, wie man an der Kopplungskonstante von $J = 15.9$ Hz erkennen kann, in der E-Konfiguration vor.

¹ H	6'-O-Acetylacteosid (CD ₃ OD, 400 MHz)	2'-O-Acetylacteosid (CD ₃ OD, 400 MHz)
Phenylethanol		
2	6.68 d (2.1)	6.64 d (2)
5	6.67 d (8.0)	6.67 d (8)
6	6.55 dd (8.0/2.1)	6.52 dd (8/2)
7	2.78 m	2.69 m
8a	3.96 m	4.08 m
8b	3.73 m	3.67-3.54
Kaffeensäure		
2''	7.05 d (2.1)	7.05 d (2)
5''	6.77 d (8.2)	6.78 d (8.3)
6''	6.95 dd (8.2/2.1)	6.95 dd (8.3/2)
β	6.25 d (15.9)	7.60 d (15.9)
α	7.58 d (15.9)	6.28 d (15.9)
Glucose		
1'	4.38 d (8.0)	4.52 d (8)
2'	3.39 dd (9.2/8.0)	4.86 m
3'	3.81 t (9.2)	4.00 t (9.3)
4'	4.99 dd (9.9/9.2)	4.99 t (9.3)
5'	3.74	3.67-3.54
6'a	4.17 dd (12.2/5.0)	3.67-3.54
6'b	4.08 dd (12.2/2.0)	3.67-3.54
2'''' (OAc)	2.02 s	1.98 s
Rhamnose		
1'''	5.18 d (1.8)	4.80 d (1.6)
2'''	3.91 dd (3.3/1.8)	3.31dd (1.6/3.2)
3'''	3.56 dd (9.4/3.5)	3.51dd (3.5/9.6)
4'''	3.28 t (9.4)	3.26 t (9.6)
5'''	3.55 dd (9.4/6.2)	3.67-3.54
6'''	1.08 d (6.2)	1.08 d (6.2)

Tab. 3.2.3-1 ¹H-NMR-Daten des 6'-O-Acetylacteosids (eigene Messung) und des 2'-O-Acetylacteosids [Lahloub et al., 1991]; δ = ppm, *J* = Hz

Bei Δ 4.38 ppm liegt das anomere Proton der β-konfigurierten Glucose (*J* = 8.0 Hz), bei δ 5.18 ppm liegt das anomere Proton der α-konfigurierten Rhamnose (*J* = 1.8 Hz). Mit Hilfe von Literaturdaten und 2D-Experimenten konnten die weiteren Zuckerprotonen zugeordnet werden (Tab. 3.2.3-1). Gegenüber dem nicht acetylierten Acteosid sind jedoch die Resonanzlagen der Protonen des acetylierten Derivates H-5' (Δ -0.18 ppm), H-6'a (Δ -0.55 ppm) und H-6'b (Δ -0.56 ppm) ins tiefere Feld hin verschoben. Entsprechend der Strukturaufklärung des Isoacteosids (Kap. 3.2.2, S.100) deuten solche Verschiebungen auf eine Veränderung des Moleküls hin. Da sich außer den 3 genannten Protonensignalen keine weiteren Verschiebungen ergeben, besteht eine strukturelle Veränderung gegenüber dem Acteosid lediglich an der Position 6'.

Im höheren Feld ist außer dem Dublett für H-6''' der Rhamnose bei δ 1.08 ppm bei δ 2.02 ppm ein weiteres Signal zu sehen, das in dem Acteosid Spektrum nicht erscheint. Dieses Singulett wird, da es für drei Protonen integriert, von einer Methylgruppe erzeugt. Die Tieffeld-Verschiebung der Methylgruppe zu δ 2.02 ppm wird durch die benachbarte Carbonylfunktion hervorgerufen [Friebolin, 1999].

Vergleicht man das Spektrum des Acteosids mit dem des 2'-O-Acetylacteosids [Lahloub et al., 1991], so ergibt sich für das H-2', über dessen Hydroxylgruppe die Acetylfunktion gebunden ist, eine Tieffeldverschiebung von Δ -1.47 ppm, für H-1' und H-3' eine Hochfeldverschiebung von Δ +0.14 ppm bzw. Δ +0.19 ppm. Das Signal der Methylgruppe liegt bei δ 1.98 ppm.

Aus den Beobachtungen ergibt sich, dass die Acetylgruppe über die Hydroxylgruppe des C-6' der Glucose gebunden vorliegt.

¹³C-NMR

(Tab. 3.2.3-2, S.109)

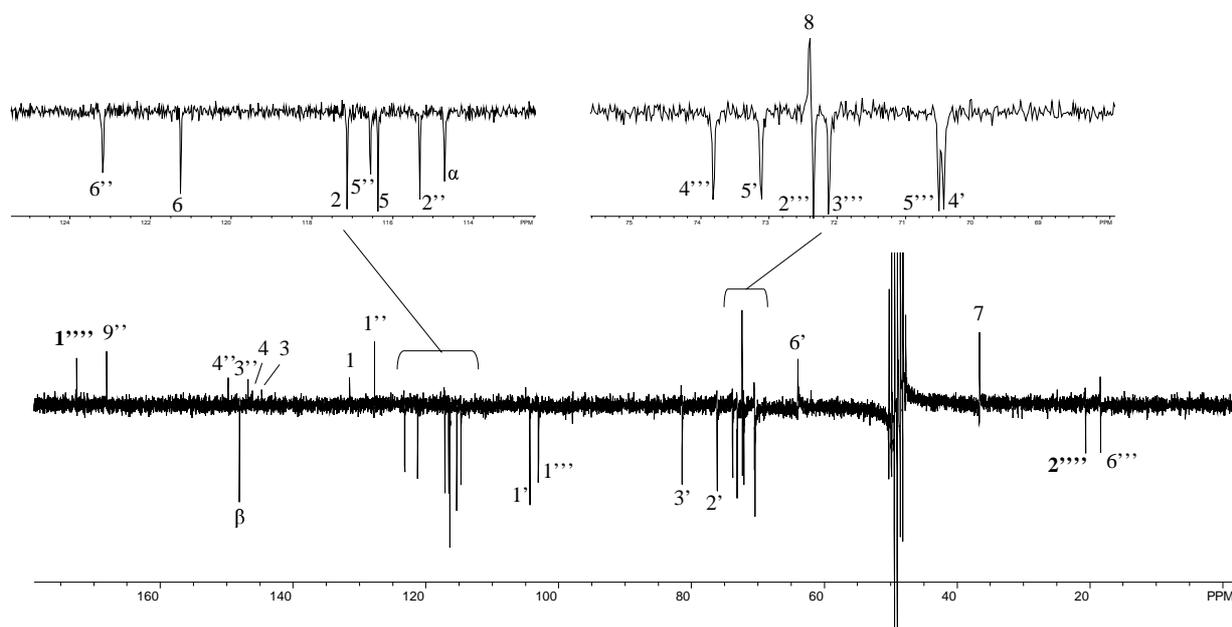


Abb. 3.2.3-3 APT-Spektrum von 6'-O-Acetylacteosid; CD₃OD, 50 MHz

Das ¹³C-NMR Spektrum (Abb. 3.2.3-3 (APT)) stimmt zum größten Teil mit dem des Acteosids (Kap. 3.2.1, S.94) überein. Die Signale des Phenylethanol, der Kaffeesäure, der Glucose und Rhamnose können dem Spektrum mit Hilfe von Literaturdaten und 2D-NMR-Experimenten zugeordnet werden.

Anstelle von 29 Signalen zeigt diese Verbindung jedoch 31 Signale. Die zusätzlichen Peaks (δ 172.5 ppm, δ 20.6 ppm) können anhand der chemischen Verschiebungen und des APT-Spektrums der Carbonylfunktion und Methylgruppe des Acetylrestes zugeordnet werden. Infolge einer höheren Abschirmung der Carbonylfunktion durch die Methylgruppe liegt das Signal für C-1'''' im tieferen Feld als das Signal für die Carbonylfunktion der Kaffeesäure [Friebolin, 1999]. Die CH₃-Gruppe (C-2''''') wird durch die Nachbarschaft der Carbonylgruppe gegenüber der Methylgruppe der Rhamnose ins tiefere Feld verschoben.

¹³ C	6'-O-Acetylacteosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	2'-O-Acetylacteosid (CD ₃ OD, 100 MHz)	APT (6'-O-Acetylacteosid) (CD ₃ OD, 50 MHz)
Phenylethanol			
1	131.4	131.77	C / CH ₂
2	117.0	116.55	CH / CH ₃
3	146.1	144.60	C / CH ₂
4	144.7	146.03	C / CH ₂
5	116.3	117.20	CH / CH ₃
6	121.2	121.30	CH / CH ₃
7	36.6	36.32	C / CH ₂
8	72.4	71.85	C / CH ₂
Kaffeesäure			
1''	127.7	127.62	C / CH ₂
2''	115.2	114.59	CH / CH ₃
3''	146.7	146.85	C / CH ₂
4''	149.7	149.85	C / CH ₂
5''	116.5	116.28	CH / CH ₃
6''	123.2	123.27	CH / CH ₃
α	114.6	115.25	CH / CH ₃
β	148.1	148.17	CH / CH ₃
CO	168.1	168.08	C / CH ₂
Glucose			
1'	104.3	101.72	CH / CH ₃
2'	76.1	76.10	CH / CH ₃
3'	81.4	80.55	CH / CH ₃
4'	70.4	70.78	CH / CH ₃
5'	73.1	75.14	CH / CH ₃
6'	63.9	62.20	C / CH ₂
1''''	172.5	171.51	C / CH ₂
2''''	20.6	20.91	CH / CH ₃
Rhamnose			
1'''	103.1	103.32	CH / CH ₃
2'''	72.3	72.61	CH / CH ₃
3'''	72.1	71.83	CH / CH ₃
4'''	73.8	73.62	CH / CH ₃
5'''	70.4	70.64	CH / CH ₃
6'''	18.4	18.52	CH / CH ₃

Tab. 3.2.3-2 ¹³C-NMR-Daten und Auswertung des APT-Spektrums von 6'-O-Acetylacteosids (eigene Messung) und ¹³C-NMR-Daten von 2'-O-Acetylacteosids [Lahloub et al., 1991]; ; δ = ppm

Bei dem Vergleich der Spektren von Acteosid und 6'-O-Acetylacteosid fällt weiterhin auf, dass C-5' um Δ 2.9 ppm ins höhere Feld und C-6' um Δ 1.5 ppm ins tiefere Feld verschoben sind. Die chemischen Verschiebungen der Glucose, die sich durch die Acetylgruppe bei 2'-O-Acetylacteosid ergeben, sind für die beteiligten Protonen ähnlich. Die Verschiebungen der benachbarten Kohlenstoffe (C-1' und C-3') mit Δ 2.5 ppm und Δ 1.3 ppm ins höhere Feld sind größer als die Verschiebung des Kohlenstoffes (C-2', Δ 0.8 ppm - Hochfeld), an dessen Hydroxylgruppe der Acetylrest gebunden ist. Das bestätigt die Annahme, dass die Acetylgruppe an der OH-Gruppe des C-6' gebunden ist. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass bei 2'-O-Acetylacteosid dieser Kohlenstoff an der Acetylgruppe (C-2') ins Hochfeld, während bei 6'-O-Acetylacteosid er ins Tieffeld (C-6') verschoben ist. Eine weitere Absicherung der Position der Acetylgruppe, erhält man durch die chemischen Verschiebungen einer 6'-O-acetylierten [^{13}C -NMR Daten bei Boros et al., 1990] gegenüber einer unsubstituierten Glucose. C-5' ist dabei um Δ 3.7 ppm in das höhere und C-6' um Δ 0.8 ppm in das tiefere Feld verschoben.

2D-NMR-Experimente

Mit Hilfe des COSYs konnte die Signallage des H-5' im Protonenspektrum ermittelt werden. Wie erwartet ergibt sich für C-1'''' keine Korrelation mit einem Proton. Demnach wird bestätigt, dass C-1'''' ein quartäres C-Atom ist. Die Protonen der Methylgruppe (H-2''') korrelieren mit dem entsprechenden Signal im ^{13}C -Spektrum (C-2''') Die Zuordnung der weiteren Protonen des Moleküls konnte im COSY und HETCOR bestätigt werden.

Die Korrelationen im HMBC-Spektrum des 6'-O-Acetylacteosids bestätigen die in den Tabellen 3.2.3-1 (S.107) und 3.2.3-2 (S.109) angegebenen Zuordnungen der Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum. Weiterhin zeigt das HMBC (Abb. 3.2.3.-4), dass die Methylgruppe (H-2''') über eine ^2J -Kopplung an die Carbonylfunktion (C-1''') gebunden ist. Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen ergibt sich für die isolierte Verbindung die in Abb. 3.2.3-1 (S.105) angegebene Strukturformel.

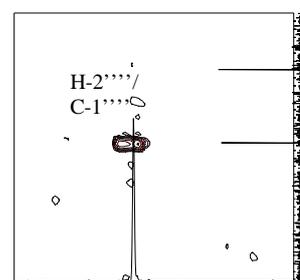


Abb. 3.2.3-4 Ausschnitt aus dem HMBC des 6'-O-Acetylacteosids

MS

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Verbindung wurde ein ESI-MS-Spektrum im positiven Modus aufgenommen. In dem Spektrum liegt das Signal für $[M+Na]^+$ bei 689 m/z. Daraus ergibt sich für das Molekül ein Molekulargewicht von 666. Dies entspricht den Erwartungen.

Im positiven Modus kann man noch die Signale für $[M+Na+1]^+$ bei 690 m/z und für $[M + Na - Glucose]^+$ bei 543 m/z identifizieren.

Drehwert

Für 6'-O-Acetylacteosid (1.67 mg/mL;

$[\alpha]_D^{20}$

Methanol) konnte ein spezifischer Drehwert von -56.5° ermittelt werden. Dieser Drehwert weicht erheblich von dem des 2'-O-

Eigene Daten	2'-O-Acetylacteosid Kobayashi et al. (1984)
-56.5° (c = 0.16, CH ₃ OH)	-117.6° (c = 1.25, CH ₃ OH)

Acetylacteosid ab, und zeigt damit, dass es sich hier nicht um das bereits bekannte 2'-O-Acetyl-Derivat des Acteosids handelt.

Absorptionskoeffizient

Die Auswertung der spezifischen Absorptionskoeffizienten bei den angegebenen Wellenlängen diente der weiteren Strukturbestätigung. In der folgenden Tabelle werden die spezifischen Absorptionskoeffizienten des 6'-O-Acetylacteosids mit denen des 2'-O-Acetylacteosids dargestellt.

Eigene Daten (ϵ)	2'-O-Acetylacteosid Kobayashi et al. (1984) (ϵ)
4.211 ($\lambda = 330$ nm)	4.05 ($\lambda = 334$ nm)
4.153 ($\lambda = 300$ nm)	3.99 ($\lambda = 295$ nm)
	3.89 ($\lambda = 245$ nm)
4.407 ($\lambda = 219$ nm)	4.05 ($\lambda = 222$ nm)

CE

Nach Abspaltung und Derivatisierung der Zuckerbestandteile konnten D-Glucose und L-Rhamnose nachgewiesen werden. L-Glucose und D-Rhamnose konnten durch Koelution mit den entsprechenden Verbindungen ausgeschlossen werden. Die Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum weisen darauf hin, dass Glucose in der β -Form ($J = 8.0$) und Rhamnose in der α -Form ($J = 1.8$) vorliegt.

3.3 Phenolcarbonsäuren

3.3.1 ZIMTSÄURE

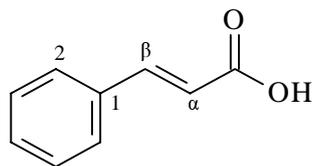


Abb. 3.3.1-1 Strukturformel der Zimtsäure

Zimtsäure wurde sowohl aus der MLCCC-Fraktion IB2 als auch aus der MLCCC-Fraktion IIB2 mittels präparativer HPLC gewonnen (Abb. 2.3-1, S.54). Im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 2.1.2-1, S.33) liegt die Verbindung in der Fließmittelfront, bei einem R_f -Wert von 1. Mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz färbt sich die Substanz auf der DC-Platte nach dem Erwärmen violett. Im HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) ist Zimtsäure in diesem System bei einer Retentionszeit von 22.8 min die letzte detektierbare Verbindung. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 276 nm.

Zimtsäure ist ubiquitär im Pflanzenreich vertreten und stellt den einfachsten Vertreter der Phenylpropanoide dar [Hänsel et al., 1999]. Die Verbindung kommt jedoch selten frei vor, sondern meistens als Ester verschiedener Alkoholkomponenten (Zucker, Phenylpropane, Benzylalkohole und andere; Rimpler, 1999).

Aus *Harpagophytum procumbens* konnte Zimtsäure 1974 im Rahmen der Arbeit von Bauersfeld aus einem Etherextrakt isoliert werden. Weiterhin wurde die Verbindung in mehreren Arbeiten dünnenschichtchromatographisch bzw. im HPLC-Chromatogramm nachgewiesen. Becker et al. entwickelten 1975 ein DC-System, bei dem nach saurer Hydrolyse des Extraktes an Hand der Größe der Zimtsäurebande der Gehalt an Harpagosid semiquantitativ bestimmen werden kann. Pachaly stellte 1982 ein DC-System vor, bei dem Zimtsäure und Harpagosid im Extrakt identifizieren werden konnten. Chrubasik et al. (1996) quantifizierten Zimtsäure neben Harpagosid und anderen unbekanntem Substanzen bei der Untersuchung des Wirkstoffgehaltes in Arzneimitteln aus einem *Harpagophytum procumbens*-Extrakt.

Da Zimtsäure als Strukturbestandteil einiger Iridoide (Harpagosid Abb. 3.1.1-1, S.57) vorkommt, ist es denkbar, dass die Substanz ein Abbauprodukt dieser Iridoide darstellt. Bestätigt wird diese Vermutung durch eigene Untersuchungen von unterschiedlich hergestellten Extrakten (Kap. 2.2.2-1, S.42). Bei hoher thermischer Beanspruchung des

Extraktes (z.B. wässrige Soxhlet-Extraktion) ist der Harpagosidgehalt geringer und der Zimtsäuregehalt höher als bei schonenderen Extraktionsmethoden (Wirbelextraktion, 20°C). Diese Verbindung konnte in allen bisher untersuchten Extrakten identifiziert werden und ist somit Bestandteil des Inhaltsstoffspektrums der Extrakte von *H. procumbens* und *H. zeyheri*. Das genuine Vorkommen von Zimtsäure in der frischen Pflanze wurde allerdings nicht weiter untersucht.

Die Struktur der Zimtsäure wurde mit Hilfe von spektroskopischen Methoden aufgeklärt.

¹H-NMR

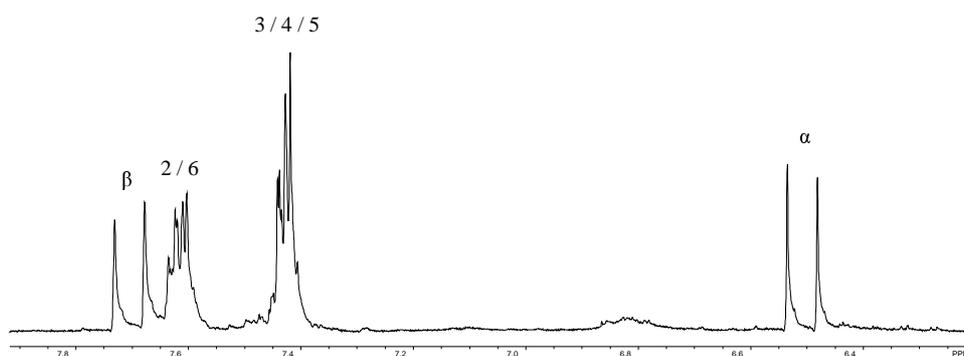


Abb. 3.3.1-2 Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum der Zimtsäure; 300 MHz, CD₃OD

In dem vorliegenden Spektrum kann man die Signale der trans-konfigurierten olefinischen Doppelbindung bei δ 7.66 ppm und δ 6.46 ppm erkennen. Das Multipllett bei δ 7.58 ppm, dessen Integral zwei Protonen umfasst, kann den aromatischen Protonen H-2 und H-6 zugeordnet werden. Da diese Protonen chemisch äquivalent sind, ergeben sie keine getrennten Signale. Das Multipllett bei δ 7.39 ppm wird durch die Protonen H-3, H-4 und H-5 erzeugt. Die komplexe Aufspaltung der aromatischen Protonen ergibt sich durch die möglichen ortho- und meta-Kopplungen.

¹ H	Zimtsäure
α	6.46 d (16.0)
β	7.66 d (16.0)
2	7.58 m
3	7.39 m
4	7.39 m
5	7.39 m
6	7.58 m

Tab. 3.3.1-1 ¹H-NMR-Daten der Zimtsäure; δ = ppm, J = Hz

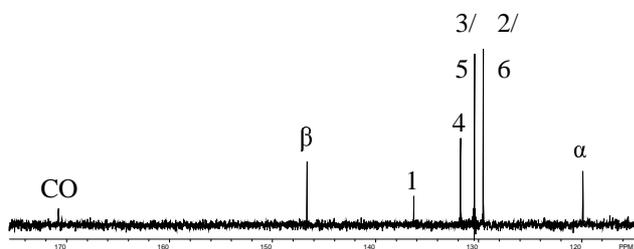
^{13}C -NMR

Abb. 3.3.1-2 Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum der Zimtsäure; 100 MHz, CD_3OD

Im ^{13}C -Spektrum erscheinen die charakteristischen Signale der Zimtsäure. Im tieferen Feld bei δ 170.4 ppm erscheint das kleine Signal des quartären Kohlenstoffes der Carbonylverbindung. C- α und C- β (δ 119.5 und δ 146.2 ppm) umgeben in dem Spektrum die aromatischen Kohlenstoffe. Durch die Carbonylverbindung wird das C- α besser

abgeschirmt als das C- β und erscheint deshalb im höheren Feld bei 119.5 ppm als C- β (146.2 ppm). Auf Grund der Isochronie von C-2/6 und C-3/5 fallen die Signale zusammen.

Durch den Vergleich der hier vorliegenden Spektren mit den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Zimtsäure des Harpagosids kann bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Verbindung um Zimtsäure handelt.

MS

Zur Absicherung der Struktur wurde mittels eines ESI-MS-Spektrums im negativen Modus die Molekülmasse ermittelt. In dem Spektrum können die Signale für $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei 147.4 m/z und $[\text{M}-2\text{H}]^-$ bei 148.4 m/z ermittelt werden. Daraus ergibt sich für die Verbindung das erwartete Molekulargewicht von 148.4.

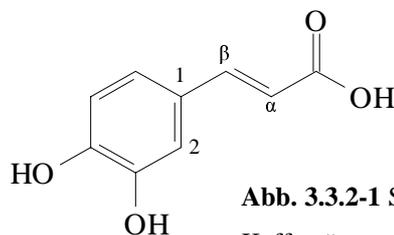
3.3.2 KAFFEESÄURE

Abb. 3.3.2-1 Strukturformel der Kaffeensäure

Die Aufarbeitung der MLCCC- Fraktion IIB2 mittels präparativer HPLC (Kap. 9.1.2.2) ergab neben Zimtsäure Kaffeensäure (Abb. 2.3-1, S.54). Die Verbindung ist im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 2.1.2-1, S.33) bei einem R_f -Wert von 0.88 zu finden und färbt sich mit dem Detektionsmittel (Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) blau. Vor der Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz fällt die Substanz durch eine blaue Fluoreszenz im UV₃₆₆-Licht auf. Im HPLC-Chromatogramm eluiert sie bei 12.3 min und zeigt im UV-Spektrum ein Maximum bei 323 nm (Abb. 2.1.3-1, S.36).

Kaffeensäure ist wie Zimtsäure im Pflanzenreich weit verbreitet, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit zum erstenmal aus einem Extrakt von *Harpagophytum procumbens* isoliert werden. Diese Verbindung bildet häufig mit Alkoholkomponenten einen Ester, wie in den Phenylethanoiden (Kap. 3.2, S.94). Auch hier lässt sich vermuten, dass diese Verbindung ein Abbauprodukt darstellt. Untersuchungen von frischem Pflanzenmaterial zur Ermittlung des genuinen Vorkommens der Kaffeensäure sind nicht durchgeführt worden; die Verbindung konnte jedoch in den bisher untersuchten Extrakten identifiziert werden.

Die Struktur der hier vorliegenden Verbindung wurde mit Hilfe spektroskopischer Methoden aufgeklärt.

$^1\text{H-NMR}$

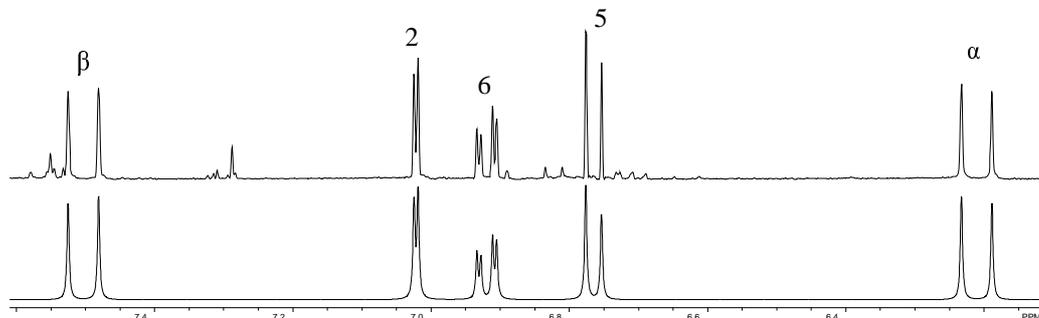


Abb. 3.3.2-2 Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum der Kaffeesäure (CD_3OD , 360 MHz); gemessene Daten (oben) und Simulation (unten)

In dem vorliegenden Spektrum erkennt man bei δ 7.50 ppm und δ 6.21 ppm die beiden Signale der ungesättigten Seitenkette der Kaffeesäure. Die große Kopplungskonstante von $J = 15.9$ Hz weist darauf hin, dass die Protonen trans-konfiguriert vorliegen. Die Signale bei δ 7.02 ppm (H-2), δ 6.76 ppm (H-5) und δ 6.92 ppm (H-6) geben das typische Muster eines 1, 3, 4-trisubstituierten Aromaten wieder. Dabei zeigt H-6 eine schwache meta-Kopplung ($J = 2.1$ Hz) zu H-2 und eine größere ortho-Kopplung ($J = 8.2$ Hz) zu H-5. Im höheren Feld sind außer den Lösungsmittelsignalen (CD_3OD , D_2O) keine weiteren Signale zu erkennen.

$^{13}\text{C-NMR}$

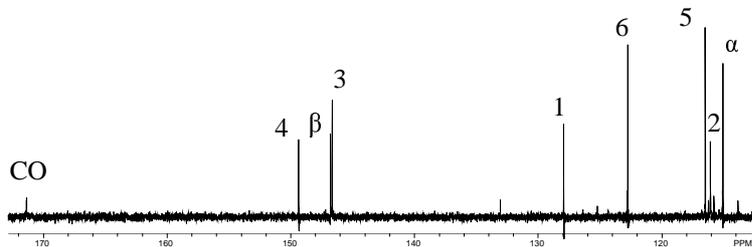


Abb. 3.3.2-2 Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum der Kaffeesäure (CD_3OD , 100 MHz)

Die chemischen Verschiebungen im ^{13}C -Spektrum bestätigen ebenfalls, dass es sich bei der isolierten Substanz um Kaffeesäure handelt. Weit im tiefen Feld bei δ 171.4 ppm liegt das Signal für den Kohlenstoff (CO) der Carboxylgruppe der

Seitenkette. C- α und C- β erzeugen Signale bei δ 115.1 ppm und δ 146.8 ppm, wobei C- α infolge der höheren Abschirmung durch die Carbonylverbindung im höheren Feld liegt als C- β . Die Hydroxylgruppen an den Positionen C-3 und C-4 bewirken eine Tieffeldverschiebung

dieser beiden Signale (δ 146.7 ppm und δ 149.4 ppm) gegenüber den anderen aromatischen Kohlenstoffen.

Weiterhin stimmen die Signale mit dem ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der Kaffeesäure des Acteosids überein.

	^1H -NMR-Daten Kaffeesäure	^{13}C -NMR-Daten Kaffeesäure
CO		171.4
α	6.21 d (15.9)	115.1
β	7.50 d (15.9)	146.8
1		127.9
2	7.02 d (2.1)	116.1
3		146.7
4		149.4
5	6.76 d (8.2)	116.5
6	6.92 dd (8.2/2.1)	122.8

Tab. 3.3.2-1 ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Kaffeesäure;
 δ = ppm, J = Hz

MS

Zur weiteren Absicherung der Struktur wurde die Molekülmasse der Verbindung mittels ESI-MS im negativen Modus bestimmt. In dem Spektrum sind die Signale für $[\text{M}-\text{H}]^-$ bei 179.5 m/z und $[\text{M}]^-$ bei 180.6 m/z. Daraus ergibt sich für die Molekülmasse der vorliegenden Verbindung ein Wert von 180.6. Die Masse stimmt mit dem erwarteten Wert überein.

3.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wird der Extrakt aus den sekundären Speicherwurzeln von *Harpagophytum procumbens* in Europa zur unterstützenden Therapie bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkapparates verwendet. Phytochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass Iridoidglykoside, Phenylethanoide und oligomere Kohlenhydrate in dem Extrakt vorhanden sind. Ebenso konnten geringe Menge an Flavonoiden, Triterpenen und Aminosäuren gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus dem wässrigen Extrakt von *Harpagophyti radix* 5 Iridoidglykoside, 3 Phenylethanoide und 2 Phenolcarbonsäuren isoliert werden.

Bei den Iridoiden handelt es sich um Harpagosid, 8-PCHG, 8-Feruloylharpagid, 8-O-Cinnamoylmyoporosid und Pagosid. Harpagosid und 8-PCHG waren bereits bekannt für *H. procumbens*. Harpagosid stellt die Hauptverbindung des Extraktes dar. 8-Feruloylharpagid war zwar bereits aus verschiedenen Arten der Familie der Scrophulariaceen bekannt, konnte aber hier zum ersten Mal aus *H. procumbens* isoliert werden. Die Struktur des 8-O-Cinnamoylmyoporosids war noch nicht bekannt. Bei dieser Verbindung handelt es um das 6-Epimer des Lateriosids. Die Zuordnung der korrekten Konfiguration am C-6 mit Hilfe von Literaturdaten gestaltete sich zum Teil schwierig. In Kapitel 3.1.4 ist ausführlich beschrieben, dass vor 1982 der 6-OH-Gruppe des Ajugols und Lateriosids eine α -Position und des Myoporosids eine β -Position zugewiesen wurde. Mittels des Vergleiches mit weiteren Verbindungen konnte jedoch geklärt werden, dass die Verhältnisse am C-6 umgekehrt vorliegen: Ajugol und Lateriosid besitzen die OH-Gruppe in β -Stellung und Myoporosid in α -Stellung (Damtoft et al., 1982). Daraus und nach Absicherung durch NOE-Experimente stellte sich die hier isolierte Verbindung als Myoporosidderivat heraus. Die α -Konfiguration am C-6 liegt ebenfalls bei den Procumbidderivaten vor. Procumbid wurde 1963 von Stierstorfer aus *H. procumbens* isoliert. Die Struktur des 8-O-Cinnamoylmyoporosids ist ungewöhnlich für *Harpagophytum procumbens*. Die bisher isolierten Iridoide aus *Harpagophytum procumbens* (Harpagosid- und Procumbidähnliche Verbindungen) wiesen alle eine Hydroxylgruppe an der Position C-5 auf.

Die Struktur des Pagosids war ebenfalls noch nicht bekannt. Sie weist eine große Ähnlichkeit mit dem Harpagogenin [Vanhaelen, 1986] auf. Pagosid enthält jedoch p-Cumarsäure und Glucose als Substituenten und weist anstelle einer Aldehydfunktion eine Carbonsäure auf. Ob es sich bei dem Pagosid um eine Vorstufe oder ein Metabolisierungsprodukt der

Iridoidglykoside handelt, ist nicht bekannt. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um ein Artefakt, das bei der Extrakterstellung entsteht, da diese Verbindung sowohl in schonend (Ultraturax) hergestellten als auch in nicht schonend hergestellten Extrakten (Soxhlet) in ähnlicher Konzentration vorhanden ist. Vorstellbar ist einerseits, dass Pagosid im Rahmen der Biogenese aus dem Iridodial (Enolform) durch Demethylierung am C-4, Reduktion der Enol- zur Ethanolfunktion und Oxidation der Aldehydgruppe zur Carbonsäure entsteht. Durch Hydroxylierung am C-6 und Einfügen einer Doppelbindung in das Cyclopentan läge das Pagosid-Grundgerüst vor. Eine derartige Syntheseweg ist jedoch in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Zum anderen könnte Pagosid auch durch Metabolisierungsreaktionen aus denen in *Harpagophytum procumbens* vorkommenden C-9-Iridoiden entstehen. Aus der Dialdehydform, die infolge der Deglucosidierung und Öffnung des Lactonringes entsteht, könnte durch Dehydratisierungsreaktionen und Oxidation bzw. Reduktion der funktionellen Gruppen zu einer Alkohol- bzw. Carbonsäurefunktion ebenfalls das Pagosid entstehen.

Aus der Gruppe der Phenylethanoide wurden Acteosid, Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid isoliert. Acteosid und Isoacteosid sind bereits für *Harpagophytum procumbens* beschrieben worden. Die Isolierung von Isoacteosid erforderte gewisse Vorsichtsmaßnahmen, da sich diese Substanz bereits bei Raumtemperatur zersetzt. Die Struktur des 6'-O-Acetylacteosids war noch nicht bekannt. Durch die charakteristischen Signalverschiebungen in den NMR-Spektren des acetylierten Derivates gegenüber der nicht acetylierten Verbindung Acteosid konnte die Position der Acetylgruppe zweifelsfrei bestimmt werden.

Von den Phenolcarbonsäuren konnte die für den Harpagophyti radix-Extrakt bereits bekannte Zimtsäure und die noch unbekannt Kaffeesäure isoliert werden. Beide Verbindungen sind sowohl in den Extrakten von *H. procumbens* als auch in denen von *H. zeyheri* identifiziert worden. Vorstellbar ist, dass es sich bei diesen beiden Verbindungen um Abbauprodukte handelt. Es wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Die Strukturen wurden mit Hilfe von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (1D- und 2D-NMR) aufgeklärt. Die vollständigen Daten sind in Tabellen in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Die ermittelten Kopplungskonstanten wurden zum Teil mit Hilfe von Simulationen bestätigt. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Daten wurde durch 2D-NMR-Experimente erhärtet. Die Absicherung der Zuckerbestandteile und die Zuordnung zur D- oder L-Reihe erfolgte mittels einer kapillarelektrophoretischen Methode nach Hydrolyse und Derivatisierung der Monosaccharide [Noe et al., 1995].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für *Harpagophytum procumbens* bekannten Iridoide Harpagid, Procumbid, Procumbosid und 6'-O-(p-Cumaroyl)-procumbid nicht isoliert. Kikuchi et al. (1983) konnten die Procumbidderivate aus einer mit Ethylacetat ausgeschüttelten Wasserphase eines methanolischen Extraktes gewinnen. Es ist demnach möglich, dass diese Iridoidderivate nach dem Ausschütteln mit Ethylacetat in der wässrigen Phase verblieben sind, die hier nicht weiter aufgearbeitet worden ist.

Aus der Gruppe der Phenylethanoide wurde nur das β -(3',4'-dihydroxyphenyl)ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3) β -D-glucopyranosid, das 1987 von Burger et al. neben Acteosid und Isoacteosid aus *H. procumbens* gewonnen werden konnte, nicht isoliert.

Da lediglich die Ethylacetat-Fraktion des wässrigen Extraktes weiter bearbeitet worden ist, wurden weder die Kohlenhydrate, die sich in der wässrigen Phase befinden, noch die sich in der Etherausschüttlung vorhandenen Verbindungen wie Triterpene, Steroide, Flavonoid-Aglyka untersucht.

Beim Vergleich der hier gewonnen NMR-Daten mit denen der Literatur fällt auf, dass einige der hier isolierten Verbindungen (Acteosid, Isoacteosid, Harpagosid, 8-Feruloylharpagid) in vielen Arten der Familie der Scrophulariaceen vorkommen. Insbesondere Harpagosid und Acteosid konnten aus vielen Arten der Scrophulariaceen isoliert werden. Die beiden Verbindungen liegen z.B. in *Scrophularia ningpoensis* [Yi-Ming et al., 1999] und *Rogeria adenophylla* [Potterat et al., 1991] wie in *Harpagophytum procumbens* nebeneinander vor. Lateriosid, das C-6-Epimer des 8-Cinnmoylmyoporosids, konnte neben Harpagosid aus *Verbascum thapsus* [Pardo et al., 1998], *Verbascum nigrum* [Seifert et al., 1982] und *Scrophularia lateriflora* [Swiatek et al., 1981] gewonnen werden. Hegnauer beschrieb schon 1968 die aus chemotaxonomischer Sicht enge Beziehung zwischen den Scrophulariaceen, Martyniaceen, Gesneriaceen, Bigoniaceen und Pedaliaceen. Die Gemeinsamkeiten bestehen u.a. im Vorkommen aucubinartiger Glucoside, Stachyose anstelle von Stärke als Reservekohlenhydrat und Kaffeesäurederivate. Die Isolierung von 8-Feruloylharpagid, dessen Vorkommen bisher nur in *Scrophularia ningpoensis* bekannt war, aus dem Extrakt von *Harpagophyti radix* bestätigt wiederum die enge Beziehung zwischen den Scrophulariaceen und Pedaliaceen.

Auf Grund des Harpagosidgehaltes wurde das Kraut von *Scrophularia nodosa* als Ersatzdroge für *H. procumbens* vorgeschlagen [Becker und Richter, 1975]. Vanhaelen (1986) lehnte diesen Vorschlag, trotz der nahen chemotaxonomischen Beziehung auf, Grund eines unterschiedlichen Inhaltsstoffspektrums ab.

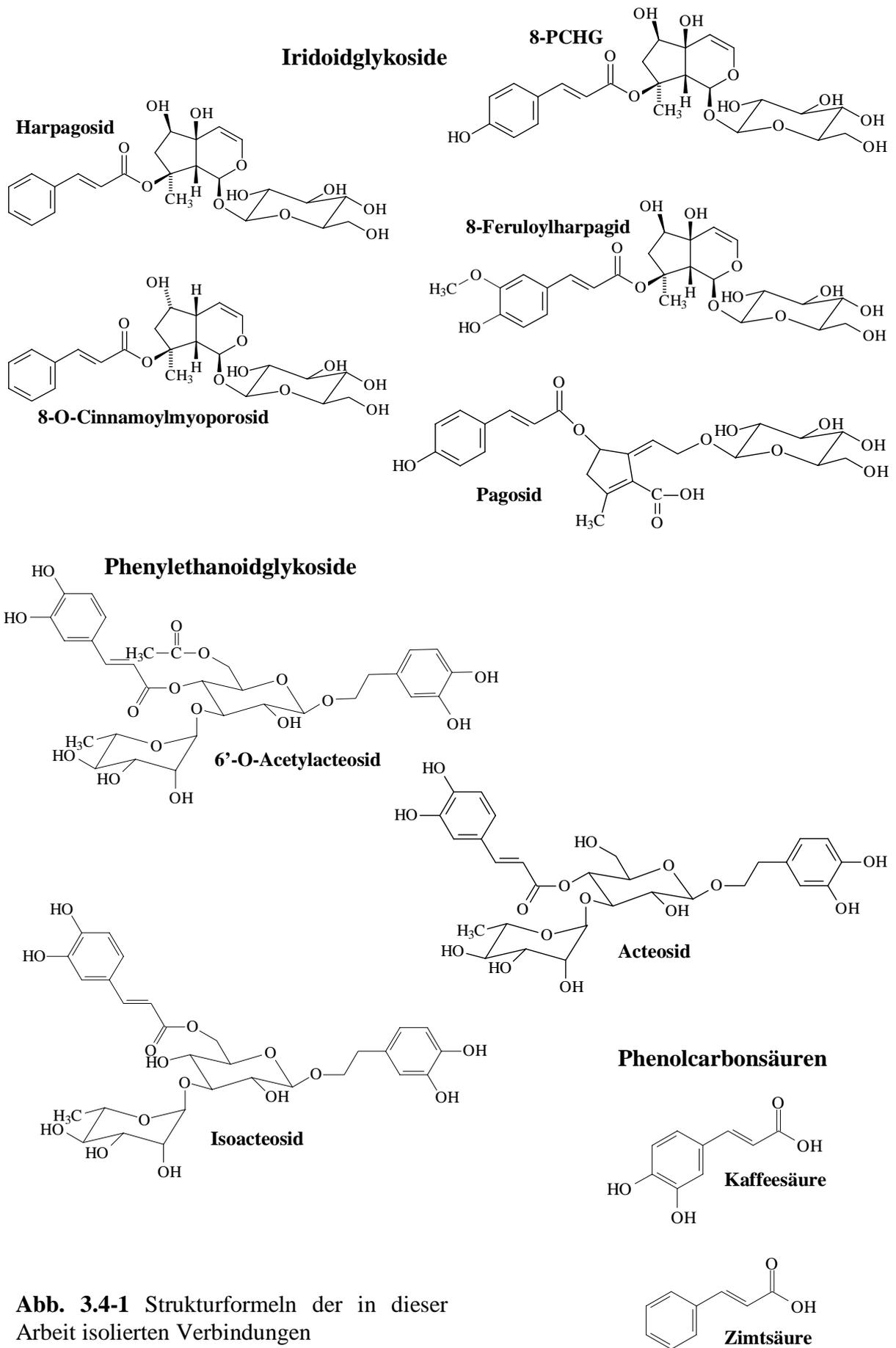


Abb. 3.4-1 Strukturformeln der in dieser Arbeit isolierten Verbindungen

4 Hemmung der Elastase-Aktivität

Es gibt infolge tierexperimenteller und klinischer Studien viele Hinweise auf die antiarthritische und antirheumatische Aktivität des Extraktes von *Harpagophytum procumbens*. Die Wirkprinzipien und die Wirksubstanzen konnten allerdings noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. In einigen Studien wurde die Beeinflussung der Arachidonsäure-Kaskade und der Cytokinproduktion als Basis der antiinflammatorischen Wirkung des Extraktes untersucht. Im Rahmen der Untersuchungen von Tippler et al. (1986) zeigt ein harpagosidreicher Extrakt von *H. procumbens* (7.3 %) eine ausgeprägtere Hemmung der Cysteinyl-Leukotrien-Freisetzung und Thromboxan B₂-Synthese im Ionophor-stimulierten Vollblut als ein Extrakt mit einer geringeren Konzentration an Harpagosid (2.07 %). Die Aktivität von Harpagosid als Reinsubstanz war jedoch geringer als die der beiden Extrakte. Loew et al. (2001) konnten für einen handelsüblichen *Harpagophyti radix* Extrakt, nicht jedoch für Harpagosid freie Fraktionen eine Hemmung der Cysteinyl-Leukotrien-Freisetzung *in vitro* zeigen. Harpagosid zeigte in diesem Testsystem eine geringere inhibierende Wirkung als der Extrakt. Moussard et al. (1992) und Whitehouse et al. (1983) konnten eine Beeinflussung der Arachidonsäure durch einen *Harpagophyti radix* Extrakt nicht beobachten. Benito et al. (2000) stellten fest, dass Harpagosid signifikant die Freisetzung von TXB₂ vermindert. Die Freisetzung von PGE₂ und LTC₄ konnte weder durch Harpagosid noch durch Harpagid signifikant gehemmt werden. Durch einen von Lipopolysacchariden gereinigten Extrakt von *H. procumbens* konnte die TNF α -Freisetzung aus Monozyten dosisabhängig gehemmt werden. Eine verminderte Freisetzung von IL-6, IL-1 β und PGE₂ durch diesen Extrakt konnte nur in höheren Dosierungen erreicht werden. Harpagosid und Harpagid zeigten keinen Effekt auf die TNF α -Freisetzung [Fiebich et al., 2001].

Ein weiterer Faktor, der neben der Entzündung eine Rolle im rheumatischen Geschehen spielt, ist der Abbau des Knorpelgewebes durch Enzyme, wie Serin- und Matrixmetalloproteinasen. Ein Schlüsselenzym der enzymatischen Knorpeldestruktion ist die Elastase, eine Serinproteinase, die das Knorpelgewebe aufweicht und ihm auf diese Weise die Funktion als Stützgewebe nimmt [Menninger et al., 1982]. Infolge der Knorpelzerstörung kommt es weiterhin zu einer Ausbreitung und Verstärkung des Entzündungsgeschehens. Eine Hemmung proteolytischer Enzyme wäre somit wünschenswert, um einerseits die Progredienz des Knorpelabbaus zu hemmen und andererseits die Ausbreitung der Entzündung einzudämmen.

Auf Grund dieser experimentellen Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit die hemmende Wirkung des Extraktes und seiner Hauptinhaltsstoffe auf die Aktivität der Elastase *in vitro* untersucht. Entsprechende Testsysteme stehen bereits zur Verfügung. Steinmeyer (1987), Chatterjee et al. (1997) und Melzig et al. (1999) untersuchten z.B. die inhibierende Aktivität von Verbindungen auf die humane, leukozytäre Elastase, Shinguh et al. (1997) verwendeten für ihre Untersuchungen eine aus Sputum gewonnene Elastase und Rajic et al. (1999) nutzten eine aus Schweinepankreas isolierte Elastase. Da, wie bereits erwähnt, die leukozytäre Elastase ein Schlüsselenzym der Knorpeldestruktion (Kap. 1.2.1, S.24) darstellt, wurden die hier durchgeführten Testungen mit Hilfe einer humanen, leukozytären, gereinigten Elastase (ICN Biomedicals Inc., USA) durchgeführt. Dazu wurde das von Melzig et al. (1999) etablierte Testmodell gering nach Steinmeyer et al. (1987) modifiziert (Kap. 4.1.1).

4.1 Versuchsdurchführung¹.

4.1.1 INKUBATIONSANSATZ

Ein Pipettierschema des Elastase-Testsystems ist in Abbildung 4.1.1-1 dargestellt.

Die Untersuchungslösung, Extrakt oder Substanzen gelöst in TRIS-HCl-Puffer, wird in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Anschließend wird das in TRIS-Puffer gelöste Enzym (Humane Leukozytäre Elastase (HLE)) hinzugegeben. Die Mischung wird 5 min im Wasserbad bei 37 ° inkubiert. Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe der Substratlösung (N-(Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitranilid) gestartet. Die Reihenfolge der Lösungszugaben ist gegenüber dem Testsystem von Melzig et al. gering verändert. Dort wird erst die Substratlösung und anschließend die Enzymlösung hinzupipettiert. Zur besseren Anpassung des Enzyms an die

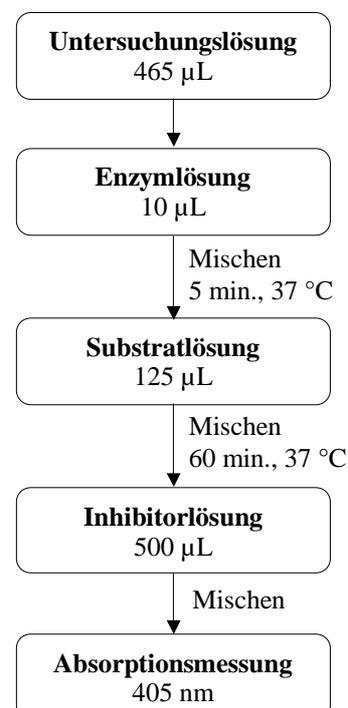


Abb. 4.1.1-1 Pipettierschema der Elastase-Testung

¹ An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Melzig und Beate Rennert (Berlin) bedanken, die sich die Zeit genommen haben, mir dieses Testsystem näher zubringen.

Temperatur wurde die Reihenfolge gewählt, die Steinmeyer (1987) verwendet hat. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Wasserbad wird die Enzymreaktion durch die Zugabe einer Trypsin-Inhibitor-Lösung gestoppt. Die genaue Versuchsdurchführung wird in Kapitel 9.5.2 (S.224) beschrieben.

Die Elastase-Testung wird bei 37°C, dem Temperaturoptimum des Enzymes [Stellmach, 1988], und bei einem pH-Wert von 7.5 durchgeführt. Die Angabe des pH-Optimums der HLE ist in der Literatur nicht einheitlich. Stellmach (1988) nennt ein pH-Optimum von 8.5-9.2, Starkey et al. (1976) geben ein Optimum von 8.2-9.2 und einen pH-Arbeitsbereich von 7-10 an und Steinmeyer beschreibt ein pH-Optimum von 7.5-10. Der in dem Inkubationsansatz vorliegende pH-Wert liegt nahe dem physiologischen pH-Wert im Blut und Serum (pH 7.41, Pschyrembel), Somit stellt der pH-Wert im Testsystem einen Kompromiss dar, zwischen physiologischen Bedingungen und optimaler Enzymaktivität.

Die Elastase spaltet aus dem (Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitranilid (Substrat) das 4-Nitroanilin (Abb. 4.1.1-2) ab, welches dann bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Die Höhe der gemessenen Absorption ist proportional zu der Aktivität des Enzyms und umgekehrt proportional zu der Hemmung. Nakajima et al. (1997) untersuchten mehrere Nitroanilin-Substrate bezüglich ihrer Affinität gegenüber der Elastase. Dabei zeigt die Elastase bei dem Einsatz von (Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitranilid die größte Aktivität. Weiterhin stellten sie fest, dass der Methoxysuccinyl-Rest nicht nur die Aktivität des Enzyms steigert, sondern auch die Löslichkeit des Substrates verbessert.

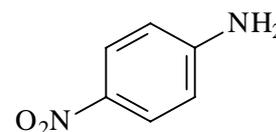


Abb. 4.1.1-2 Struktur des 4-Nitroanilins

Die Enzymreaktion wird durch die Zugabe eines Trypsin-Inhibitors aus Sojabohnen abgestoppt. Infolge der nahen Verwandtschaft und der Ähnlichkeit [Streyer, 1994] von Trypsin und Elastase kann die Elastase-Aktivität durch diesen Inhibitor effektiv herabgesetzt werden. Die Ähnlichkeit von Elastase und Trypsin ist gekennzeichnet durch eine 40%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, eine ähnliche Tertiärstruktur, eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat und einem identischen katalytischen Mechanismus [Streyer, 1994]. Für humane Trypsin-Inhibitoren [Bode et al. 1989] und dem Bowman-Birk Inhibitor aus Sojabohnen, ebenfalls ein Trypsin-Inhibitor [Larionova et al., 1997], wird beschrieben, dass die Elastase mit diesen Inhibitoren einen festen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet, der nur sehr langsam wieder gespalten wird. Dieser Mechanismus lässt sich auch bei der Hemmung der Elastase durch den Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen vermuten.

4.1.2 AUSWERTUNG

Neben den eigentlichen Testlösungen wurden in jedem Testdurchlauf verschiedene Leerwerte (Substratleerwert, Pufferleerwert, Testleerwert) mitvermessen. Diese Leerwerte enthalten nur die entsprechenden Substanzen in der in der Testung eingesetzten Konzentration (Kap. 9.5.2.2, S.226). Das soll verhindern, dass die Eigenabsorptionen der beteiligten Verbindungen das Ergebnis der Testung beeinflussen. Diese Leerwerte werden von der Absorption der Testlösung subtrahiert.

In einem Testansatz wurde die zu untersuchende Substanz in 5 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Jede Konzentration wurde als Dreifachwert bestimmt und anschließend gemittelt.

Zur Berechnung der Restaktivität des Enzyms wurde die gemittelte Absorption prozentual auf die Absorption eines 100 %-Wertes bezogen. Der Inkubationsansatz des 100 %-Wertes setzt sich zusammen aus der Enzymlösung, der Substratlösung und dem Puffer; die Absorption dieser Lösung entspricht der vollen Aktivität des Enzyms.

Ein Testansatz wurde drei bis vier Mal pro Tag wiederholt. Die ermittelte Hemmung jeder Konzentration wurde wiederum gemittelt. Dieser Wert wurde im logarithmischen Maßstab in einem Diagramm (Excel) gegenüber der Konzentration aufgetragen. Es wurde eine Regressionsgerade ermittelt, aus deren Steigung anschließend der IC_{50} -Wert berechnet werden konnte. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration einer Substanz wieder, die die Aktivität des Enzyms unter den angegebenen Messbedingungen um 50 % hemmt.

Die Angabe der IC_{50} -Werte erfolgt für die Extrakte und für die Fraktionen in $\mu\text{g/mL}$. In dieser Weise lassen sich die Ergebnisse von Extrakten und Verbindungen besser miteinander vergleichen. Die IC_{50} -Werte der Verbindungen werden sowohl in $\mu\text{g/mL}$ als auch in mmol/L in Tab. 4.4-1 (S.145) dargestellt.

Um abzuschätzen, welchen Anteil die Reinsubstanzen an der Aktivität des Extraktes haben, wurde die prozentuale Hemmung der jeweiligen Verbindung entsprechend der Konzentration im Extrakt (HPLC-Quantifizierung, Abb. 2.2.2-1, S.45) der hemmenden Aktivität des Extraktes gegenübergestellt.

4.2 Vorversuche

Die Vorversuche beschränkten sich auf die Bestimmung der Enzymaktivität, der Substratabhängigkeit und des IC_{50} -Wertes der Kaffeesäure als Referenzsubstanz. Diese Untersuchungen werden in den nächsten Kapiteln näher erläutert. Die Eigenschaften der Elastase sind in vielfacher Weise bereits untersucht worden [Steinmeyer, 1987; Deshun und Sadler, 1998; Bode et al., 1989], so dass weitere Bestimmungen, z.B. bezüglich des Temperatur- oder pH-Optimums, im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden sind.

4.2.1 BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT

Unter Enzymaktivität versteht man die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der eine enzymkatalysierte Reaktion beschleunigt wird. Liegen die benötigten Reaktionspartner im Überschuss vor, ist die Geschwindigkeit des Substratumsatzes proportional zu der im Testansatz vorhandenen Enzymmenge. Aus diesem Grund kann die enzymatische Aktivität über die Produktbildung bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen bestimmt werden [Löffler, 2001].

Für jede neue Charge der Humanen Neutrophilen Elastase wurde die Aktivität bestimmt. Damit sollte zum einen die Funktionsfähigkeit des Enzyms geprüft werden, zum anderen wurde auf diese Weise ermittelt, welche Enzymmenge für die Testungen optimal ist.

Das lyophilisierte Enzym wurde mit Aqua destillata versetzt und wie in Kap. 9.5.2.4 (S.227) beschrieben verdünnt. Die unterschiedlich konzentrierten Enzymlösungen wurden mit Puffer und Substratlösung ((Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitrilanilid) versetzt und eine Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des Trypsin-Inhibitors gestoppt und die Absorption des abgespaltenen 4-Nitroanilins gemessen.

Wie in der Abbildung 4.2.1-1 (S.127) zu erkennen, nimmt der Produktumsatz mit steigender Enzymmenge zu. Das Enzym ist demnach unter den Bedingungen des Testsystems aktiv.

Der Linearitätsbereich des Detektors ist abhängig vom Lambert-Beerschen-Gesetz, das in einem Absorptionsbereich zwischen 0.2 und 0.8 gilt [Adam und Becker, 2000]. Aus diesem Grund knickt die Enzymaktivitätskurve bei höheren Absorptionen (bei einer Enzymmenge von 225 ng) ab. Messungen außerhalb des Linearitätsbereiches sind ungenau. Um eine Richtigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden Enzymmengen in dem Testsystem eingesetzt, dessen Produktlösungen eine Absorption zwischen 0.2 und 0.8 aufwiesen. Von

dem Enzym, dessen Aktivität in Abbildung 4.2.1-1 dargestellt ist, wurde in den folgenden Testungen pro Reaktionsansatz eine Menge von 75 ng eingesetzt.

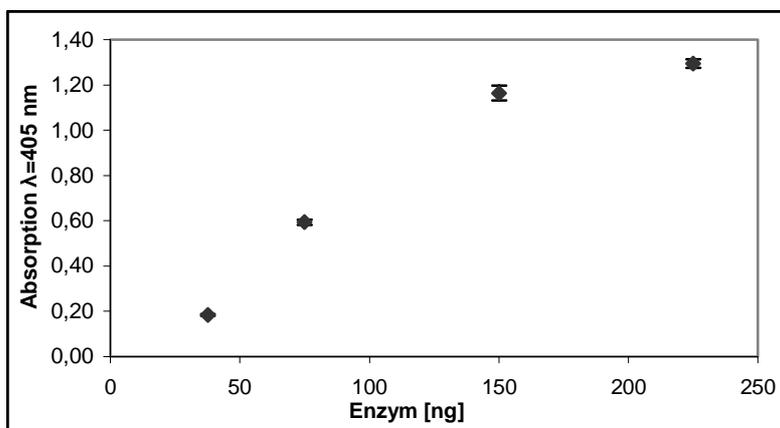


Abb. 4.2.1-1 Enzymaktivitätskurve (n = 2)
Substrat: (Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitrilid

4.2.2 UNTERSUCHUNG DER SUBSTRATABHÄNGIGKEIT

Um eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit zu gewährleisten, muss die Substratkonzentration ((Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitrilid) so hoch gewählt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit maximal ist. Die Substratkonzentration darf in dem System nicht den limitierenden Faktor darstellen [Steinmeyer, 1987].

Zur Ermittlung der Substratabhängigkeit wurden Messungen mit konstanter Enzymmenge und variierender Substratkonzentration wie in Kapitel 9.5.2.5 (S.228) beschrieben durchgeführt. Damit soll gewährleistet werden, dass bei der eingesetzten Substrat- und Enzymkonzentration die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

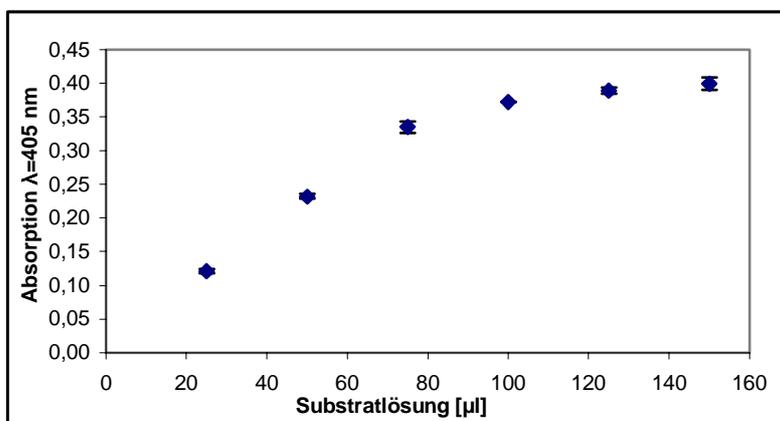


Abb. 4.2.2-1 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (n = 2)

Trägt man die Konzentration der Substratlösung gegen die Absorption auf, stellt die Kurve eine Hyperbel dar. Das bedeutet, dass bei niedriger Substratkonzentration nicht alle aktiven Zentren des Enzyms mit Substrat besetzt sind. Der Umsatz an 4-Nitroanilin ist in dem Fall proportional zur eingesetzten Substratmenge. Würde man die Testung in diesem Bereich (25 μ L-75 μ L Substratlösung) durchführen, wäre die Konzentration an Substrat der limitierende Faktor und die ermittelten Enzymaktivitäten wären zu niedrig.

Bei höheren Substratkonzentrationen geht die Proportionalität verloren und die Kurve flacht ab. Das Enzym ist nun mit Substrat vollständig gesättigt, d.h.. alle aktiven Zentren sind mit Substrat besetzt. Durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration kann die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr gesteigert werden.

Der Elastase-Assay wird mit 125 μ L einer 1.4 mM Lösung des Substrates durchgeführt. Mit dieser Konzentration ist die Konstanz der Reaktionsgeschwindigkeit und die Unabhängigkeit von der Substratmenge gewährleistet.

4.2.3 TESTUNG DER KAFFEESÄURE

Kaffeesäure wurde als Referenzsubstanz für dieses Elastase-Testsystem verwendet. Hiermit sollte überprüft werden, in wie weit die hier erzielten Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar sind. Da das Testsystem nach der Methode von Melzig et al. durchgeführt worden ist, lag es nahe, eine Substanz als Vergleich zu nehmen, dessen IC_{50} -Wert dort bereits bestimmt worden ist. Melzig et al. (1999) erkannten Kaffeesäure als Inhibitor der Elastaseaktivität und ermittelte für sie einen IC_{50} -Wert von 93 μ mol/L.

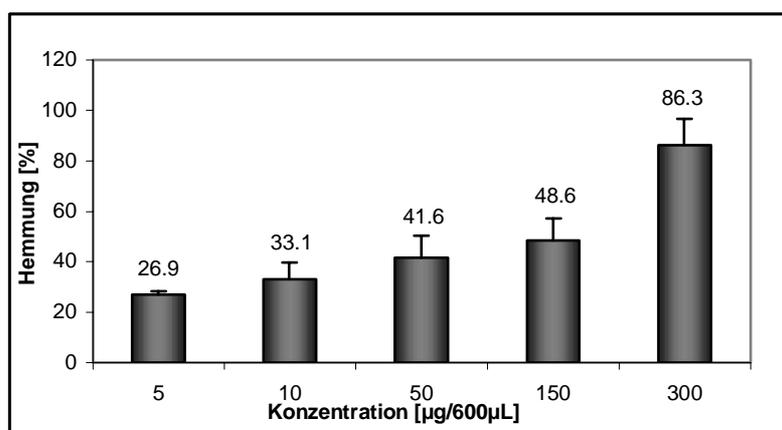


Abb. 4.2.3-1 Hemmung der Elastaseaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen an Kaffeesäure

Die Testung wurde durchgeführt wie in Kapitel 9.5.2.2 (S.226) und 4.1.1 (S.123) beschrieben. In eine halblogarithmische Darstellung der Hemmung gegenüber der Konzentration an Kaffeesäure wurde eine Regressionsgerade gelegt, aus dessen Geradengleichung der IC₅₀-Wert in µg/600 µL berechnet werden konnte. Für Kaffeesäure konnte so ein IC₅₀-Wert von 86 µg/mL (475 µmol/L) ermittelt werden.

Der IC₅₀-Wert, der in dem hier verwendeten Testsystem ermittelt worden ist, ist ca. um das fünf Fache höher als der entsprechende Wert bei Melzig et al.. Diese Differenz ist ungewöhnlich, wenn man bedenkt, dass unsere Testung in der gleichen Weise und mit gleichen Reagenzien durchgeführt worden ist. Optimierungsversuche, wie z.B. Erhöhung der Substratkonzentration, Verwendung einer anderen Enzymcharge veränderten den IC₅₀-Wert nicht.

Ein Unterschied zu dem Testsystem von Melzig et al. könnte in dem Elektrolytgehalt des verwendeten Wassers liegen. Das hier verwendete Aqua dem. wurde weiterhin über eine Milliporeanlage aufgereinigt, während das dort verwendete Wasser zweifach destilliert worden ist. Untersuchungen von Steinmeyer (1987) zeigen, dass die Zugabe einer Elektrolytlösung bestehend aus Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium die Enzymaktivität erheblich steigern kann. Gegebenenfalls war der Elektrolytwert unseres Wassers niedriger.

Weitere Untersuchungen dazu wurden nicht unternommen, da die Elastase in dem hier genutzten System, wie man an Hand der Untersuchung der Enzymaktivität (Kap. 4.2.1, S.126) sehen kann, aktiv ist.

4.3 Hauptuntersuchungen

4.3.1 TESTUNG VON EXTRAKTEN

4.3.1.1 *Harpagophytum procumbens* DC.

Der Extrakt aus den Speicherwurzeln von *Harpagophytum procumbens* (Kap. 8.1.1, S.204), gelöst in TRIS-HCl-Puffer, wurde in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (0.1 µg, 1 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg, 1000 µg) pro Inkubationsansatz (600 µL) auf die Hemmung der Elastase-Aktivität getestet.

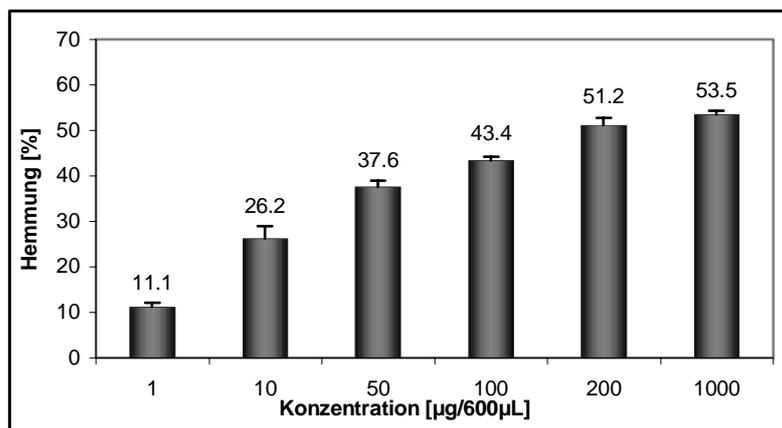


Abb. 4.3.1.1-1 Prozentuale Hemmung der Elastase durch den Extrakt von *H. procumbens*

Aus der Abbildung 4.3.1.1-1 kann man erkennen, dass die Elastase konzentrationsabhängig durch den Extrakt gehemmt wird. Mit steigender Konzentration an Extrakt vermindert sich bis zu einer Konzentration von 200 $\mu\text{g}/600 \mu\text{L}$ proportional die Aktivität des Enzyms. Durch eine weitere Erhöhung der Extraktkonzentration von 200 μg auf 1000 μg im Inkubationsansatz kann die Hemmung des Enzyms nicht weiter gesteigert werden. Eine 100 %ige Hemmung konnte durch den Extrakt nicht erreicht werden.

Auch wenn der inhibitorische Effekt von 55 % bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/600 \mu\text{L}$ nicht sehr ausgeprägt ist, zeigt sich aber trotzdem, dass der Extrakt die Aktivität der Elastase beeinflusst.

Es konnte für diesen Extrakt von *H. procumbens* ein IC_{50} -Wert von 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ermittelt werden.

4.3.1.2 *Harpagophytum zeyheri*

Harpagophytum zeyheri ähnelt *Harpagophytum procumbens* sowohl in morphologisch-anatomischer Hinsicht [Betti, 1994] als auch im Inhaltsstoffspektrum der sekundären Speicherwurzel (Kap. 2.2.2, S.41). Ebenso wie der Extrakt von *Harpagophyti radix* enthält der Extrakt der Wurzel von *H. zeyheri* Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid, 8-Feruloylharpagid, 8-O-Cinnamoylmyoporosid, Kaffeesäure, Zimtsäure, Acteosid und Isoacteosid. Wie in den Abbildungen 2.2.2-1 und -2 (S.45) zu sehen, unterscheiden sich die Extrakte im quantitativen Gehalt dieser Inhaltsstoffe. Insbesondere ist der Gehalt an 8-PCHG in *H. zeyheri* erhöht. Im Gegensatz zu *H. procumbens* ist jedoch in dem untersuchten Extrakt von *H. zeyheri* kein 6'-O-Acetylacteosid vorhanden.

Trotz der Ähnlichkeiten ist *Harpagophytum zeyheri* nicht zur Gewinnung der Droge Harpagophyti radix zugelassen. Als Quelle soll laut Ph.Eur. 2001 nur die sekundäre Speicherwurzel von *Harpagophytum procumbens* verwendet werden. Auf Grund analytischer und tierexperimenteller Studien fordern jedoch Baghdikian et al. (1997), wie 1977 bereits Czygan und Krüger, beide Pflanzen als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Droge zuzulassen. Zur analytischen Unterscheidung der sekundären Wurzel der beiden Arten berechneten Baghdikian et al., wie in Kapitel 2.2 (S.40) erwähnt, den Quotienten aus Harpagosid und 8-PCHG, wobei bei *H. procumbens* der Quotient zwischen 20 und 38 liegt und für *H. zeyheri* auf Grund des hohen 8-PCHG Gehaltes unter 1. Untersuchungen von kommerziell erhältlichen Extrakten ergaben, dass sie aus Mischungen der Wurzeln beider Arten bestanden. Weiterhin konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die Extrakte der beiden Arten weder in der analgetischen Wirkung (Writhing Test) noch in der antiinflammatorischen Wirkung (Carrageenan induzierter Rattenpfotenödem-Test) signifikant unterscheiden.

Die Frage, ob *H. zeyheri* neben *H. procumbens* als Quelle der Droge genutzt werden kann, diente als Motivation, den *H. zeyheri* Extrakt Hz-H90 (Tab. 2.2.2-1, S.42; Abb. 2.2.2-2, S.45) auf die Hemmung der Elastase-Aktivität zu untersuchen.

Dieser Extrakt wurde in den Konzentrationen 5.075 µg, 50.75 µg, 101.5 µg, 507.5 µg, 1015 µg im Inkubationsansatz getestet. Auf Grund von Löslichkeitsproblemen wurde der Extrakt von *H. zeyheri* in höheren Konzentrationen nicht eingesetzt.

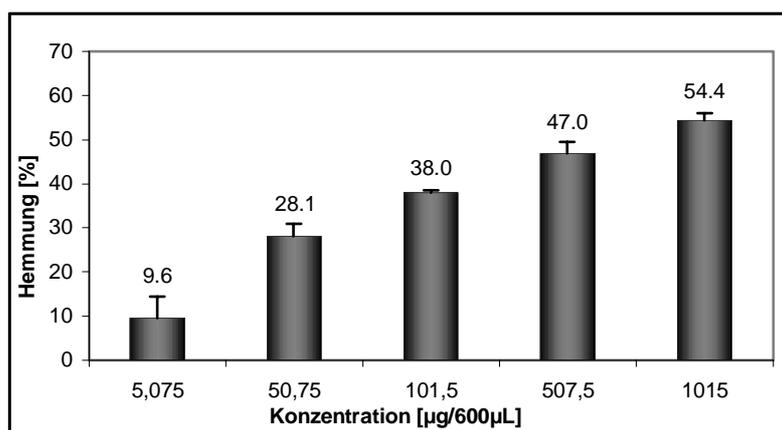


Abb. 4.3.1.2-1 Prozentuale Hemmung der Elastase durch einen Extrakt (Hz-H90) von *Harpagophytum zeyheri*

Auch der Extrakt von *H. zeyheri* zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Elastase-Aktivität. Jedoch kann bei den hier eingesetzten Konzentrationen eine Abflachung der Kurve

wie bei *H. procumbens* nicht erreicht werden. Der ermittelte IC₅₀-Wert von 1012 µg/mL ist fast doppelt so hoch wie der von *H. procumbens*.

Auf die Elastase-Aktivität hat der hier eingesetzte Extrakt von *H. zeyheri* eine weitaus geringere inhibitorische Wirkung als der Extrakt von *H. procumbens*. Dieses Ergebnis kann die Forderung, beide Pflanzen zur Drogengewinnung zu nutzen, nicht unterstützen. Da es sich hier nur um einen Einzelbefund handelt, müssten für eine endgültige Entscheidung sowohl weiteres Drogenmaterial untersucht als auch weitere pharmakologische Testungen durchgeführt werden.

4.3.2 TESTUNG VON FRAKTIONEN

Wie bereits in Kapitel 2.3 (S.51) beschrieben, wurde der Extrakt im ersten Schritt mittels Verteilungschromatographie an Celite® 545 in zwei Fraktionen aufgetrennt. Fraktion B wurde durch Elution mit Ethylacetat und Fraktion A durch Elution mit Wasser gewonnen. Fraktion A wurde nicht weiter aufgearbeitet. Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung dieser Fraktion (Abb. 2.1.2-2, S.34) zeigte, dass dort oligomere Kohlenhydrate vorhanden sind. In der Ethylacetat-Fraktion befinden sich die Verbindungen, die ebenfalls im HPLC-Chromatogramm des Extraktes zu finden sind (Kap. 2.3, S.51). Beide Fraktionen wurden auf die Hemmung der Elastase-Aktivität untersucht.

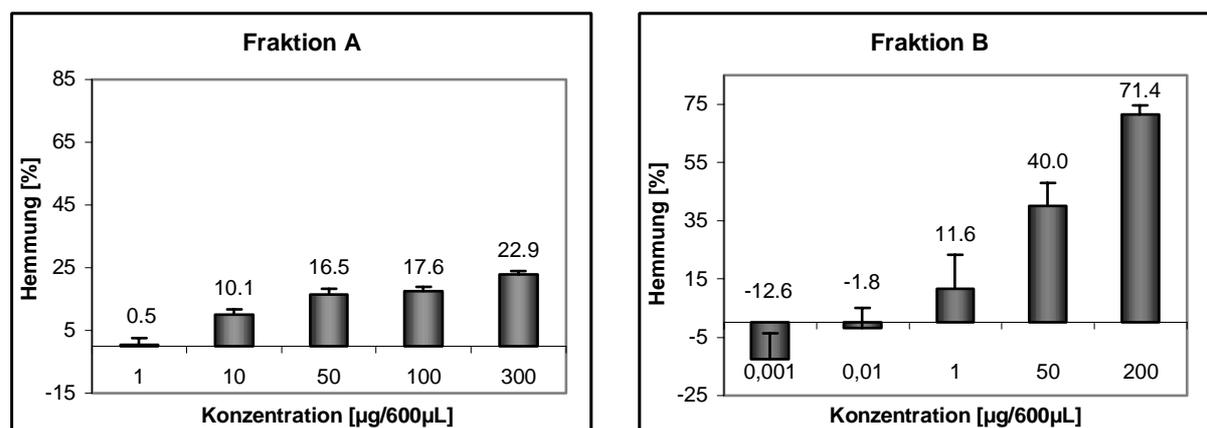


Abb. 4.3.2 Prozentuale Hemmung der Elastase durch Fraktion A (wässrige Fraktion) und Fraktion B (Ethylacetat-Fraktion)

Die Fraktion A (wässrige Fraktion) wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 - 300 µg/Inkubationsansatz getestet. Es konnte keine ausgeprägte und nur eine schwach konzentrationsabhängige Hemmung der Enzymaktivität mit dieser Fraktion erzielt werden. Mit 300 µg/600 µL konnte maximal eine Hemmung von 23 % erreicht werden. Mit einer

Steigerung der Konzentration von 10 µg auf 300 µg/600 µL konnte die Hemmung des Enzyms von 10 % nur auf 23 % erhöht werden. Die wässrige Fraktion nimmt den größten Anteil (95 %) des Extraktes ein (Kap. 2.3, S.51). Ein Vergleich der Hemmung entsprechender Konzentrationen des Extraktes und der Fraktion A miteinander zeigt, dass die Hemmung des Extraktes nur zu einem geringen Anteil auf Verbindungen in der Fraktion A zurückzuführen ist. 100 µg/600 µL des Extraktes hemmen die Elastase-Aktivität um 44 %, während die gleiche Konzentration der Fraktion A die Aktivität nur um 17 % reduziert. Da der Extrakt zu 95 % aus der Fraktion A besteht, konnten die Hemmungen gleicher Konzentrationen miteinander verglichen werden. Da Stachyose nach Stierstorfer (1961) in sehr hoher Konzentration im wässrigen Auszug vorliegt, wurde die Beeinflussung der Elastase durch Stachyose ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3.3 (S.133) vorgestellt.

Fraktion B wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.001 µg bis 200 µg/ Inkubationsansatz getestet. Diese Fraktion zeigt eine weitaus stärkere Hemmung der Elastase-Aktivität als die wässrige Fraktion. Eine Konzentration der Fraktion B von 200 µg/ 600 µL hemmt die Aktivität des Enzyms um 71 %. Der IC₅₀-Wert beträgt 95 µg/ mL und liegt damit im Bereich freier Kaffeesäure. Da aus dem Extrakt ca. 5% Ethylacetat-Fraktion gewonnen werden kann (Kap. 2.3, S.51), kann man die Hemmung von 1000 µg/600 µL Extrakt mit 50 µg/600 µL Fraktion B vergleichen. Bei dieser Konzentration zeigt der Extrakt eine Hemmung der Elastase um 54 % und Fraktion B um 40 %. Daraus wird ersichtlich, dass Verbindungen aus der Fraktion B hauptsächlich an der Hemmung der Elastase durch den Gesamtextrakt beteiligt sind. Wie bereits beschrieben (Kap. 2.3, S.51), sind aus der Fraktion B insgesamt 10 Substanzen isoliert worden. Diese Verbindungen, die im Extrakt mengenmäßig vorherrschen, wurden auf die Hemmung der Elastase-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.3.3 TESTUNG VON REINSUBSTANZEN

4.3.3.1 Harpagosid

Da Harpagosid bezüglich der Konzentration die Hauptsubstanz von den detektierbaren Sekundärstoffen des Harpagophyti radix-Extraktes darstellt, lag das Interesse vieler Studien in der Untersuchung der Wirkung dieser Substanz. Die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien und *in vitro*-Testungen sind zum einen sehr uneinheitlich, zum anderen zeigen sie,

dass die Wirkung gar nicht oder nur zum Teil auf das Harpagosid zurückzuführen ist [jüngste Zusammenfassung: Wegener und Winterhoff, 2001]. Eine antiinflammatorische Wirkung des Harpagosids konnte nur im Carrageenan-induzierten-Rattenpfotenödemtest nach i.v. Injektion beobachtet werden. Ödeme, die durch Formalin oder Ovalbumin ausgelöst worden sind, konnten nicht verringert werden. Eine analgetische Wirkung zeigte Harpagosid im Kaninchenohrtest nach i.v. Injektion [Eichler et al., 1970], im Writhing-Test nach i.p. Verabreichung, nicht jedoch nach p.o. Gabe oder i.v. Injektion [Baghdikian et al., 1997; Erdös et al., 1978; Lanhers et al., 1992]. Im Brennstrahl-Test war Harpagosid wirksam. Die Wirksamkeit war allerdings nicht so hoch wie die des entsprechenden Extraktes, was darauf hindeutet, dass Harpagosid nicht alleine für die analgetische Wirkung verantwortlich ist.

Zur Ermittlung der Wirkmechanismen wurde die Beeinflussung der Arachidonsäure-Kaskade und der TNF α -Freisetzung untersucht. Tippler et al. (1996) konnten eine Hemmung der Cysteinyl-LT- und TXB₂-Biosynthese im Ionophor-A23187-stimulierten Blut durch Harpagosid zeigen. Der Hemmeffekt war jedoch auch hier für die Extrakte stärker ausgeprägt als für die Reinsubstanz. Untersuchungen von Benito et al. (2000) zeigen jedoch, dass Harpagosid weder die PGE₂- noch die LTC₄-Freisetzung signifikant hemmt. Die Hemmung der TXB₂-Freisetzung konnte im Rahmen dieser Untersuchung bestätigt werden. Die Freisetzung von TNF α in Lipopolysaccharid stimulierten Monozyten konnte zwar durch den Extrakt gehemmt werden, nicht aber durch Harpagosid [Fiebich et al., 2001]. Eine detailliertere Darstellung der Wirkung des Harpagosids findet sich in den Kapiteln 1.1.6.2.2 (S.18) und 1.1.6.2.3 (S.20).

Im Elastase-Assay wurde Harpagosid in den Konzentrationen 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g und 400 μ g / Inkubationsansatz getestet.

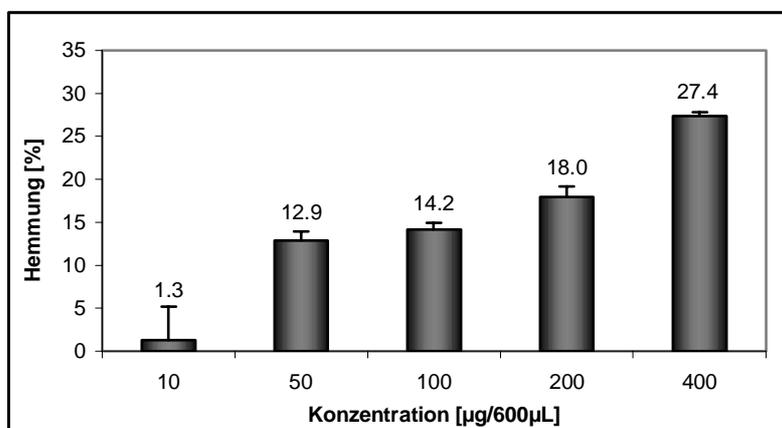


Abb. 4.3.3.1-1 Prozentuale Hemmung der Elastase durch Harpagosid

Eine Steigerung der Konzentration bewirkt zwar eine stärkere Hemmung der Elastase-Aktivität, jedoch kann mit 400 µg/ 600 µL (1.35 mmol/L) nur maximal eine prozentuale Hemmung von 27 % erreicht werden. Harpagosid ist zu 2.35 % in dem hier untersuchten Extrakt enthalten. Vergleicht man die Hemmungen entsprechender Konzentrationen von Harpagosid (10 µg) und Extrakt (200 µg) miteinander, kann man erkennen, dass Harpagosid an der inhibierenden Wirkung des Extraktes nicht beteiligt ist. Die Hemmung bei einer Konzentration von 10 µg/600 µL beträgt 1.3 %, während der Extrakt bei der Konzentration von 200 µg/600 µL die Aktivität des Enzyms um 51 % hemmt.

Auch dieses Testsystem zeigt, dass die inhibierende Wirkung des Extraktes hinsichtlich der Elastase-Aktivität nicht auf den iridoiden Hauptinhaltsstoff zurückzuführen ist.

4.3.3.2 8-PCHG

8-PCHG kommt nur zu einem geringen Anteil (0.40 %, Abb. 2.2.2-1, S.45) im Extrakt von *Harpagophytum procumbens* vor. Im Extrakt (Hz-H90, Tab. 2.2.2-1, S.42) von *Harpagophytum zeyheri* stellt 8-PCHG mit 4.86 % die iridoide Hauptverbindung dar (Abb. 2.2.2-2, S.45). 8-PCHG konnte zwar bereits 1983 aus einem methanolischen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* [Kikuchi et al., 1983] isoliert werden, Daten zur pharmakologischen oder biochemischen Aktivität von 8-PCHG liegen in der Literatur bislang jedoch noch nicht vor. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Verbindungen aus *H. procumbens* beschränkten sich bis jetzt auf Harpagosid, Harpagid und Harpagogenin.

8-PCHG wurde in 5 Konzentrationen (5.1 µg, 10.2 µg, 51 µg, 153 µg, 306 µg/600 µL) auf die Hemmung der Elastase-Aktivität untersucht.

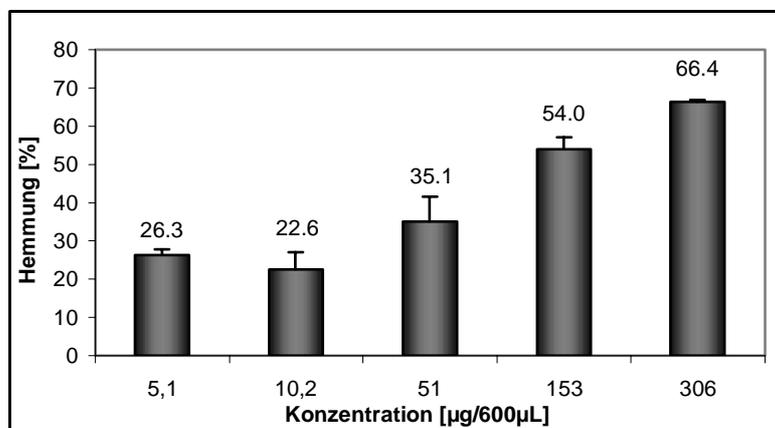


Abb. 4.3.3.2-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch 8-PCHG

8-PCHG zeigt eine ausgeprägtere inhibierende Wirkung gegenüber der Elastase als Harpagosid. Mit 306 µg /600 µL kann die Aktivität des Enzyms um 66 % gehemmt werden. Der ermittelte IC₅₀-Wert von 8-PCHG bei 179 µg/mL (0.35 mmol/L) ist stärker ausgeprägt als der der Kaffeesäure (0.475 mmol/L). Die zusätzliche Hydroxylgruppe im Phenolcarbonsäurerest des Iridoidglykosides scheint demnach wichtig für die inhibierende Wirkung zu sein. Im Vergleich dazu konnten Melzig et al. (2001) z.B. zeigen, dass reine p-Cumarsäure, ein Monohydroxy-Derivat, inaktiv ist, während Kaffeesäure, ein Dihydroxy-Derivat, eine Aktivität aufweist. Eine geringere Hemmwirkung infolge des Fehlens einer Hydroxylgruppe konnte Kruse (2000) ebenfalls im Rahmen seiner Arbeit zeigen. Fukiinsäureester (vicinale Hydroxylgruppen) hemmten die Elastase in stärkerem Maße als Piscidinsäureester (para hydroxyliert). Weiterhin scheint eine bestimmte Molekülgröße die Hemmwirkung auf die Elastase-Aktivität günstig zu beeinflussen. Während freie p-Cumarsäure inaktiv ist, weist 8-PCHG als p-Cumarsäure-Derivat eine Elastase-inhibierende Aktivität auf. Bereits Löser et al. (2000) konnte zeigen, dass veresterte Kaffeesäurederivate wie z.B. die Fukinolsäure eine weitaus stärkere inhibitorische Aktivität aufweisen als freie Kaffeesäurederivate.

Für Flavonoide konnte Melzig weiterhin zeigen, dass Flavonoid-Glykoside die Aktivität der Elastase in stärkerem Maße hemmen als Aglykone. Die Bedeutung der Zuckerreste der Iridoide für die inhibierende Wirkung kann ohne die Synthese definierter Verbindungen nicht überprüft werden. Der glykosidisch gebundene Zucker ist für die Stabilität der Iridoide verantwortlich. Durch Abspaltung der Glucose würde sich der Lactonring öffnen. Ein reaktiver Dialdehyd würde entstehen, welcher anschließend zu einem undefinierbaren Polymerisat weiterreagieren würde.

Nach der in Kapitel 2.2.2 (S.41) beschriebenen HPLC-Quantifizierung ist 8-PCHG mit einer Konzentration von 0.4 % im Harpagophyti radix Extrakt enthalten. In 1000 µg Extrakt, der bei dieser Dosierung die Elastaseaktivität um 53.5 % hemmt, sind 4 µg 8-PCHG enthalten. 5 µg 8-PCHG inhibieren die Enzymaktivität um 26 %. Das zeigt, dass 8-PCHG an der inhibitorischen Potenz des Extraktes beteiligt ist. An der inhibierenden Eigenschaft des Extraktes von *H. zeyheri* ist 8-PCHG auf Grund der höheren Konzentration stärker beteiligt (54 % Inhibierung bei 1000 µg/600 µL Extrakt; 35 % Aktivitätsverminderung bei 51 µg /600 µL – entsprechend 4.86 % 8-PCHG im Extrakt).

4.3.3.3 Pagosid

Pagosid konnte hier zum ersten Mal isoliert werden (Kap. 3.1.5, S.82). Daten zur Wirkung dieser Substanz liegen aus dem Grund nicht vor. Das strukturverwandte Harpagogenin zeigte nach i.p. Verabreichung sowohl im Granulombbeuteltest als auch im Formaldehydarthritis-Test eine antiinflammatorische Wirkung [Eichler et al., 1970].

Pagosid wurde ebenfalls in 5 verschiedenen Konzentrationen getestet: 4.9 µg, 9.8 µg, 49 µg, 147 µg und 294 µg / Inkubationsansatz.

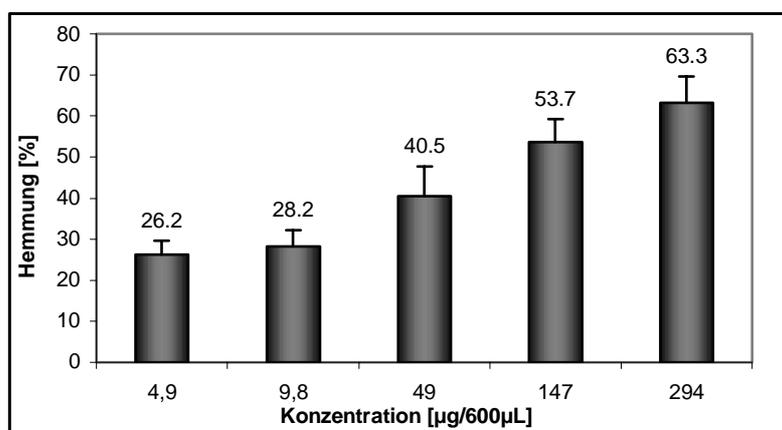


Abb. 4.3.3.3-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch Pagosid

Mit einem IC_{50} -Wert von 154 µg/mL (0.260 mmol/L) inhibiert Pagosid die Elastase minimal besser als 8-PCHG. Mit einer Konzentration von 4.9 µg/600 µL, was ca. der Konzentration von Pagosid in 1000 µg/ 600 µL Extrakt entspricht, hemmt es die Enzymaktivität um 26%. Ebenso wie das 8-PCHG trägt es damit zur Aktivität des Extraktes bei.

Bei der Betrachtung der Struktur des Pagosids fällt auf, dass die Verbindung, wie das 8-PCHG, p-Cumarsäure als aromatischen Rest enthält und im Gegensatz zum Zimtsäure-Derivat Harpagosid die Elastase-Aktivität inhibiert. Weiterhin zeigt sich hier wie bei 8-PCHG (Kap. 4.3.3.2, S.135), dass eine Verknüpfung der p-Cumarsäure mit einer weiteren Struktur eine Aktivitätssteigerung hervorruft.

Die hemmende Wirkung von Pagosid mit einem IC_{50} -Wert von 0.260 mmol/L ist etwa doppelt so hoch wie die der Kaffeesäure mit einem IC_{50} -Wert von 0.475 mmol/L. Da Kaffeesäure jedoch einen schwachen Inhibitor der Elastase darstellt [Melzig et al., 2001], ist die hemmende Aktivität des Pagosids entsprechend zu beurteilen.

4.3.3.4 Acteosid

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 (S.94) beschrieben, ist Acteosid im Pflanzenreich sehr verbreitet und konnte aus mehr als sechzig Pflanzen der verschiedensten Familien isoliert werden [Cometa et al., 1993]. Infolge des häufigen Vorkommens war auch das pharmakologische Interesse an dieser Verbindung sehr groß. Die Aktivität dieser Verbindung wurde in den unterschiedlichsten Testsystemen untersucht. Jiménez et al. (1994) stellten die biologischen Aktivitäten der Phenylethanoide dar und gaben für Acteosid an, dass diese Verbindung die Protein-Kinase-C, die Aldose-Reduktase und die HETE-Bildung hemmt. Weiterhin weist Acteosid antibakterielle, cytotoxische, immunsuppressive, antioxidative, antihypertensive und analgetische Wirkungen auf [Jiménez et al., 1994]. Für die Wirkung der Teufelskralle, die Acteosid in einer Konzentration von 0.68 % (Abb. 2.2.2.1, S.45) enthält, scheint die analgetische Aktivität und die Beeinflussung der HETE-Bildung von Interesse zu sein. Die antiinflammatorische Wirkung von Acteosid konnte 1995 von Murai et al. bestätigt werden. Sie konnten für Acteosid sowohl einen inhibitorischen Effekt im Arachidonsäure induzierten Mausohrödem als auch eine Hemmung der 5-Lipoxygenase- und cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität feststellen. Ein Teil der in den tierexperimentellen Studien ermittelten antiphlogistischen Aktivität wird vermutlich auf das Acteosid zurückzuführen sein.

Acteosid wurde in den Konzentrationen 5 µg, 10 µg, 50 µg, 150 µg und 300 µg pro Inkubationsansatz getestet.

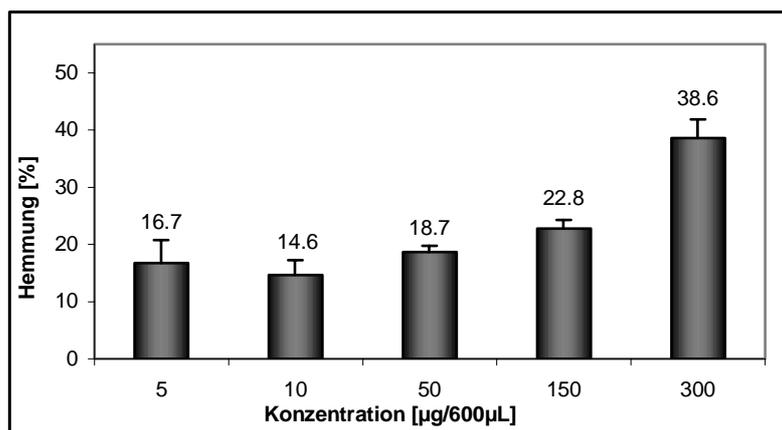


Abb. 4.3.3.4-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch Acteosid

Entgegen der Erwartung zeigt Acteosid in diesem Elastase-Testsystem kaum hemmende Aktivität. Mit einer Konzentration von 300 µg/ Inkubationsansatz (0.800 mmol/L) kann gerade eine Hemmung von 39 % erreicht werden.

Für einige Kaffeesäurederivate konnte eine Elastase inhibierende Wirkung nachgewiesen werden [Melzig et al., 2001]. Dabei zeigten veresterte Derivate eine höhere inhibitorische Potenz als freie Derivate. Insbesondere Fukinolsäure weist mit einem IC_{50} -Wert von 0.23 $\mu\text{mol/L}$ eine große Aktivität auf [Löser et al., 2000]. Melzig et al. (2001) stellten im Rahmen ihrer Untersuchungen dabei die Hypothese auf, dass eine Veresterung mit lipophilen Partnern die inhibitorische Aktivität von Kaffeesäurederivaten erhöht. Eine Verbindung mit Glucose und Rhamnose, wie bei Acteosid, würde die verminderte inhibierende Wirkung dieses Kaffeesäurederivates erklären.

4.3.3.5 Isoacteosid

Isoacteosid, das 6'-O-Stellungsisomer des Acteosids, scheint weder so weit verbreitet zu sein wie das Acteosid, noch ist es so gut pharmakologisch untersucht. Jiménez et al. (1994) geben eine cytotoxische, antioxidative, immunsuppressive und 5-Lipoxygenase hemmende Wirkung an. Murai et al. (1995) konnten weder in tierexperimentellen Untersuchungen noch in *in vitro*-Testungen (LOX, cAMP Phosphodiesterase) eine antiinflammatorische Wirkung für Isoacteosid feststellen. In dieser Wirkqualität scheint es dem Acteosid unterlegen zu sein.

Isoacteosid wurde in den Konzentrationen 5.05 μg , 10.1 μg , 50.5 μg , 151.5 μg und 303 μg /Inkubationsansatz auf die Hemmung der Elastase-Aktivität untersucht.

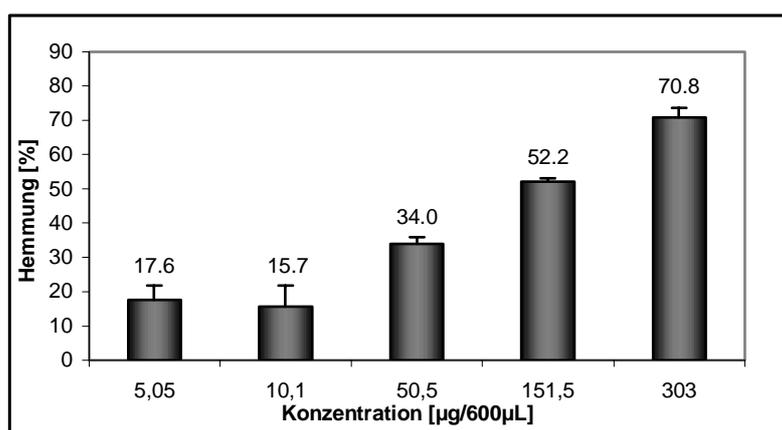


Abb. 4.3.3.5-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch Isoacteosid

Wider Erwarten zeigt Isoacteosid im Gegensatz zu seinem Stellungsisomer Acteosid eine deutliche inhibitorische Wirkung auf die Elastase-Aktivität. Mit einer Konzentration von 179 $\mu\text{g/ml}$ (0.286 mmol/L) hemmt es das Enzym um 50 % (IC_{50} -Wert).

Isoacteosid scheint die strukturellen Voraussetzungen für eine inhibitorische Wirkung auf die Elastase-Aktivität zu besitzen. Die Veresterung der Kaffeesäure über das C-6' der Glucose anstelle über das C-4' (Acteosid) verändert sowohl die räumliche Struktur als auch die Polarität des Moleküls. Infolge der freien Hydroxylgruppe am C-6', die durch die räumliche Stellung leichter hydratisierbar ist als die freie C-4'-OH-Gruppe, weist Acteosid eine leicht höhere Polarität auf als Isoacteosid. Der Polaritätsunterschied wird auch im Dünnschicht- (Abb. 2.1.2-1, S.33) und HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.1.3-1, S.36) deutlich und ist vermutlich für die unterschiedliche Hemmung der Elastase-Aktivität verantwortlich.

Bei einer Konzentration von 20 µg/600 µL hemmt Isoacteosid (2.0 % im Extrakt enthalten) die Enzymaktivität um ungefähr 26 % (ermittelt über die Regressionsgerade im halblogarithmischen Maßstab). Das entspricht der Hemmung des Extraktes von 53% bei 1000 µg/600 µL. Auch Isoacteosid trägt somit zu der Gesamtwirkung des Extraktes bei.

4.3.3.6 6'-O-Acetylacteosid

6'-O-Acetylacteosid konnte wie Pagosid zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden (Kap. 3.2.3, S.105). Das 2'-O-Derivat des Acteosids weist neben einer Hemmung der Lipidperoxidation [Xiong et al., 1998], der Aldose-Reduktase [Jiménez et al., 1994], eine inhibitorische Wirkung auf die 5-Lipoxygenase auf [Jiménez et al., 1994]. Zur Ermittlung der Elastase-hemmenden Aktivität des 6'-O-Derivates des Acteosids wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 4.85 µg, 9.7 µg, 48.5 µg, 145.5 µg und 291 µg/ Inkubationsansatz.

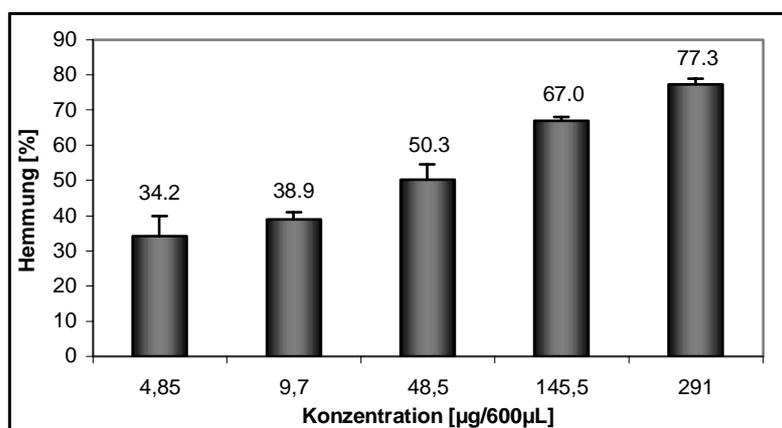


Abb. 4.3.3.6-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch 6'-O-Acetylacteosid

Von den hier getesteten Verbindungen aus *Harpagophytum procumbens* zeigt 6'-O-Acetylacteosid mit einem IC₅₀-Wert von 47 µg/ mL (0.07 mmol/L) die ausgeprägteste Hemmung auf die Elastase-Aktivität. Der IC₅₀-Wert ist dabei weitaus geringer als der IC₅₀-Wert der Kaffeesäure (0.475 mmol/L).

Melzig et al. (2001) stellten bei der Untersuchung verschiedener Kaffeesäurederivate fest, dass eine Veresterung der Kaffeesäurederivate mit einem lipophilen Partner die inhibitorische Wirkung dieser Verbindungen erhöht. Die Erhöhung des inhibitorischen Effektes des acetylierten Derivates gegenüber den nicht acetylierten Substanzen, Acteosid und Isoacteosid, könnte durch eine Erhöhung der Lipophilie durch den Acetylrest zu Stande kommen. Bei einer Konzentration von 9 µg/600 µL, welches der Konzentration entspricht, die in 1000 µg/600 µL Extrakt enthalten ist, wird die Elastase um 39 % gehemmt. Damit fällt dem 6'-O-Acetylacteosid die größte inhibitorische Wirkung im Extrakt zu.

Auffällig ist noch, dass der Extrakt von *Harpagophytum zeyheri*, der Acteosid, Isoacteosid, 8-PCHG und Pagosid in höheren Konzentrationen und Acetylacteosid nicht enthält (Abb. 2.2.2-1 und -2, S.45), einen geringeren IC₅₀-Wert aufweist (1012 µg/mL) als der Extrakt von *H. procumbens* (542µg/mL). Das könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass 6'-O-Acetylacteosid wichtig für die Aktivität des Extraktes von *Harpagophyti radix* ist.

4.3.3.7 Kaffeesäure

Da Kaffeesäure als Vergleichssubstanz für dieses Enzymsystem verwendet worden ist, wurde die Bestimmung bereits in Kapitel 4.2.3 (S.128) beschrieben. Für diese Substanz konnte ein IC₅₀-Wert von 86 µg/mL (0.475 mmol/L) ermittelt werden. Zusammen mit 6'-O-Acetylacteosid zeigte Kaffeesäure von den hier getesteten Substanzen den niedrigsten IC₅₀-Wert. Jedoch ist die Konzentration im Extrakt von *Harpagophytum procumbens* so niedrig (0.005 %, vergl. Kap. 2.2.2, S.41), dass sie für den inhibitorischen Effekt des Extraktes nicht mitverantwortlich gemacht werden kann.

Melzig et al. (2001) beschreiben, dass nach oraler Applikation von Kaffeesäurederivaten im Plasma nur noch Kaffeesäure detektiert werden konnte. So könnten Kaffeesäurederivate, wie die Phenylethanoide, als Prodrugs fungieren und nach Resorption Kaffeesäure als aktiven Wirkstoff freisetzen.

4.3.3.8 Zimtsäure

In dem in Kap. 4.3.1.1 (S.129) untersuchten Extrakt kommt Zimtsäure nur zu einem geringen Anteil (0.09 %, Abb. 2.2.2-1, S.45) vor. Auch in dem *H. zeyheri* Extrakt ist Zimtsäure nur in einer Konzentration von 0.03 % vertreten.

Da Zimtsäure in dem TRIS-HCl-Puffer nur sehr schwer löslich war, wurde sie erst in DMSO gelöst und anschließend mit TRIS-HCl-Puffer verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO betrug sowohl in den Testlösungen als auch in den Leer- und 100%-Werten 1 %. Zimtsäure wurde in den Konzentrationen 5 µg, 10 µg, 50 µg, 150 µg und 300 µg/ Inkubationsansatz getestet.

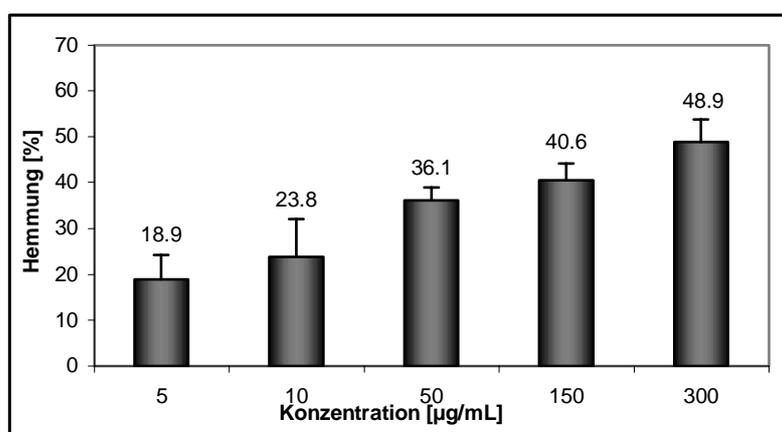


Abb. 4.3.3.8-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch Zimtsäure

Der inhibitorische Effekt der Zimtsäure ist weitaus schwächer ausgeprägt als der der Kaffeesäure. Der IC_{50} -Wert der Zimtsäure liegt über 300 µg/600 µL (3.37 mmol/L) im Gegensatz zu dem der Kaffeesäure von 86 µg/600 µL. Wie bereits in Kapitel 4.3.3.2 (S.135) erläutert, scheinen die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 (Abb. 3.3.2-1, S.115) wichtig für die inhibierende Wirkung der Verbindung zu sein. Im Gegensatz zu 8-PCHG führt hier jedoch eine Veresterung der Zimtsäure mit einem Iridoid, vergl. Harpagosid (Kap. 4.3.3.1, S.133), zu keiner Aktivitätssteigerung.

4.3.3.9 Stachyose

Stachyose ist die einzige Verbindung, die aus der Fraktion A (Wässrige Fraktion) getestet worden ist. Stachyose wurde allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Das Vorliegen dieses Tetrasaccharides war auf Grund von Stierstorfers Arbeit (1961) bekannt und konnte dünnschichtchromatographisch ebenfalls hier verifiziert werden (Kap. 2.1.2-2, S.34).

Stachyose nimmt den größten Teil der wässrigen Fraktion ein. Die Testung dieser Substanz im Elastase-Assay sollte zeigen, ob die sehr schwache Hemmung der Fraktion A auf die Stachyose zurückzuführen ist, oder ob noch andere Substanzen beteiligt sind.

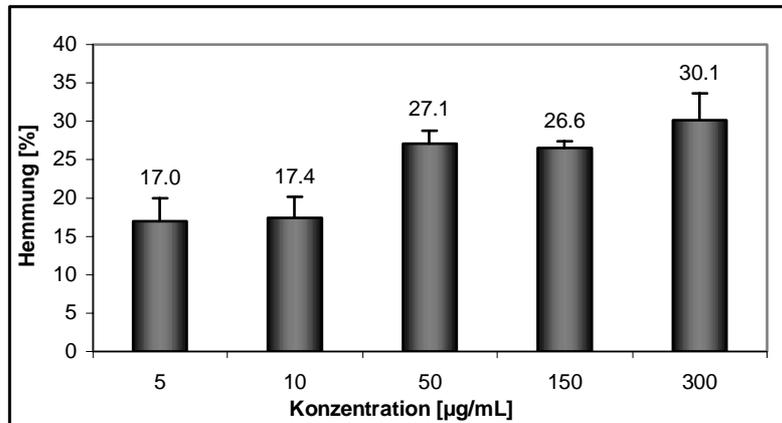


Abb. 4.3.3.9-1 Prozentuale Hemmung der Elastase-Aktivität durch Stachyose

An Hand des Diagramms in Abbildung 4.3.3.9-1 kann man erkennen, dass die Stachyose die Aktivität der Elastase kaum beeinflusst. Die Minderung der Elastase-Aktivität tritt nicht wie bei der Fraktion A konzentrationsabhängig auf. Eine Erhöhung der Konzentration um das 60fache steigert die Hemmung von 17 % auf nur 30 %. Demnach lässt sich vermuten, dass an dem schwachen inhibitorischen Effekt der Fraktion A andere Verbindungen beteiligt sind.

4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Wie bereits in Kapitel 3.4 (S.118) erwähnt, wird der Extrakt von *H. procumbens* als Antirheumatikum eingesetzt. In einigen tierexperimentellen und klinischen Studien konnte auch die antiinflammatorische Wirkung des Extraktes nachgewiesen werden. Welche Inhaltsstoffe des Extraktes für die antiinflammatorische Wirkung verantwortlich sind, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Hauptsächlich wurde die Aktivität des Harpagosids untersucht. In unterschiedlichen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Wirkung nur zum Teil oder überhaupt nicht auf das Harpagosid zurückzuführen ist. Eine rheumatische Erkrankung stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Das bedeutet, dass sowohl ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren für die Ausbildung dieser Krankheit verantwortlich ist, als auch dass ein Antirheumatikum mehrere Wirkprinzipien besitzen muss, um effektiv die Symptome einer rheumatoiden Erkrankung vermindern zu können. Die Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade und der TNF α -Freisetzung wurden bereits für *Harpagophytum procumbens* untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiterer Aspekt der antirheumatischen Wirkung an Hand der Verminderung der Elastase-Aktivität durch den Extrakt und seiner Hauptinhaltsstoffe untersucht. Die Elastase, eine Serinprotease, ist neben weiteren leukozytären Enzymen im pathologischen Zustand für die Knorpelzerstörung verantwortlich.

Für den wässrigen Extrakt von *Harpagophytum procumbens* konnte ein IC₅₀-Wert von 542 $\mu\text{g/mL}$ ermittelt werden. Um eine 50 % Hemmung des Enzyms durch den Extrakt von *H. zeyheri* zu erreichen, musste nahezu die doppelte Menge (1012 $\mu\text{g/mL}$) eingesetzt werden. Bezüglich der Elastase-Hemmung weist demnach der *H. zeyheri* Extrakt eine schlechtere Aktivität auf als der *H. procumbens*-Extrakt. Aus dieser alleinigen Sicht, kann die Forderung, *H. zeyheri* ebenfalls als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Droge zu verwenden, nicht unterstützt werden.

Nach Testung der Fraktionen des ersten Aufarbeitungsschrittes zeigte sich, dass die Hauptaktivität in der Ethylacetat-Fraktion und nicht in der wässrigen Phase lag.

Als Vergleichswert für die Elastase-hemmende-Aktivität wurde der IC₅₀-Wert der Kaffeesäure (86 $\mu\text{g/mL}$; 0.475 mmol) verwendet. Kaffeesäure zählt zu den Substanzen, die eine schwache Wirkung aufweisen.

Untersuchungslösung	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (mmol/L)
<i>H. procumbens</i>	542	---
<i>H. zeyheri</i>	1012	---
Kaffeensäure	86	0.475
Harpagosid	> 600	> 1.35
8-PCHG	179	0.350
Pagosid	154	0.260
Acteosid	> 500	> 0.800
Isoacteosid	179	0.286
6'-O-Acetylacteosid	47	0.070
Zimtsäure	> 500	> 3.37

Tab. 4.4-1 IC₅₀-Werte der Extrakte und der isolierten Verbindungen (in µg/mL und mmol/L)

Von den Reinsubstanzen, die aus der Ethylacetat Fraktion isoliert worden sind, zeigte 6'-O-Acetylacteosid die ausgeprägteste inhibierende Wirkung mit einem IC₅₀-Wert von 47 µg/mL (0.07 mmol/L). Die IC₅₀-Werte von Isoacteosid, 8-PCHG und Pagosid waren geringer als der der Kaffeensäure. Für Harpagosid, Acteosid, Zimtsäure und Stachyose lag der IC₅₀-Wert höher als 500 µg/mL (Tab. 4.4-1).

Der Anteil der einzelnen Verbindungen an der Aktivität des Extraktes von *H. procumbens* wurde an Hand Extrakt bezogener Konzentrationen ermittelt. Die Konzentrationen der Verbindungen wurden der HPLC-Quantifizierung entnommen. Keine Substanz alleine erreichte die Aktivität des Extraktes. Synergistische Effekte der Verbindungen scheinen für den inhibitorischen Effekt des Gesamtextraktes verantwortlich zu sein.

Da von den einzelnen Stoffgruppen nur wenige Verbindungen auf die Elastase inhibierende Wirkung untersucht worden sind, können nur Vermutungen bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen angestellt werden. Bei den Phenylethanoiden scheint eine Erhöhung der Lipophilie durch Acetylierung eine Steigerung der Hemmung hervorzurufen. Weiterhin scheint es wichtig zu sein, dass die Position C-6' des Glucoseresestes besetzt ist, da Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid im Gegensatz zu Acteosid die Elastase-Aktivität hemmen.

Iridoide Verbindungen, deren Phenolcarbonsäurerest hydroxyliert ist (8-PCHG und Pagosid), zeigen eine größere inhibierende Aktivität als das Harpagosid, dessen aromatischer Rest nicht hydroxyliert ist. Der Unterschied in Polarität und Molekülgröße, der durch die zusätzliche Hydroxylgruppe zu Stande kommt, könnte dieses Verhalten erklären. Weiterhin beeinflussen

8-PCHG und Pagosid die Aktivität der Elastase stärker als freie p-Cumarsäure (Melzig et al., 2001). Demnach erhöht eine Verknüpfung der p-Cumarsäure mit einem weiteren Molekül die inhibierende Aktivität. Eine Steigerung der Molekülgröße wirkte sich ebenfalls im Rahmen der Untersuchungen von Löser et al. (2000) positiv auf die inhibierende Wirkung aus. Dort hatte z.B. Fukinolsäure eine ausgeprägtere Hemmung der Elastase-Aktivität als freie Kaffeesäure. Diese Überlegung kann jedoch nicht auf Zimtsäure und Harpagosid übertragen werden. Zimtsäure beeinflusst die Aktivität der Elastase kaum. Eine stärkere Inhibierung wird auch nicht durch eine Veresterung der Zimtsäure mit Harpagid zu Harpagosid hervorgerufen. Wie bereits oben erwähnt, scheint durch den Verlust der Hydroxylgruppe die inhibierende Aktivität der Verbindungen verloren zu gehen.

Zur Bestätigung dieser Überlegungen müssten jedoch weitere Verbindungen der Stoffgruppen auf die Elastase hemmende Wirkung untersucht werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl der hier untersuchte Extrakt als auch die daraus isolierten Verbindungen eine Hemmung der Elastase-Aktivität aufweisen. Bis auf Harpagosid, Acteosid und Zimtsäure lagen die IC_{50} -Werte (mmol/L) der isolierten Verbindungen unter dem IC_{50} -Wert der Kaffeesäure, einer bekanntermaßen nur mäßig aktiven Substanz. Da jedoch der Abstand bezüglich der inhibierenden Aktivität zu der Kaffeesäure nicht allzu groß ist, können die hier isolierten Verbindungen nur zu den schwächeren Hemmstoffen der Elastase gezählt werden. Eine Ausnahme bildet hier das 6'-O-Acetylaceosid, das die Elastase nahezu sieben Mal stärker hemmt als die Kaffeesäure.

Auffällig ist weiterhin, dass Harpagosid wie schon in einigen anderen Testsystemen keine Wirkung zeigt und an der Gesamtwirkung des Extraktes nicht beteiligt ist.

Es ist jedoch fraglich, ob die Konzentration der Inhaltsstoffe des Extraktes, die nach Resorption in der Synovialflüssigkeit vorliegt, ausreicht, um die Aktivität der Elastase zu vermindern. Auf Grund der obigen Untersuchungen scheint die Hemmung der Elastase nur eine untergeordnete Rolle bei der antirheumatischen Wirksamkeit der Teufelskralle zu spielen.

5 Absorptionsstudien am Caco-2-Zellkulturmodell

Für einen Arzneistoff ist es nicht nur wichtig, dass er am Wirkort einen pharmakologischen Effekt ausübt, sondern dass er auch zu diesem Wirkort gelangt und dort in ausreichender Konzentration zur Verfügung steht. Ein wesentlicher Schritt stellt dabei die Resorption dar, die Aufnahme einer Verbindung aus dem Darmlumen über die Magen-Darm-Schleimhaut in den Blut- oder Lymphkreislauf. Aus dem Grund ist es nicht nur wichtig, mittels *in vitro*- oder *in vivo*-Systemen zu zeigen, dass Substanzen oder Substanzgemische eine pharmakologische Aktivität aufweisen; es sollte auch sichergestellt sein, dass sie nach oraler Verabreichung über die Epithelschicht des Gastrointestinaltraktes in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Die genauesten, aber aufwendigsten Methoden zur Resorptionsermittlung sind Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen. Es stehen mittlerweile jedoch eine Reihe von Testsystemen zur Verfügung, mit deren Hilfe man mit geringerem Aufwand und einer höheren Durchsatzrate eine Vorhersage über die Resorption treffen kann. Eine Möglichkeit besteht darin, isolierte Darmbestandteile, z.B. die einer Ratte, in einem Organbad als Resorptionsbarriere zu nutzen, oder die Absorptionsstudien *in situ* an Ratten durchzuführen [Barthe et al., 1999].

Eine weitere Methode zur Resorptionsermittlung stellen Untersuchungen an Zellkultursystemen dar. Die am häufigsten genutzte Zell-Linie ist dabei die Caco-2-Zelllinie.

5.1 Caco-2-Resorptionsmodell

Die Caco-2-Zelllinie wurde 1977 von Fogh etabliert und seit den achtziger Jahren zur Absorptionsuntersuchung von Arzneistoffen genutzt. Caco-2-Zellen stammen von humanen Kolonkarzinomzellen ab, die jedoch in Kultur morphologisch und funktionell eine hohe Ähnlichkeit mit intestinalen Enterocyten aufweisen [Artursson et al., 1996; Hidalgo et al. 1989; Hilgers et al., 1990]. Auf permeablen Membranen bilden sie eine polarisierte, zusammenhängende Monolayerschicht aus. Die Zellen dieser Monolayerschicht werden über Tight Junctions miteinander verknüpft [Hidalgo et al. 1989]. Auf der apikalen Seite bilden sie eine „brush-border“-Membran mit Microvilli und typischen intestinalen Enzymen aus. Zu diesen Enzymen zählen unter anderem CYP-Isoenzyme, Glutathion-S-Transferasen, Sulfotransferasen und Glucuronidasen. Neben diesen Metabolisierungsenzymen exprimieren sie auch für intestinale Epithelzellen charakteristische Transportsysteme aus wie Transporter von Aminosäuren, Dipeptiden, Vitaminen und Zytostatika. Auch die Gegenwart von

P-Glykoprotein-Aktivität in Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden [zit. in Barthe et al., 1999]. Im Caco-2-Zellsystem sind im Gegensatz zu den Tiermodellen Absorptionsstudien einfacher, reproduzierbar und mit einer höheren Durchsatzrate durchführbar. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass sie humanen Ursprungs sind und artspezifische Unterschiede nicht auftreten können [Artursson, 1990]. Krebszellen lassen sich im Gegensatz zu Primärkulturen von Enterozyten leichter anzüchten, da sie spontan differenzieren und schneller wachsen. Bedacht werden sollte dabei nur, dass Karzinomzellen aus dem Kolon zum Teil andere Eigenschaften aufweisen als die Dünndarm-Epithelzellen *in vivo*. Das äußert sich darin, dass Transporter und Enzyme in unterschiedlicher Menge bzw. andere Transporter und Enzyme exprimiert werden. Weiterhin ist der Durchmesser der Poren der Tight Junctions nicht nur im Kolon, sondern auch in den Caco-2-Zellen geringer, was sich in der Permeabilität paracellulär transportierter Substanzen bemerkbar macht.

Auch wenn dieses Zellsystem keinen vollständigen Ersatz für das Darmepithel darstellen kann, z.B. auf Grund der fehlenden Mucusschicht oder fehlender physiologischer Parameter (Motilität, Bakterienflora) [Barthe et al., 1999], kann ein wesentlicher Schritt der Resorption, der Übertritt über die Epithelschicht, nachgeahmt werden, da diese Zellen die drei wesentlichen Permeabilitätsbarrieren aufweisen: die „ungerührte“ wässrige Grenzschicht, die Kittleisten und die Zellmembranen [Artursson, 1990]. Dass dieses Absorptionssystem eine gute Alternative zu Tiermodellen darstellt, zeigen weiterhin viele Untersuchungen [Yamashita et al., 1997; Yee, 1997].

Artursson (1990) zeigte, dass die Permeabilitätskoeffizienten (P_{eff}) passiv transportierter Verbindungen (verschiedene β -Blocker) des Caco-2-Systems mit denen des isolierten Rattenileums korrelieren. Nur die Koeffizienten sehr hydrophiler Verbindungen sind im Caco-2-System niedriger. Der Permeabilitätskoeffizient gibt die Geschwindigkeit des Substanztransportes über den Monolayer in cm/s wieder (Kap. 5.1.3, S.152). Hilgers et al. (1990) wiesen nach der Untersuchung von Substanzen, die nicht nur passiv im Darm transportiert werden, darauf hin, dass mit Hilfe dieses Systems zwischen aktiven, passiv paracellulären und passiv transcellulären Transportprozessen unterschieden werden kann. Diese Aussage konnte Cogburn (1991) mit seinen Studien unterstützen. Durch den Vergleich von Permeabilitätskoeffizienten, die im Caco-2-System ermittelt worden sind, und der humanen *in vivo* Absorption von Arzneistoffen, stellten sowohl Artursson et al. (1991), als auch Yee (1997) eine Korrelation zwischen diesen Parametern auf, die in der Tabelle 5.1-1 (S.149) wiedergegeben wird. Die Differenz von einer Zehnerpotenz zwischen den Koeffizienten der beiden Studien wird wahrscheinlich durch Unterschiede in der

Zellkultivierung und in den Testbedingungen (Passagezahl, Temperatur, pH-Wert, etc.) herbeigeführt [Yee, 1997].

Artursson et al. (1991)		Yee (1997)	
P_{eff} [cm/s]	Absorption [%]	P_{eff} [cm/s]	Absorption [%]
$< 1 \cdot 10^{-7}$	< 1	$< 1 \cdot 10^{-6}$	0-20
$0.1-1.0 \cdot 10^{-6}$	1-100	$1-10 \cdot 10^{-6}$	20-70
$> 1 \cdot 10^{-6}$	100	$> 10 \cdot 10^{-6}$	70-100

Tab. 5.1-1 Korrelation zwischen der Absorption *in vivo* und dem Permeabilitätskoeffizienten im Caco-2-Zellmodell

Auf Grund dieser Datenlage (Tab. 5.1-1) folgert Yee, dass mittels des Caco-2-Systems, durchgeführt unter kontrollierten Bedingungen, die Absorption *in vivo* vorausgesagt werden kann. Einschränkungen müssen jedoch bei paracellulär transportierten Verbindungen und P-Glykoprotein-Substraten gemacht werden. Der Poren-Radius in den Tight Junctions der Caco-2-Zellen ist kleiner als in den Darmepithelzellen *in vivo*, weshalb Substanzen, die diesen Transportweg nutzen, im Caco-2-System eine geringere Permeabilität aufweisen [Artursson, 1990; Artursson et al., 1991]. Dieser geringe Poren-Radius ist auch für den höheren TEER - Wert (Transepithelialer Elektrischer Widerstand) [Tanaka et al., 1995] (Kap. 5.1.2, S.151; Kap. 9.6.4.1, S.231) der Caco-2-Monolayerschicht gegenüber dem Rattenjejunum und -kolon verantwortlich [Tanaka et al., 1995]. Weiterhin überexprimieren Caco-2-Zellen P-Glykoproteine, da es sich hierbei um Krebszellen handelt (Kap. 1.3.2, S.28). Aus diesem Grund weisen Substanzen, die eine Affinität zu dem P-Glykoprotein besitzen, im Caco-2-Zellsystem einen geringeren Permeabilitätskoeffizienten auf.

5.1.1 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Für eine Testung wurden auf Polycarbonat-Transwellfilter (12 well, 1.1 cm^2 Durchmesser, Kap. 9.6.5.1, S.233) 0.5 mL einer Zell-Suspension (120000 Zellen/mL; Neubauer-Zählkammer)

gegeben. Alle 2 Tage wurde aus

dem unteren (basolateralen) und oberen (apikalen) Kompartiment verbrauchtes gegen frisches

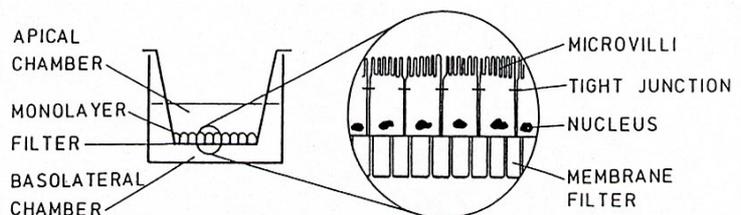


Abb. 5.1.1-1 Schematische Darstellung eines Caco-2-Monolayers auf einem Transwell-Filter [aus Artursson et al., 1996]

Medium ausgetauscht. Am 22. Tag nach der Aussaat wurden die Testungen durchgeführt. Vierundzwanzig Stunden vorher wurde noch einmal das Medium ausgewechselt.

Vor der Testung wurden alle verwendeten Lösungen und der Transportpuffer auf 37 °C vorgewärmt. Das Nährmedium wurde aus dem oberen und unteren Kompartiment des Inserts entfernt. Die Filter wurden mit dem Transportpuffer (HBSS) gespült und anschließend in diesem Transportpuffer für dreißig Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Konfluenz der Zellen mittels des transepithelialen Widerstandes (TEER, Kap. 5.1.2, S.151) bestimmt. Im weiteren Verlauf wurden bei der Testung nur bewachsene Filter verwendet, deren TEER größer als $250 \Omega/\text{cm}^2$ war (Kap. 5.1.2, S.151).

Im apikalen Bereich wurde der Transportpuffer zum Zeitpunkt 0 min der Testung gegen die Testlösung (Substanz im Transportpuffer) ausgetauscht. In festgesetzten Zeitabständen wurden aus dem basolateralen Bereich Proben entnommen und das fehlende Volumen durch frischen Transportpuffer ersetzt. Abweichungen in der Durchführung werden in den entsprechenden Kapiteln erwähnt. Die Proben wurden mittels HPLC (Kap. 9.1.2.3, S.211) quantifiziert.

Die Testungen im Caco-2-Zellsystem wurden nach Artursson (1996) durchgeführt.

Als Filtermaterial wurde Polycarbonat ohne Kollagenbeschichtung verwendet. Im Gegensatz z.B. zu Nitrocellulose zeigt Polycarbonat keine Absorptionseffekte. Für eine Anheftung der Zellen ist bei Polycarbonat auch keine Kollagenbeschichtung notwendig. Hilgers et al. (1990) konnten zeigen, dass die Zellen auf einem Polycarbonatfilter ohne Beschichtung genauso schnell zu einem ausdifferenzierten Monolayer heranwachsen wie mit Beschichtung. Der Porendurchmesser des Filters mit $0.4 \mu\text{m}$ ist so gewählt, dass einerseits Substanzen frei permeabel sind, aber andererseits Zellen nicht hindurchwachsen können [Artursson et al., 1996]. Hindurchgewachsene Zellen verlieren ihre Polarität [Hilgers et al., 1990].

In den 22 Tagen auf den Transwell-Filtern wachsen die Zellen zu einem polarisierten, ausdifferenzierten Monolayer heran. In den ersten Tagen vermehren und vergrößern sich die Zellen. Nach Artursson (1990) sind sie nach 10 Tagen konfluent. Hidalgo et al. (1989) stellten fest, dass sie schon nach 6-7 Tagen eine zusammenhängende Schicht ausbilden, die in den weiteren 17 Tagen in dieser Weise bestehen bleibt. In der Zeit bilden die Zellen Enzym-, Transportsysteme und Microvilli aus. Nach 21 Tagen sind sie ausdifferenziert. Die Enzymaktivitäten von Markern der „brush-border“-Membran (Alkalische Phosphatase, Hydrolasen) werden nach dem 21. Tag nicht mehr erhöht [Hilgers et al., 1990]. Die Microvilli sind zu dem Zeitpunkt voll ausgebildet. Nach 25 Tagen beginnen sich die Zellen jedoch von

dem Filter abzulösen [Wirth et al., 2001]. Yee and Day (1999) empfehlen 21-30 Tage alte Zellschichten zur Untersuchung von aktiven Transportmechanismen und 15-30 Tage alte Zellen zur Untersuchung des transcellulären und paracellulären Transportes. Der Zeitpunkt von 22 Tagen bis zur Testung ist in dieser Arbeit so gewählt, dass sie nicht nur konfluent sind, sondern auch ausdifferenziert vorliegen und sich noch nicht ablösen. Weiterhin passt dieses Zellalter in den von Yee und Day (1999) angegebenen Bereich für die Untersuchung von sowohl passiven als auch aktiven Transportvorgängen.

Das Testsystem ist so beschaffen, dass die „brush-border“-Membran in den oberen, apikalen Raum hineinragt, der auf diese Weise das Darmlumen imitiert. Die gegenüberliegende Membran ist an dem Filter angewachsen und steht mit dem unteren, basolateralen Kompartiment in Berührung, welches die Blutbahn nachahmt.

Als Transportpuffer wurde wie bei Wirth et al. (2001) und Yazdanian et al. (1998) HBSS ohne pH-stabilisierende Zusätze genommen. Der Zusatz war nicht notwendig, da sich der pH-Wert im Laufe der Testung nicht veränderte.

5.1.2 BESTIMMUNG DER INTEGRITÄT

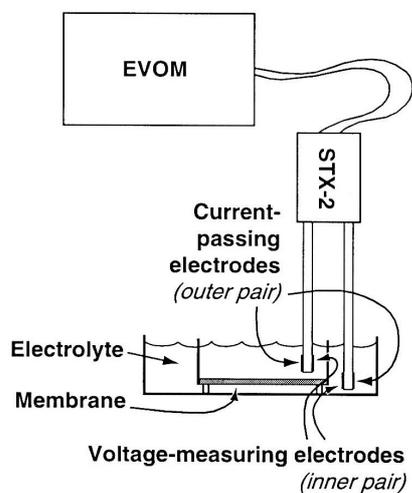


Abb. 5.1.2-1 Bestimmung des TEER im Transwell-Filter mit dem EVOM[®]-Gerät

Um zu überprüfen, ob sich eine zusammenhängende Zellschicht mit Tight Junctions ausgebildet hat, wurde der transepitheliale Widerstand (TEER) und die Permeabilität einer Markersubstanz (FITC-Dextran) bestimmt. Die Testung von FITC-Dextran wird in Kapitel 5.3.1 (S.156) beschrieben.

Die Bestimmung des TEER erfolgt direkt in dem Transwell-Filterkammersystem mit Hilfe eines Voltohmmeters und Silber/Silberchloridelektroden (EVOM[®], Kap. 9.6.4.1, S.231). Gemessen wird der Ionenfluss über die Zellschicht. Mit der Undurchlässigkeit der Zellschicht sinkt der Ionenfluss

und steigt der Widerstand über den Monolayer. Bis zur Konfluenz der Monolayerschicht auf dem Polycarbonatfilter steigt der TEER konstant an. Nach ca. 6-7 Tagen bildet sich ein Plateau aus, das in den nächsten 17 Tagen erhalten bleibt [Hidalgo et al., 1989]. Dieses Plateau gibt an, dass die Tight Junctions sich korrekt ausgebildet haben. Die Angabe des Wertes, den der TEER auf diesem Plateau einnimmt, ist in der Literatur nicht einheitlich. Die

Werte schwanken zwischen 150 und 600 Ω/cm^2 . Das liegt daran, dass der transepitheliale Widerstand von vielen Faktoren abhängig ist: Temperatur, pH-Wert, Zellklon, Zellpassage und Positionierung der Elektroden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Testungen bewachsene Filter verwendet, die einen TEER von 250-430 Ω/cm^2 aufwiesen. Mit Hilfe der Markersubstanz FITC-Dextran konnte gezeigt werden, dass in diesem TEER-Bereich sich die Tight Junctions vollständig ausgebildet haben. (Kap. 5.3.1, S.156).

Der TEER wurde weiterhin auch nach der Testung bestimmt. Eine Erniedrigung des Widerstandes der Zellschicht nach der Inkubation mit den zu testenden Verbindungen, würde auf eine cytotoxische Aktivität hindeuten. Die Permeabilität von Substanzen kann in einem solchen Zellsystem nicht bestimmt werden. Der Koeffizient wäre hier auf Grund der zellzerstörenden Wirkung erhöht.

5.1.3 AUSWERTUNG

Wie bereits in Kapitel 5.1.1 (S.149) erwähnt, wurden die entnommenen Proben mittels HPLC quantifiziert. Die HPLC-Methode wird in Kapitel 9.1.2.1 (S.208) dargestellt.

$P_{eff} = \frac{V_A}{c_0 \cdot A \cdot 60} \cdot \frac{dc}{dt}$	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">P_{eff}</td> <td>Permeabilitätskoeffizient [cm/s]</td> </tr> <tr> <td>V_A</td> <td>Volumen im Akzeptor [mL]</td> </tr> <tr> <td>c_0</td> <td>Anfangskonzentration im Donor [$\mu\text{g}/\text{mL}$]</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Fläche des Filters [cm^2]</td> </tr> <tr> <td>dc/dt</td> <td>Flussrate [$\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{s})$]</td> </tr> </table>	P_{eff}	Permeabilitätskoeffizient [cm/s]	V_A	Volumen im Akzeptor [mL]	c_0	Anfangskonzentration im Donor [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	A	Fläche des Filters [cm^2]	dc/dt	Flussrate [$\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{s})$]
P_{eff}	Permeabilitätskoeffizient [cm/s]										
V_A	Volumen im Akzeptor [mL]										
c_0	Anfangskonzentration im Donor [$\mu\text{g}/\text{mL}$]										
A	Fläche des Filters [cm^2]										
dc/dt	Flussrate [$\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{s})$]										

Abb. 5.1.3-1 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten

Mit der in Abbildung 5.1.3-1 angegebenen Formel wurde aus den ermittelten Konzentrationen der effektive Permeabilitätskoeffizient [cm/s] berechnet [Artursson, 1990].

Der Permeabilitätskoeffizient gibt die Geschwindigkeit wieder, mit der Substanzen die Zellschicht überwinden. Er lässt sich berechnen aus dem Akzeptorvolumen, der Anfangskonzentration im Donor, der Fläche des Filters (hier: 1.1 cm^2) und der Flussrate. Die Flussrate entspricht der Steigung der Geraden aus kumulativer Konzentration gegenüber der Zeit.

Die Restkonzentration, die sich bei der Entnahme der Probe und Ersatz des Volumens durch Puffer-Lösung ergibt (Kap. 5.1.1, S.149), wurde in diese Berechnung miteinbezogen.

Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test herangezogen. Die Angabe der Signifikanz erfolgte in folgender Weise: *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

5.2 Stabilitätsuntersuchungen

Eine Voraussetzung für die Absorptionsstudien ist, dass die zu testenden Verbindungen in dem Transportpuffer (HBSS pH 7.5, Kap. 9.6.1.3, S. 229) über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil sind. Die Stabilitäten von Acteosid, Isoacteosid, 6'-O-Acetylacteosid, Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid und Zimtsäure wurden als Gemisch bei 37 °C über 150 min des Testzeitraums untersucht. Die Konzentrationen der Verbindungen (Abb. 5.2-1) betragen ca. 0.01 mg/mL. Nach 20, 40, 60, 90, 120 und 150 min wurde ein Aliquot aus der Lösung entnommen, mittels HPLC (Kap. 9.1.2.3, S.208) quantifiziert und bei den entsprechenden Wellenlängen detektiert.

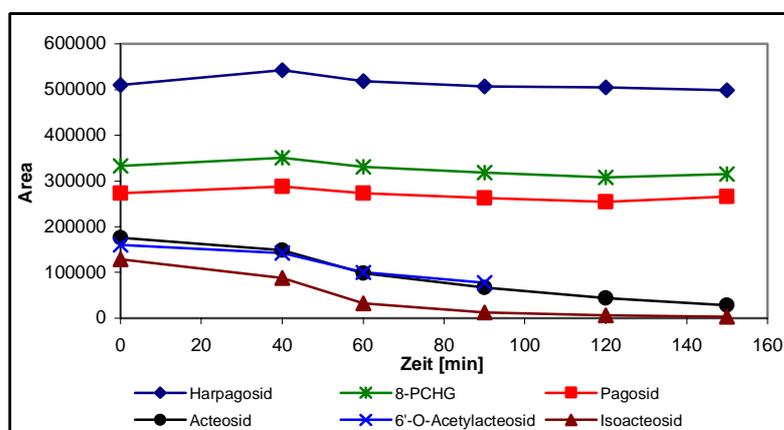


Abb. 5.2-1 Stabilität der Einzelverbindungen im HBSS-Puffer bei 37 °C

Die iridoiden Verbindungen Harpagosid, 8-PCHG und Pagosid bleiben innerhalb dieser 150 min stabil. Die Konzentrationen verändern sich in diesem Zeitraum nur unwesentlich. Die Phenylethanoide (Acteosid, Isoacteosid, 6'-O-Acetylacteosid) zersetzen sich allerdings innerhalb dieser Zeit zu unbekanntem Produkten. Bereits nach 40 min sinkt die Konzentration der Phenylethanoide. Nach 150 min ist nur noch 2.2 % des Isoacteosids und 15.9 % des Acteosids vorhanden. Das Signal des 6'-O-Acetylacteosids konnte nach 90 min nicht mehr detektiert werden, da es von den Signalen der Abbauprodukte überlagert wurde.

Um den Einfluss anderer Verbindungen des Extraktes (Sertürner, Kap. 8.1.1, S.204) auf die Stabilität der Phenylethanoide und Iridoide zu prüfen, wurde ebenfalls die Stabilität im Extrakt untersucht. Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 1mg/mL in HBSS Puffer gelöst und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Diese Stabilitätsprüfung wurde über 1700 min durchgeführt. Da der gesamte Untersuchungszeitraum nicht nur den Testzeitraum (150 min) beinhaltet, sondern auch die Lagerungszeit bis zur HPLC-Quantifizierung, wurden auch Untersuchungen bei 4°C und -20°C durchgeführt. Auch diese Untersuchungen gingen über einen Zeitraum von 1700 min.

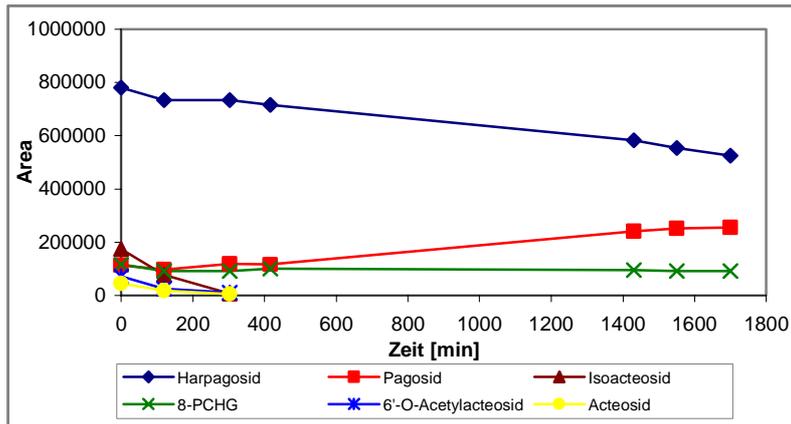


Abb. 5.2-2 Stabilität der Verbindungen im Extrakt bei 37°C, HBSS-Puffer

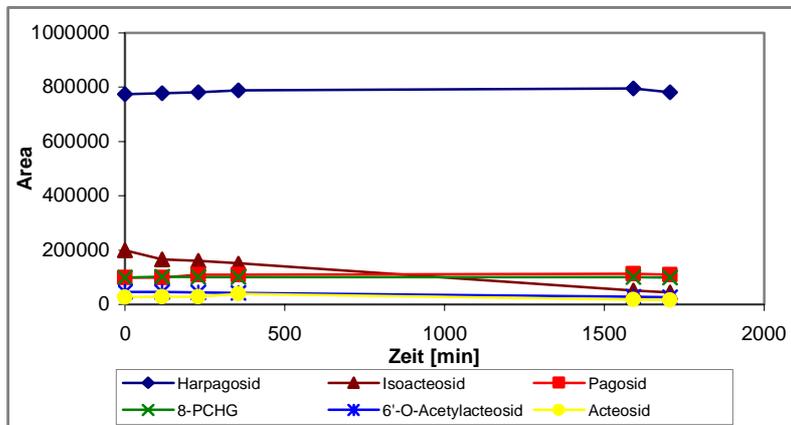


Abb. 5.2-3 Stabilität der Verbindungen im Extrakt bei 4°C, HBSS-Puffer

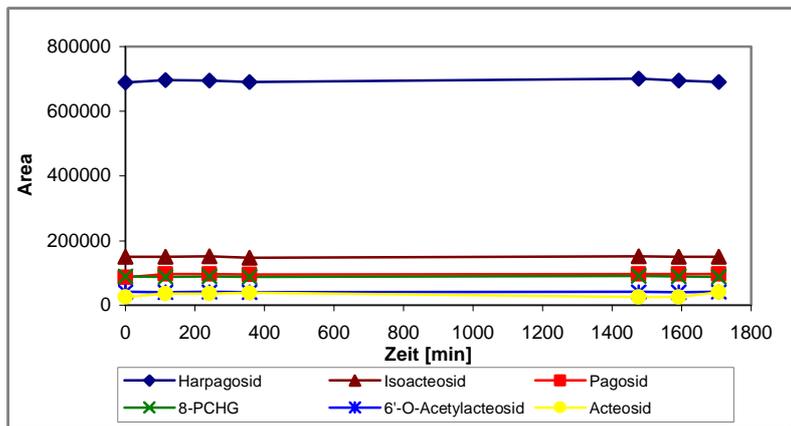


Abb. 5.2-4 Stabilität der Verbindungen im Extrakt bei -20°C, HBSS-Puffer

Innerhalb von 300 min verändern sich die Konzentrationen der Iridoide (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) im Extrakt nicht wesentlich. Sowohl als isolierte Verbindung als auch im Extrakt bleiben Harpagosid, Pagosid und 8-PCHG in dem Testzeitraum von 150 min stabil.

Nach 1600 min sinken im Extrakt jedoch die Konzentrationen an Harpagosid um 33 %, 8-PCHG um 22 % und die Konzentration an Pagosid steigt um mehr als 100 % an. Harpagosid und 8-PCHG werden demnach im Extrakt nach längerer Zeit in diesem Umfeld (37 °C, HBSS-Puffer) abgebaut. Bei Pagosid könnte man vermuten, dass es auf Grund der ansteigenden Konzentration ein Abbauprodukt darstellt. Auf Grund der Struktur ist das ebenfalls möglich (Kap. 3.1.5, S.82). Aus welcher Verbindung Pagosid entstehen könnte, lässt sich an Hand dieser Untersuchung jedoch nicht feststellen. Zu bezweifeln ist, dass Pagosid weder aus Harpagosid, da beide mit unterschiedlichen aromatischen Resten substituiert sind, noch aus 8-PCHG auf Grund verschiedener struktureller Beschaffenheit entsteht. Obwohl die quantitative Veränderung insbesondere von Harpagosid und Pagosid unter genannten Bedingungen auffällig und interessant ist, wurde sie zu dem Zeitpunkt nicht weiter verfolgt. Die Stabilitätsuntersuchung diente lediglich dem Zweck, zu überprüfen, ob die Substanzen im Testzeitraum stabil sind. Zu bemerken ist weiterhin, dass die Struktur des Pagosids zu dem Zeitpunkt der hier durchgeführten Stabilitätsuntersuchung nicht bekannt war. Die Aufklärung von Metabolisierungsreaktionen war demnach auch nicht möglich.

Diese Untersuchungen zeigen jedoch, dass sowohl im Extrakt als auch als isolierte Verbindung Harpagosid, 8-PCHG und Pagosid in dem Testzeitraum von 150 min stabil sind. Somit kann die Permeabilität dieser Substanzen im Caco-2-Zellsystem untersucht werden.

Bei 4°C und ebenso bei -20°C veränderten sich die Konzentrationen der Iridoide im HBSS-Puffer innerhalb von 1700 min im Gegensatz zu dem obigen Experiment bei 37°C nur unwesentlich. Dadurch besteht die Möglichkeit, basolateral entnommene Proben bis zur HPLC-Untersuchung bei 4°C bzw. -20°C aufzubewahren.

Die Phenylethanoide (Acteosid, Isoacteosid, 6'-O-Acetylacteosid) unterliegen nicht nur als isolierte Verbindungen sondern auch im Extrakt unbestimmten Abbauprozessen. Nach 300 min können die Signale dieser drei Verbindungen nicht mehr detektiert werden. Infolge geringer Konzentrationen und Bildung von Abbauprodukten, die bei ähnlichen Retentionszeiten erscheinen, gestaltete sich die Ermittlung der korrekten Signal-Flächen sehr schwierig. Auch bei einer Temperatur von 4 °C blieben diese Verbindungen nicht stabil. Sie zersetzten sich nur langsamer. Der Gehalt an Isoacteosid sank nach 1700 min auf 22 %, der von Acteosid auf 56 % und der von 6'-O-Acetylacteosid auf 60%. Erst bei einer Temperatur von -20°C veränderte sich die Konzentration dieser Verbindungen über einen Zeitraum von 1700 min nicht.

Auf Grund der Instabilität von Acteosid, Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid bei 37 °C wurde die Absorption dieser Substanzen im Caco-2-Zellsystem nicht untersucht. Die

Permeabilität von Harpagosid, Pagosid und 8-PCHG wurde in einem Zeitraum von 150 min untersucht. Die entnommenen Proben wurden nach der Testung bis zur Quantifizierung bei -20°C aufbewahrt. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die drei Substanzen weder während noch nach der Testung abgebaut wurden.

5.3 Bestimmung der Permeabilität von Kontrollsubstanzen

Auf Grund unterschiedlicher Kultivierung der Zellen und anderer Testbedingungen können die Permeabilitätskoeffizienten, die in verschiedenen Laboratorien ermittelt worden sind, nicht direkt miteinander verglichen werden [Yee, 1997]. Um trotzdem einen Hinweis darauf zu bekommen, wie der Permeabilitätskoeffizient der hier getesteten Verbindungen einzuordnen ist, wurde die Permeabilität von Kontrollsubstanzen bestimmt. FITC-Dextran (MG 4400) zählt dabei zu den Verbindungen mit einem niedrigen P_{eff} [Cogburn et al., 1991; Tanaka et al., 1995], während Propranolol einen sehr hohen Koeffizienten aufweist [Stenzel, 1981; Artursson, 1990; Cogburn et al., 1991].

5.3.1 FITC-DEXTRAN

Im Rahmen dieser Arbeit erfüllte FITC-Dextran zwei Aufgaben. Zum einem wurde es als Markersubstanz zur weiteren Bestimmung der Integrität der Monolayerschicht neben der TEER-Messung verwendet. Zum anderen diente es als Kontrollsubstanz für eine niedrige Permeabilität. Für die hier durchgeführten Versuche wurde FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4400 g/Mol in einer Konzentration von 0.1 mM in HBSS verwendet.

Als Markermoleküle werden vorzugsweise hydrophile Verbindungen verwendet, die passiv transportiert werden (Artursson et al., 1996). Auf Grund einfacherer Detektion werden häufig radio- oder fluoreszenzmarkierte Verbindungen genutzt, wie z.B. [^{14}C]-Mannitol, Lucifer Yellow, [^{14}C]-PEG, FITC-Dextran. Da sie hydrophil sind, können sie die lipophile Membran (transcellulärer Weg) nicht durchdringen. Ihr Transportweg ist auf die Poren der Tight Junctions (paracellulär) beschränkt. Untersuchungen des Transportweges von FITC-Dextran bestätigen das [Hidalgo et al. 1989]. Infolge der geringen Anzahl der Tight Junctions pro Epitheloberfläche ist die Permeabilität dieser Verbindungen im Gegensatz zu Substanzen, die über die Zellmembran aufgenommen werden, sehr niedrig (Kap. 1.3.1, S.27). Der Permeabilitätskoeffizient paracellulär transportierter Verbindungen gibt damit Aufschluss, ob sich die Kittleisten richtig ausgebildet haben. Beobachtet man neben dem TEER auch die

Transportrate dieser Markermoleküle in der Ausbildungsphase der Monolayerschicht, wird ersichtlich, dass deren Permeabilitätskoeffizient mit steigendem TEER-Wert sinkt. Ebenso wie der TEER-Wert verändert sich auch der Permeabilitätskoeffizient nach ca. 6-7 Tagen nicht weiter [Hidalgo et al. 1989].

Die Testung zur Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextran wurde wie in den Kapiteln 5.1.1 (S.149) und 9.6.5.2 (S.233) durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden mittels HPLC quantifiziert (Kap. 9.6.4.2, S.232). Dazu wurde ein isokratisches System mit Acetonitril und 0.1 % Trifluoressigsäure als Fließmittelkomponenten entwickelt. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor.

Im Laufe der hier durchgeführten Testungen wurde beobachtet, dass die FITC-Dextran-Permeabilität der 22 Tage alten Monolayer ab einem TEER-Wert von ca. $200 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ sich nur unwesentlich veränderte (Abb. 5.3.1-1). Bei den Monolayern, die einen geringeren TEER-Wert aufwiesen, war auch die Permeabilität geringer. Die hier

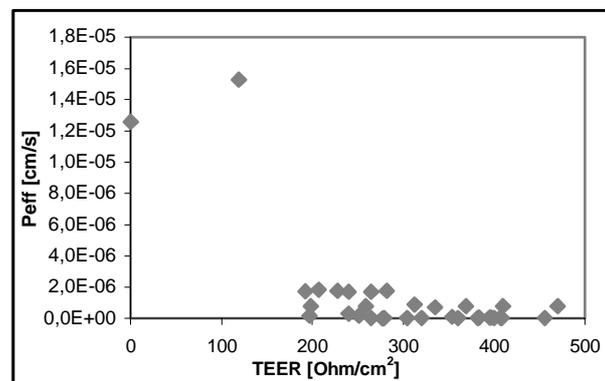


Abb. 5.3.1-1 Abhängigkeit des TEER-Wertes der Zellschicht von der FITC-Dextran-Permeabilität (P_{eff})

verwendeten Monolayerschichten schienen ab $200 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ dicht zu sein. Um eventuelle Undichtigkeiten vollständig auszuschließen, wurden für die Absorptionsstudien nur bewachsene Filter mit einem TEER-Wert größer als $250 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$ verwendet. Der ermittelte Permeabilitätskoeffizient über die Caco-2-Zellschicht für FITC-Dextran betrug dabei $0.14 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Abb. 5.1.3-1). Die in der Literatur erwähnten P_{eff} -Werte für FITC-Dextran sind zum Teil geringer als die hier ermittelten. Bei Kamm et al. (2000) lagen die Koeffizienten zwischen $0.0157 \cdot 10^{-6}$ und $0.0233 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$. Kotzé et al. (1997) bestimmten für FITC-Dextran einen Wert von $0.00040 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$. Tanaka et al. (1995) ermittelten einen Wert ähnlicher Größenordnung wie in den hier durchgeführten Testungen. Der Koeffizient lag dort bei $2.15 \cdot 10^{-6} \pm 0.024 \text{ cm/s}$. Wie bereits oben erwähnt, hängen die Permeabilitätskoeffizienten stark von den Test- und Kultivierungsbedingungen ab. Bei paracellulär

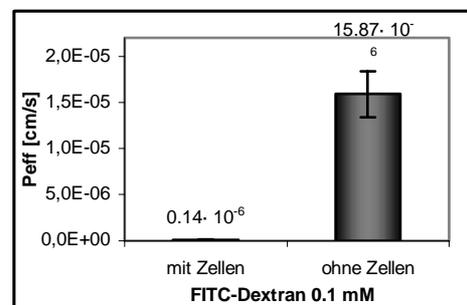


Abb. 5.3.1-2 Permeabilitätskoeffizient von FITC-Dextran über die Zellschicht (n = 19) und über den Polycarbonatfilter ohne Zellen (n=4)

transportierten Verbindungen spielt ebenfalls die Porengröße der Tight Junctions eine Rolle,

die je nach Herkunft der Zellen unterschiedlich sein kann.

Um weiterhin eine Bestätigung dafür zu bekommen, dass die Zellschicht den limitierenden Faktor des Transportes darstellt, wurde der Permeabilitätskoeffizient von FITC-Dextran über den Polycarbonat-Filter ohne Monolayer bestimmt. Hierbei wurde ein P_{eff} von $15.87 \cdot 10^{-6} \pm 2.5 \cdot 10^{-6}$ cm/s ermittelt (Abb. 5.3.1-2, S.157). Dieser Wert war um das 113fache größer als der P_{eff} über die Zellschicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Zellschicht den Transport über den Filter einschränkt.

5.3.2 PROPRANOLOL

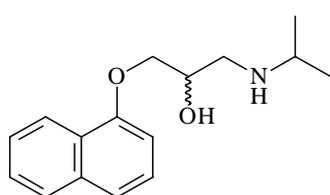


Abb. 5.3.2-1 Strukturformel von Propranolol

Propranolol (Abb. 5.3.2-1) wurde im Rahmen dieser Arbeit als Kontrollsubstanz mit einem hohen Permeabilitätskoeffizienten verwendet. Die Testung dieser Verbindung erfolgte wie in Kapitel 5.1.1 (S.149) und 9.6.5.2 (S.233) beschrieben. Die entnommenen Proben wurden anschließend photometrisch im UV-Maximum bei $\lambda = 290$ nm quantifiziert (Kap. 9.6.5.2.5, S.234). Es wurde dabei

ein Permeabilitätskoeffizient von $55.03 \cdot 10^{-6}$ cm/s ermittelt. Ein Vergleich mit Literaturdaten von Propranolol zeigt, dass der hier ermittelte Wert in derselben Größenordnung liegt, wie der anderer Arbeitsgruppen (Tab. 5.3.2-1).

Permeabilitätskoeffizient P_{eff} [cm/s] $\cdot 10^{-6}$				
Eigene Daten	Hovgaard et al. (1995)	Artursson et al. (1990)	Pade (1998)	Artursson (1990)
55.03 ± 1.1	82.4 ± 5.1	43.03 ± 3.64	30.1 ± 1.2	41.9 ± 4.31

Tab. 5.3.2-1 Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten von Propranolol aus eigener Testung mit Literaturdaten

Weitere Untersuchungen von Artursson et al. (1990) und Cogburn et al. (1991) zeigen, dass diese Substanz im Gegensatz zu FITC-Dextran passiv transcellulär, d.h. über die Zellmembran, transportiert wird. Der Permeabilitätskoeffizient ist auf Grund der großen Oberfläche der Zellmembran sehr hoch. Die Permeabilität ändert sich durch eine Erhöhung der Temperatur von 4 °C auf 37 °C stärker als bei passiv paracellulär transportierten und weitaus geringer als bei aktiv transportierten Verbindungen [Cogburn et al., 1991]. Infolge einer Öffnung der Tight Junctions mit EGTA (Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-

N,N,N',N'-tetraessigsäure) wird der Permeabilitätskoeffizient von Propranolol nicht beeinflusst. Das bedeutet, dass diese Verbindung nicht über die Poren der Kittleisten transportiert wird [Artursson et al., 1990].

Die humane Absorption von Propranolol *in vivo* ist nahezu 100 %. (Pade, 1998: 99 %, Artursson, 1990: 90 %). In diesem Fall kann der hohe Permeabilitätskoeffizient auf die Daten *in vivo* übertragen werden.

5.4 Untersuchung der Permeabilität von Inhaltsstoffen aus *Harpagophytum procumbens* DC.

Es liegen nur wenige Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Extraktes von *Harpagophytum procumbens* und seiner Inhaltsstoffe vor. Hauptsächlich wurde dabei das Harpagosid untersucht. Loew et al. (1996) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass Harpagosid über 90 Minuten im künstlichen Magensaft stabil blieb. Das ist ungewöhnlich für Iridoidglykoside, die ansonsten im sauren Milieu instabil sind [Hänsel et al., 1999]. Auf Grund dieser Instabilität und der anschließenden Umsetzung zu nicht identifizierbaren Polymeren galten die Iridoide früher als pharmakologisch unwirksam. Loew et al. (1996) führten weiterhin eine Pilotstudie am Menschen zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit durch. Maximale Plasmaspiegel (15 ng/mL) von Harpagosid konnten 2 Stunden nach oraler Applikation eines Extraktes gemessen werden. Chrubasik (1997) berichtet ebenfalls von einer schwachen Bioverfügbarkeit des Harpagosids nach Verabreichung eines Harpagophytum-Extraktes.

Die geringe Resorption von Harpagosid könnte durch Metabolisierungsreaktionen erklärt werden. Baghdikian et al. behandelten sowohl Einzelverbindungen (Harpagosid, Harpagid, 8-PCHG) als auch Harpagophyti radix Extrakt erst mit Salzsäure und anschließend mit Ammoniak [Baghdikian et al., 1999a] bzw. mit β -Glucosidase und Ammoniumacetat oder mit humaner Bakterienflora [Baghdikian et al., 1999b]. Infolge dieser Zusätze bildeten sich aus den Iridoiden Pyridinmonoterpen-Alkaloide (PMTA, z.B. Aucubinine B). Ghisalberti (1998) erwähnt, dass einige PMTA's, die aus der Umsetzung anderer Iridoide gewonnen worden sind, unter anderem eine antiinflammatorische Wirkung aufweisen. Die Reaktion zu den PMTAs wird auch *in vivo* vermutet. Sie ist allerdings bis jetzt für *Harpagophytum procumbens* nicht bestätigt worden. Die Iridoidglykoside würden somit Prodrugs darstellen. Das könnte eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen der pharmakologischen Aktivität des Extraktes und Harpagosid *in vitro* gegenüber derjenigen *in vivo* sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als ein wesentlicher Schritt der Resorption der Übergang des Extraktes und seiner Inhaltsstoffe über die Epithelschicht des Darmes im Caco-2-Zellsystem beobachtet.

5.4.1 UNTERSUCHUNG DES EXTRAKTES

Um zu sehen, welche Verbindungen aus dem Extrakt über die Zellschicht absorbiert werden, wurde zuerst der Extrakt untersucht. Der Extrakt löste sich bis zu 40 mg/mL klar in dem HBSS-Puffer (pH 7.5). Die Durchführung der Testung ist in Kapitel 5.1.1 (S.149) und 9.6.5.2 (S.233) beschrieben. Die Transportrichtung verlief vom apikalen in das basolaterale Kompartiment. Die entnommenen Proben wurden mittels HPLC (Kap. 9.1.2.3, S.211) quantifiziert. Ein typisches Chromatogramm der Extrakt-Lösung, die aus dem basolateralen Kompartiment entnommen wurde, ist in Abb. 5.4.1-1 dargestellt. .

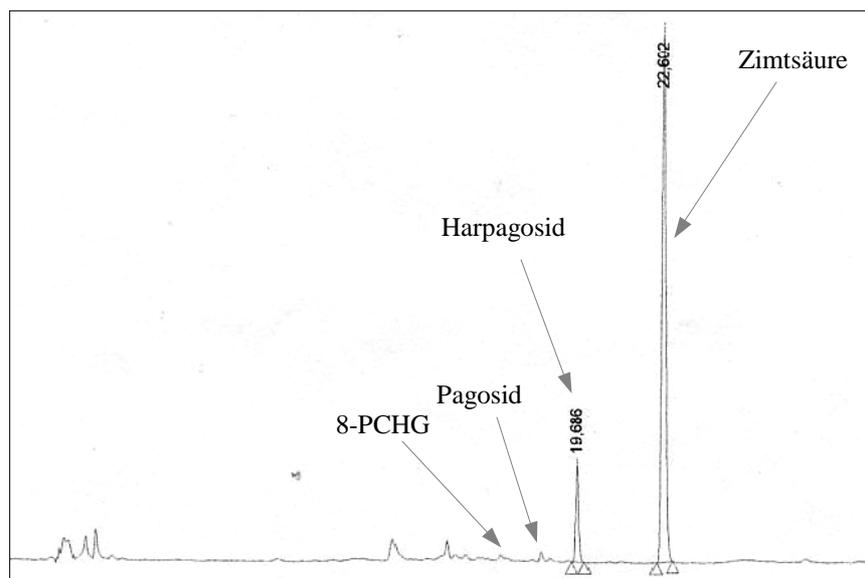


Abb. 5.4.1-1 HPLC-Chromatogramm (280 nm) des Extraktes (40 mg/mL) nach dem Transport (90 min) über die Zellschicht.

In dem HPLC-Chromatogramm erkennt man gut das Signal der Zimtsäure bei 22.6 min und das des Harpagosids bei 19.6 min. Die Peaks der anderen Iridoide, 8-PCHG und Pagosid, sind nur schwer zu identifizieren. Anfangs (bis 60 min Testzeit) erscheinen noch mehrere kleine Signale in dem Bereich zwischen 16 und 18 min, die jedoch mit fortschreitender Testdauer immer kleiner werden und bei 90 min nahezu im Grundrauschen verschwinden. Dabei kann es sich eventuell um die Phenylethanoide und um ihre Abbauprodukte handeln.

Bei weiteren Testungen des Extraktes wurde von den Iridoiden nur die Permeabilität des

Harpagosids bestimmt, da dieses Signal im Gegensatz zu den Signalen von 8-PCHG und Pagosid einwandfrei im Chromatogramm zu identifizieren und zu quantifizieren war.

Nach der Testung wurde noch einmal der TEER-Wert in jedem Insert bestimmt. Der Widerstand der Zellschicht hatte sich gegenüber dem Wert vor der Testung nicht verändert. Das deutet daraufhin, dass der Extrakt in dieser Konzentration keine cytotoxische Aktivität aufweist. Würden Verbindungen des Extraktes die Zellen zerstören, würde sich der TEER-Wert nach der Testung erheblich verringern [Artursson et al., 1996].

Als weiterer Vorversuch wurde die Permeabilität des Harpagosids im Extrakt ohne Zellschicht bestimmt. Einerseits sollte damit untersucht werden, ob Harpagosid an den Polycarbonatfilter absorbiert, zum anderen sollte gezeigt werden, dass die Zellschicht und nicht der Filter den Transport limitiert. Der Extrakt wurde in einer Konzentration von ca. 10 mg/mL gelöst. Das entsprach einer Harpagosid Konzentration von 264 µg/mL.

An Hand dieses Experimentes konnte festgestellt werden, dass Harpagosid keine Reaktion mit dem Filter eingeht. Die Menge, die in den apikalen Bereich gegeben worden ist, konnte im basolateralen Kompartiment wiedergefunden werden. Für die Testung von Harpagosid im Extrakt, dessen kumulativer Transport in Abb. 5.4.1-2 dargestellt ist, wurden 133 µg in den apikalen Raum pipettiert. Die gesamte Menge, die nach 180 min im basolateralen Bereich zu finden war, betrug 124 µg.

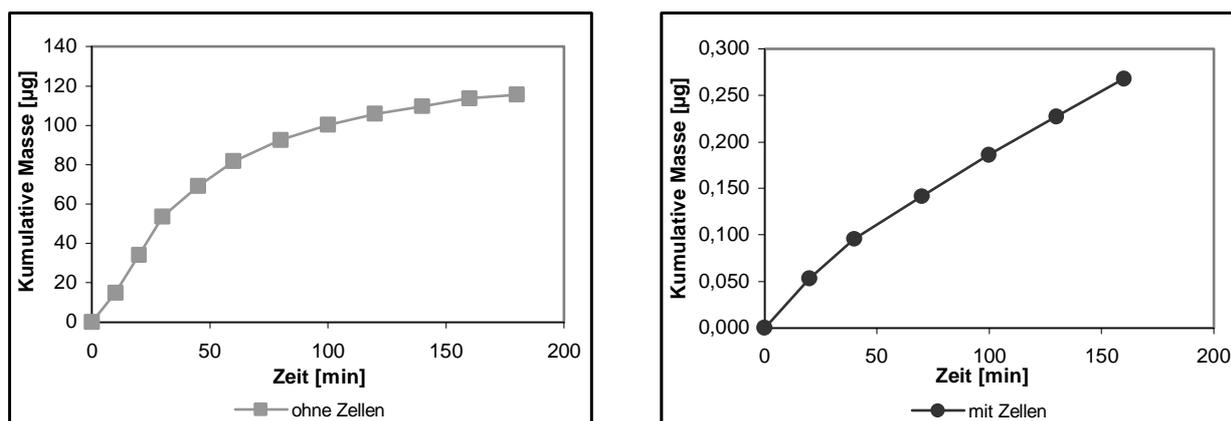


Abb. 5.4.1-2 links: Kumulativer Transport von Harpagosid (in 10mg/mL Extrakt) ohne Zellen; rechts: kumulativer Transport mit Zellen (in 10mg/mL Extrakt)

In der Grafik in Abb. 5.4.1-2 kann man sehen, dass über den reinen Filter ohne Zellen weitaus mehr Harpagosid pro Zeiteinheit transportiert wird als über den Filter mit einer Zellschicht. Der Transport über den Filter mit einem Monolayer verläuft linear. Pro Zeiteinheit wird die gleiche Menge an Harpagosid absorbiert. Der ermittelte Permeabilitätskoeffizient beträgt für

Harpagosid in diesem Fall $0.16 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Ohne eine Zellschicht verläuft der Transport jedoch nur in den ersten 30 min linear. Da in diesem Fall der Konzentrationsunterschied zwischen dem basolateralen und apikalen Raum die treibende Kraft für den Übergang über den Filter darstellt, verringert sich mit abnehmender Konzentration im apikalen Raum die Transportrate über den Filter. Der Kurvenverlauf wird daraufhin flacher. Hier konnte für Harpagosid ein Permeabilitätskoeffizient von $149 \cdot 10^{-6}$ cm/s ermittelt.

An Hand der Grafik und des Vergleiches der Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid wird eindeutig gezeigt, dass die Zellschicht und nicht der Filter den limitierenden Faktor des Harpagosid-Transportes darstellt.

5.4.1.1 Harpagosid im Extrakt

Um zu sehen, ob Konzentrationsunterschiede den Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid im Extrakt beeinflussen, wurde der Extrakt in den Konzentrationen 40, 20, 10 und 5 mg/mL in dem Caco-2-Zellsystem unter Beobachtung des Harpagosids untersucht. Hierbei könnten Hinweise gewonnen werden, ob die Verbindung passiv oder aktiv transportiert wird. Ist der Permeabilitätskoeffizient unabhängig von der Konzentration, weist das z.B. daraufhin, dass die Verbindung passiv über die Zellen aufgenommen wird. Auf die Untersuchung der Transportwege wurde bereits ausführlich in Kapitel 1.3.2 (S.28) eingegangen.

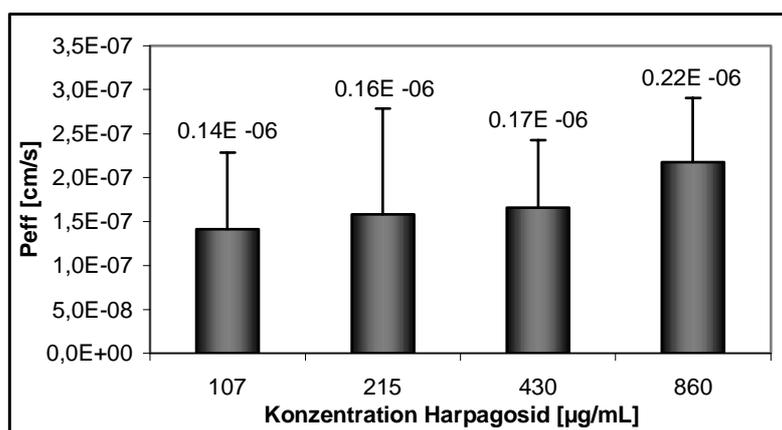


Abb 5.4.1.1-1 Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid (Extrakt)

In dem Konzentrationsbereich von 107 µg/mL bis 860 µg/mL verändert sich der Permeabilitätskoeffizient kaum. Er ist wahrscheinlich zu klein, um Aussagen über Transportmechanismen zu treffen. Artursson et al. (1996) empfiehlt zur Ermittlung des Transportweges den P_{eff} über einen großen Konzentrationsbereich, z. B $10^{-6} - 10^{-3}$ M, zu

untersuchen. Der Konzentrationsbereich konnte jedoch nicht erweitert werden, da mehr als 40 mg/mL Extrakt nicht mehr klar löslich waren. Bei dem Einsatz von weniger als 5 mg/mL Extrakt, konnte das Signal für Harpagosid nach der Testung nicht mehr detektiert werden.

An Hand dieser Untersuchung kann man nur die Aussage treffen, dass die Permeabilität von Harpagosid in dem Caco-2-Zellmodell sehr gering ist. Der ermittelte Wert befindet sich in der Größenordnung wie der, der für die Kontrollsubstanz FITC-Dextran ermittelt worden ist ($0.14 \cdot 10^{-6}$ cm/s; Kap. 5.3.1, S.156). Um genauere Hinweise auf den Transportweg des Harpagosids zu bekommen, wurde die Permeabilität von Harpagosid als Reinsubstanz untersucht. Diese Experimente werden in Kapitel 5.4.2 (S.164) beschrieben.

5.4.1.2 Zimtsäure im Extrakt

Neben Harpagosid wurde in dem in Kapitel 5.4.1.1 (S.162) beschriebenen Experiment die Transportrate der Zimtsäure bestimmt. Hierbei wurden die Konzentrationen des Extraktes so gewählt, dass Zimtsäure in den Konzentrationen 5, 10, 20 und 40 $\mu\text{g/mL}$ vorlag.

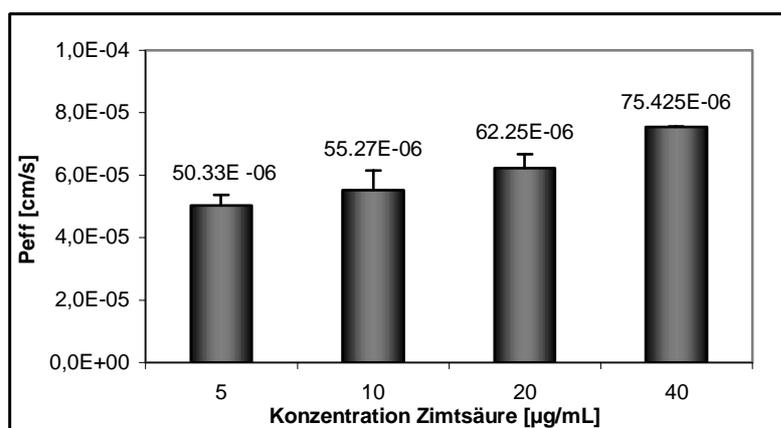


Abb. 5.4.1.2-1 Permeabilität der Zimtsäure

An Hand des Diagramms in Abbildung 5.4.1.2-1 kann man erkennen, dass Zimtsäure in einem weitaus größeren Maß über die Zellschicht absorbiert wird als Harpagosid. Der Permeabilitätskoeffizient von 50.3 bis $75.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s befindet sich in derselben Größenordnung wie die „Positiv-Kontrolle“ Propranolol ($55.03 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Zimtsäure wird im Gegensatz zu Harpagosid demnach gut über den Monolayer transportiert.

Mit einer Erhöhung der Konzentration scheint die Permeabilität der Zimtsäure leicht anzusteigen. Als Hinweis auf einen aktiven Transportmechanismus ist jedoch ein mit steigender Substanzkonzentration sinkender Permeabilitätskoeffizient zu erwarten.

Um mehr über den Transportmechanismus der Zimtsäure zu erfahren, wurde diese Verbindung ebenfalls als Reinsubstanz in einem größeren Konzentrationsbereich getestet.

5.4.2 TESTUNG VON REINSUBSTANZEN

Mit dem Caco-2-Zellsystem ist es nicht nur möglich zu überprüfen, ob eine Substanz über die Epithelschicht transportiert wird. Es ist unter kontrollierten Bedingungen auch möglich, den Transportmechanismus dieser Verbindung zu untersuchen [Yee, 1997]. Durch Variationen der Versuchsdurchführung (Kap. 5.1.1, S.149; Kap. 9.6.5.2, S.233), kann man passiv transcellulären, passiv paracellulären, aktiven und Efflux-Transport voneinander unterscheiden [Artursson et al., 1996; Yee et al., 1999].

Wie bereits in Kapitel 5.4.1 (S.160) erwähnt, kann man Hinweise auf aktive oder passive Transportmechanismen bekommen, indem man die Verbindung in einem großen Konzentrationsbereich testet (Kap. 5.4.2.1, S.165). Im Gegensatz zum passiven ist der aktive Transport konzentrationsabhängig. Das bedeutet, dass ab einer bestimmten Konzentration die vorhandenen Transporter abgesättigt sind. Durch eine Konzentrationserhöhung kann die Permeabilität über die Zellmembran dann nicht mehr gesteigert werden. Bei passiven Transportvorgängen wird bei Erhöhung der Konzentration im apikalen Bereich mehr Substanz von der apikalen zur basolateralen Seite transportiert. Auf dem Permeabilitätskoeffizienten passiv transportierter Substanzen hat das die Auswirkung, dass er sich bei einer Konzentrationserhöhung im apikalen Bereich nicht verändert. Er ist in dem Fall konzentrationsunabhängig, während er bei aktiv transportierten Verbindungen konzentrationsabhängig ist [Artursson et al., 1996].

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Testung in der umgekehrten Richtung von der basolateralen zur apikalen Seite durchzuführen (Kap. 5.4.2.2, S.172). Der P_{eff} passiv transportierter Substanzen ist unabhängig von der Transportrichtung. Er bleibt konstant, unabhängig in welcher Richtung die Testung durchgeführt worden ist. Bei aktiv transportierten Substanzen ist der Koeffizient bei der Testung von der apikalen Seite zur basolateralen Seite größer als in der umgekehrten Richtung, da ein Transportsystem nur in eine Richtung arbeitet. Aus demselben Grund ist bei dem Vorliegen eines Efflux-Systems (Kap. 1.3.2, S.28), das bereits in die Zelle aufgenommene Substanzen aktiv wieder in das apikale Kompartiment rücktransportiert, der Permeabilitätskoeffizient bei der Testung von basolateral zu apikal (umgekehrt) größer [Artursson et al., 1996, Irvine et al., 1999].

Geben die ersten Versuche (Abhängigkeit von Richtung und Konzentration) Hinweise auf aktive Transportprozesse oder Effluxsysteme, so gibt es die Möglichkeit, bestimmte Carrier zu hemmen und dadurch den Permeabilitätskoeffizienten in charakteristischer Weise zu verändern. Zur Hemmung des P-Glykoproteins steht z.B. Verapamil, therapeutisch verwendet als Calcium-Antagonist, zur Verfügung. Infolge der Hemmung des P-Glykoproteins durch Verapamil, können Substanzen, die ansonsten über das P-Glykoprotein wieder auf die apikale Seite rücktransportiert worden wären, in das basolaterale Kompartiment gelangen. Der unter diesen Bedingungen ermittelte Permeabilitätskoeffizient ist für diese Verbindung größer als ohne Verapamil-Zusatz (Kap. 5.4.2.3, S.176) [Hunter et al., 1993; Chung et al., 2001].

Es gibt noch weitere Möglichkeiten, den aktiven Substanztransport zu untersuchen, wie z. B. die Temperaturabhängigkeit des Transportes oder den Transport gegen einen Konzentrationsgradienten. Diese Experimente wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Aus dem Grund werden sie auch nicht näher beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung verschiedener Versuchsanordnungen geben Artursson et al. (1996).

Den passiv transcellulären Transport kann man von dem passiv paracellulären abgrenzen, indem man die Poren der Tight Junctions öffnet (Kap. 5.4.2.4, S.180). Infolgedessen wird die Permeabilität paracellulär transportierter Verbindungen erhöht. Der Transport von Substanzen über die Zellmembran (transcellulär) wird dadurch nicht beeinflusst. Die Kittleisten werden durch den Entzug von Calcium gelockert. Zum einen wird das durch Verwendung eines Calcium-freien Transportpuffers erreicht. Der Effekt ist jedoch größer, wenn man Ca-Chelat-Komplexbildner wie EDTA oder EGTA einsetzt [Artursson et al., 1990; Gan et al., 1993; Tomita et al., 1994].

5.4.2.1 Apikaler zu basolateraler Transport

Die Permeabilität von der apikalen zur basolateralen Seite wurde für die Verbindungen Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid und Zimtsäure in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Wie bereits in Kapitel 5.2 (S.153) erwähnt wird die Permeabilität der Phenylethanoide Acteosid, Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid auf Grund deren Instabilität bei 37°C im Transportpuffer nicht untersucht.

Die Durchführung der Testung wird in Kapitel 5.1.1 (S.149) und 9.6.5.2.1 (S.233) beschrieben. Da das apikale Kompartiment das Darmlumen und der basolaterale Bereich die Blutbahn darstellt, entspricht diese Richtung der Resorptionsrichtung von Substanzen im Gastrointestinaltrakt.

5.4.2.1.1 Harpagosid

Harpagosid wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/mL bis 2500 µg/mL getestet. Die für diese Konzentrationen ermittelten Permeabilitätskoeffizienten sind in der Abbildung 5.4.2.1-1 dargestellt. Die dunkleren Balken geben die Ergebnisse von Harpagosid als Reinsubstanz und die helleren spiegeln die Ergebnisse von Harpagosid im Extrakt wieder. Die Untersuchungen von Harpagosid im Extrakt sind bereits in Kapitel 5.4.1.1 (S.162) ausführlich beschrieben worden. Die Permeabilitätskoeffizienten dienen hier lediglich als Vergleich.

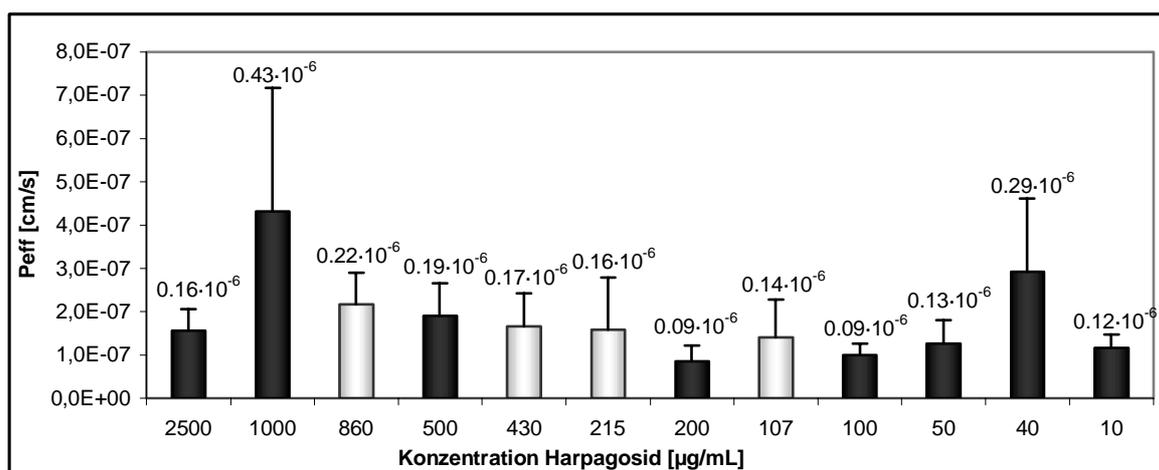


Abb. 5.4.2.1-1 Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid, Transportrichtung von apikal zu basolateral; *dunkle Balken*: Harpagosid als isolierte Verbindung, *helle Balken*: Harpagosid im Extrakt

Wie bereits in Kapitel 5.4.1.1 (S.162) erwähnt, ist der Permeabilitätskoeffizient von Harpagosid sehr niedrig. Für die Leitsubstanz des Extraktes von *Harpagophytum procumbens* liegt der Wert zwischen 0.09 und $0.47 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Damit liegt er in derselben Größenordnung wie der Wert der „Negativ“-Kontrolle (FITC-Dextran $0.14 \cdot 10^{-6}$ cm/s; Kap. 5.3.1, S.156). Harpagosid wird demnach nur in geringem Maße über die Caco-2-Zellschicht absorbiert.

Bei dem Vergleich der Koeffizienten (Abb. 5.4.2.1-1) von Harpagosid als isolierte Verbindung (dunklere Balken) und Harpagosid im Extrakt (hellere Balken) ist kein Unterschied in der Permeabilität zu erkennen. Durch die übrigen Extraktbestandteile wird der P_{eff} weder erhöht noch erniedrigt.

Weiterhin verbleibt der Permeabilitätskoeffizient in dem getesteten Konzentrationsbereich von 10 – 2500 µg/mL in der gleichen Größenordnung. Mit steigender Konzentration ist keine Verringerung des Koeffizienten zu sehen. Diese Unabhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten von der Konzentration deutet darauf hin, dass Harpagosid passiv transportiert wird (Kap. 5.4.2, S.164).

Metabolisierungsreaktionen konnten nicht erkannt werden. In den Chromatogrammen der basolateral entnommenen Proben konnten keine zusätzlichen Signale erkannt werden. Weiterhin konnte die Menge, die im apikalen Bereich fehlte, nach 150 min im basolateralen Kompartiment wiedergefunden werden. Das bedeutet einerseits wieder, dass Harpagosid nicht metabolisiert wird und andererseits, dass die Verbindung nicht in der Zellschicht kumuliert wird.

In Caco-2-Monolayern steigt die Permeabilität mit steigender Lipophilie der Verbindungen [Yamashita et al., 1997; Yazdanian et al., 1998]. Harpagosid ist eine hydrophile Substanz. Aus dem Grund wundert es nicht, dass Harpagosid eine sehr geringe Permeabilität aufweist [Padi et al., 1997]. Jedoch gibt es auch Ausnahmen, wie z.B. Glucose, die ebenfalls hydrophil ist und im Caco-2-Testmodell eine hohe Permeabilität aufweist [Cogburn et al., 1991]. Der Grund dafür ist, dass Glucose mittels eines Transporters aktiv über die Zellschicht transportiert wird. Die meisten hydrophilen Verbindungen mit einem geringen Molekulargewicht werden hauptsächlich über die Kittleisten transportiert. Hohe Permeabilitätskoeffizienten weisen demnach bei hydrophilen Substanzen auf einen aktiven Transport hin [Yee, 1997].

Ein weiterer Grund für die geringe Permeabilität von Harpagosid könnte auch durch die Aktivität eines Efflux-Systems, wie z.B. das P-Glykoprotein, zu Stande kommen. Das P-Glykoprotein ist ein Transportsystem, das sich an der apikalen Membran der Zellen befindet und das Substanzen, die bereits in die Zelle aufgenommen worden sind, aus der Zelle wieder aktiv herausbefördert (Kap. 1.3.2, S.28). Dadurch wird weniger Substanz in das basolaterale Kompartiment transportiert. Der Permeabilitätskoeffizient ist in dem Fall meist sehr niedrig [Camenish et al., 1998]. Jedoch würde auch ein Transport über das P-Glykoprotein eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen, da es sich hierbei ebenfalls um ein aktives und damit absättigbares System handelt. In dem hier getesteten Konzentrationsbereich liegen dagegen die Permeabilitätskoeffizienten des Harpagosids, wie bereits beschrieben, in derselben Größenordnung.

An Hand der obigen Ausführungen ist es wahrscheinlich, dass Harpagosid passiv über die Kittleisten absorbiert wird. Eine Beteiligung des P-Glykoproteins ist jedoch nicht auszuschließen, da zur Überprüfung einer Konzentrationsabhängigkeit der gewählte Konzentrationsbereich eventuell noch zu klein war. Um diesen Vermutungen weiter nachzugehen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Der Transport in umgekehrter Richtung von basolateral zu apikal (Kap. 5.4.2.2.1, S.173) und der Zusatz von Verapamil

(Kap. 5.4.2.3.1, S.177) zum Transportpuffer sollen Aufschluss darüber geben, in wie weit das P-Glykoprotein am Harpagosid-Transport beteiligt ist. Der paracelluläre Transport kann durch die Zugabe von EDTA zum Transportpuffer untersucht werden (Kap. 5.4.2.4.1, S.181).

Bezieht man sich auf die Korrelation, die sowohl Artursson et al. (1991) und Yee (1997) zwischen dem Permeabilitätskoeffizienten und der humanen Absorption *in vivo* aufgestellt haben (Tab. 5.1-1, S.149), gehört Harpagosid zu den Verbindungen, die eine schlechte Resorbierbarkeit aufweisen. Bei Verbindungen jedoch, die paracellulär oder über ein Efflux-System transportiert werden, ist der Permeabilitätskoeffizient *in vitro* geringer als die Absorption *in vivo* sein würde [Artursson et al., 1991; Yee, 1997]. Die Caco-2-Zellen bilden Kittleisten mit einem geringeren Porendurchmesser aus als die Darmepithelzellen, wodurch die Resorption paracellulär transportierter Substanzen in dem Caco-2-Monolayer gegenüber der Darmepithelschicht eingeschränkt ist [Artursson et al., 1991]. Weiterhin exprimieren Caco-2-Zellen mehr P-Glykoprotein als Zellen, die nicht carcinogenen Ursprungs sind. Auch bei P-Glykoprotein-Substraten ist der Transport in den Caco-2-Zellen geringer als in den Darmepithelzellen [Yee, 1997]. Ebenso ist zu beachten, dass *in vivo* die resorbierten Verbindungen kontinuierlich über die Blut- bzw. Lymphbahn abtransportiert werden. In dem hier durchgeführten Testsystem wird nur in festgelegten Zeitabständen aus dem basolateralen Kompartiment Substanz entnommen. Der Konzentrationsunterschied ist in diesem Fall geringer, wodurch die Permeabilität passiv transportierter Verbindungen vermindert werden kann.

Auf Grund der obigen Ausführungen ist deswegen zu vermuten, dass Harpagosid trotz der hier ermittelten Werte zu einem geringen Anteil aus dem Darmlumen in die Blutbahn gelangen kann.

5.4.2.1.2 8-PCHG

Die Permeabilität von 8-PCHG wurde in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 1000 µg/mL bestimmt. Auf Grund der Untersuchung des Extraktes (Kap. 5.4.1, S.160) lässt sich auch für 8-PCHG eine geringe Permeabilität vermuten. Das Signal des 8-PCHGs war in den Chromatogrammen (Abb. 5.4.1-1, S.160) der aus dem basolateralen Bereich entnommenen Proben kaum zu identifizieren.

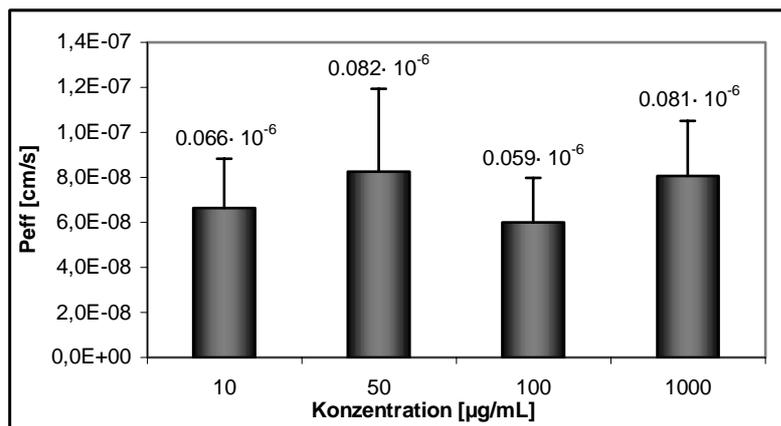


Abb. 5.4.2.1-2 Permeabilitätskoeffizienten von 8-PCHG, Transportrichtung von apikal zu basolateral

Durch die Bestimmung des Permeabilitätsquotienten wurde die obige Vermutung bestätigt. Der P_{eff} von 8-PCHG liegt für die angegebenen Konzentrationen zwischen $0.059 \cdot 10^{-6}$ und $0.082 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Die Verbindung zeigt ebenfalls nur eine geringe Resorption über die Caco-2-Zellen. Im Durchschnitt ist der Koeffizient damit kleiner als der des Harpagosids (Abb. 5.4.2.1-1, S.166).

In dem untersuchten Konzentrationsbereich (10 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) zeigt der Permeabilitätskoeffizient keine Veränderung. Demnach scheint er auch bei 8-PCHG konzentrationsunabhängig zu sein, was auf einen passiven Transportmechanismus hindeutet. Auf Grund des geringen Permeabilitätskoeffizienten lässt sich auch hier vermuten, dass 8-PCHG entweder passiv transportiert wird oder ein P-Glykoprotein-Substrat darstellt (Kap. 5.4.2.1.1, S.166).

Die Permeabilität über den passiven Transportweg ist abhängig vom Molekulargewicht, der Lipophilie und der Ladung der Verbindung [Camenish et al., 1998]. Grundsätzlich gilt dabei, dass mit steigendem Molekulargewicht und geringerer Lipophilie die Permeabilität sinkt. Durch die zusätzliche Hydroxylgruppe im aromatischen Rest des 8-PCHGs steigt nicht nur das Molekulargewicht, sondern die Verbindung wird auch hydrophiler. Deshalb ist zu erwarten, dass der Permeabilitätskoeffizient geringer ist als der des Harpagosids.

5.4.2.1.3 Pagosid

Pagosid wurde in den Konzentration 50, 100 und 1000 $\mu\text{g/mL}$ in dem Caco-2-Zellkultursystem getestet.

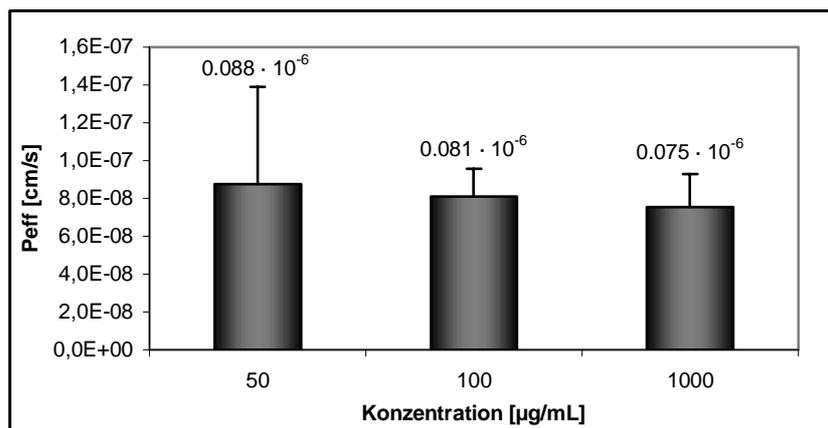


Abb. 5.4.2.1-3 Permeabilitätskoeffizienten von Pagosid, Transportrichtung von apikal zu basolateral

Wie in der Abbildung 5.4.2.1-3 zu sehen ist, ist die Permeabilität von Pagosid sehr gering. Die Werte der Permeabilitätskoeffizienten liegen zwischen $0.075 \cdot 10^{-6}$ und $0.088 \cdot 10^{-6}$ cm/s und sind wie die Koeffizienten des 8-PCHGs ebenfalls kleiner als die des Harpagosids. Bei der Testung des Extraktes von *Harpagophytum procumbens* war bereits erkennbar, dass Pagosid in geringerem Maße über die Zellschicht transportiert wird als Harpagosid. In dem HPLC-Chromatogramm (Abb. 5.4.1-1, S.160) der basolateral entnommenen Proben war das Signal des Pagosids kaum zu identifizieren. Weiterhin ist dort ersichtlich, dass Pagosid wie 8-PCHG polarer als Harpagosid ist. Beide Verbindungen werden an RP-18-Material eher eluiert als Harpagosid. Das bestätigt die Erkenntnis, dass mit steigender Hydrophilie die Permeabilität sinkt.

In dem getesteten Konzentrationsbereich zeigt der Permeabilitätskoeffizient keine wesentliche Veränderung. Aus dem Grund lässt sich für Pagosid, wie bei Harpagosid und 8-PCHG, ein passiver Transport über die Kittleisten vermuten. Infolge des geringen Permeabilitätskoeffizienten ist auch die Beteiligung eines Efflux-Systems möglich.

5.4.2.1.4 Zimtsäure

Die Permeabilität der Zimtsäure wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.2 µg/mL bis 800 µg/mL untersucht. Um die Löslichkeit der Zimtsäure in dem Puffer zu gewährleisten, wurde Zimtsäure erst in DMSO gelöst und anschließend mit dem HBSS-Puffer versetzt. Die Endkonzentration an DMSO betrug in der Testlösung 0.5 %. Nach Alsenz et al. (1998) führt eine Konzentration von <1 % DMSO zu keinem Integritätsverlust der Zellschicht. Eine Beeinflussung des P_{eff} wurde nicht beschrieben.

Um die Beeinflussung von DMSO auf die Integrität zu überprüfen, wurde nach der Testung mit Zimtsäure der TEER-Wert der verwendeten Zellschichten bestimmt. Die TEER-Werte der Inserte nach der Testung waren gegenüber denen vor der Testung nicht erniedrigt. Das bestätigt die Untersuchung von Alsenz et al. (1998). Diese Konzentration an DMSO hat keinen schädigenden Einfluss auf die Zellschicht und kann somit als Lösungsvermittler eingesetzt werden.

Auf Grund der hohen Permeabilität der Zimtsäure, was im folgenden noch gezeigt wird, wurde der Testzeitraum von 150 min auf 60 min verkürzt. In Abständen von 10 min wurden aus dem basolateralen Bereich Proben entnommen. Dadurch konnte verhindert werden, dass die Konzentration im apikalen Bereich während der Testung zu stark abnahm und der Konzentrationsgradient als treibende Kraft eines passiven Transportes sich verschob.

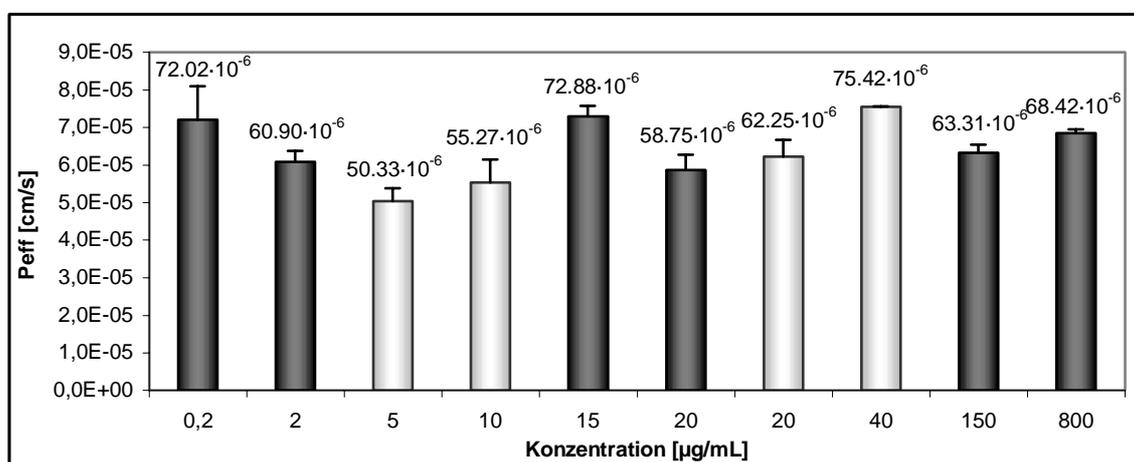


Abb. 5.4.2.1-4 Permeabilitätskoeffizienten von Zimtsäure, Transportrichtung von apikal zu basolateral; *dunkle Balken*: Zimtsäure als isolierte Verbindung, *helle Balken*: Zimtsäure im Extrakt (Kap. 5.4.1.2, S.163)

Im Gegensatz zu den Iridoiden (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) zeigt Zimtsäure eine weitaus höhere Permeabilität. Mit einem Permeabilitätskoeffizienten zwischen $50.33 \cdot 10^{-6}$ und $75.42 \cdot 10^{-6}$ cm/s liegt er nahezu um zwei Zehnerpotenzen höher als der der Iridoide. Der P_{eff} der Zimtsäure liegt damit in derselben Größenordnung wie der Koeffizient des Propranolols (P_{eff} = 55.03 cm/s; Kap. 5.3.2, S.158). Damit kann Zimtsäure zu den Verbindungen gezählt werden, die eine hohe Absorption im Caco-2-Zellmodell aufweisen.

In der Abbildung 5.4.2.1-4 sind sowohl die Permeabilitätskoeffizienten der isolierten Zimtsäure, als auch die Koeffizienten der Zimtsäure im Extrakt dargestellt. An Hand dieser Grafik kann man erkennen, dass weitere Inhaltsstoffe des Extraktes, wie bei Harpagosid (Kap.

5.4.2.1.1, S.166), die Permeabilität nicht beeinflussen. Der Permeabilitätskoeffizient der isolierten Verbindung liegt in derselben Größenordnung wie der der Zimtsäure, die im Extrakt getestet worden ist.

Wie bei den vorher getesteten Verbindungen (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) ist auch der Permeabilitätskoeffizient der Zimtsäure unabhängig von der Konzentration. Dies deutet wiederum auf einen passiven Transportmechanismus hin.

Vergleicht man die Permeabilitätskoeffizienten der Zimtsäure mit Verbindungen, die sowohl einen ähnlichen pKa als auch ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass Zimtsäure transcellulär, d.h. über die Zellmembran transportiert, wird. Padi et al. (1997) untersuchten den passiven Transport verschiedener Arzneistoffe. Naproxen kann dabei mit einem pKa von 4.2 und einem Molekulargewicht von 230.3 mit der Zimtsäure (pKa 4.46, MG 148.16) verglichen werden. Naproxen, das wie die Zimtsäure eine schwache Säure darstellt, wird sowohl bei einem pH-Wert von 5.4 als auch bei einem pH-Wert von 7.2 hauptsächlich über den transcellulären Weg transportiert. Weiterhin stellten Padi et al. (1997) im Laufe ihrer Untersuchungen fest, dass hauptsächlich kleine, positiv geladene Moleküle auf dem paracellulären Weg transportiert werden. Sollte Zimtsäure bei einem pH von 7.5 dissoziiert vorliegen, läge es als Anion einer schwachen Säure vor, die nach Padi et al. (1997) für den paracellulären Weg nicht favorisiert ist. Auf Grund der geringen Oberfläche der Kittleisten der Zellschicht ist es weiterhin unwahrscheinlich, dass eine paracellulär transportierte Verbindung einen so hohen Permeabilitätskoeffizienten erreichen kann. Bei den meisten paracellulär transportierten Verbindungen liegt der Permeabilitätskoeffizient unter $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

5.4.2.2 Basolateraler zu apikaler Transport

Wie bereits erwähnt (Kap. 5.4.2, S.164) kann ein Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten von „normaler“ und „umgekehrter“ Testrichtung Hinweise auf den Transportmechanismus geben. Da bei den hier getesteten Verbindungen (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid, Zimtsäure) auf Grund der Konzentrationsunabhängigkeit ein passiver Transportmechanismus vermutet wird, müssten die Permeabilitätskoeffizienten beider Richtungen in derselben Größenordnung liegen.

In diesem Experiment wurde 1.5 mL der zu untersuchenden Testlösung in das basolaterale Kompartiment gegeben. In bestimmten Zeitabständen (Kap. 9.6.5.3.1, S.235) wurden 0.2 mL

aus dem apikalen Kompartiment entnommen und durch frischen Transportpuffer ersetzt. Der Transport der Substanzen erfolgte somit in „umgekehrter“ Richtung.

5.4.2.2.1 Harpagosid

In diesem Experiment wurde Harpagosid in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 1000 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt. Die ermittelten Permeabilitätskoeffizienten wurden mit denen verglichen, die für die entsprechenden Konzentrationen in der Transportrichtung apikal zu basolateral ermittelt worden sind (Abb. 5.4.2.2-1, S.166).

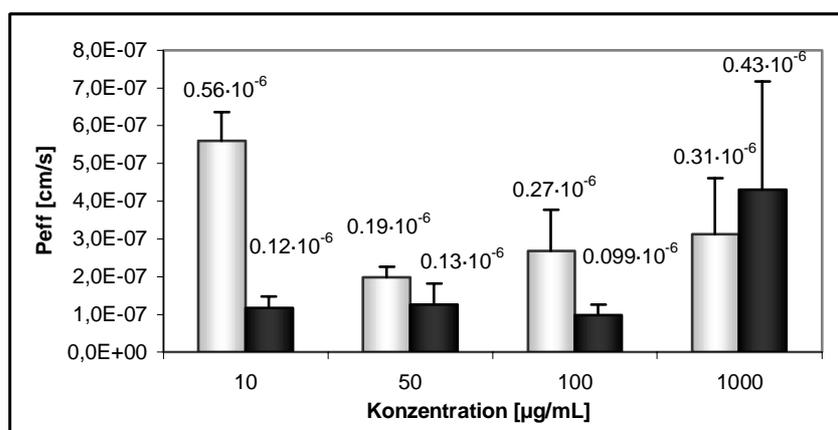


Abb. 5.4.2.2-1 Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid, Transportrichtung von basolateral zu apikal (*helle Balken*) und apikal zu basolateral (*dunkle Balken*)

An Hand der Grafik in Abbildung 5.4.2.2-1 kann man erkennen, dass sich die Permeabilitätskoeffizienten der Konzentrationen 50 $\mu\text{g/mL}$ und 1000 $\mu\text{g/mL}$ aus der basolateral zu apikalen und apikal zu basolateralen Richtung nicht signifikant unterscheiden. Das deutet darauf hin, dass der Koeffizient bei den Konzentrationen richtungsunabhängig ist und Harpagosid passiv transportiert wird. Auffällig ist nur, dass bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/mL}$ und 100 $\mu\text{g/mL}$ der basolateral zu apikale Transport signifikant größer ist, als der Transport von apikal zu basolateral. Das würde darauf hindeuten, dass ein Transportsystem beteiligt ist, welches zu der apikalen Seite hin arbeitet, wie z.B. das P-Glykoprotein. Wäre jedoch ein Efflux-System beteiligt, müsste eine Erhöhung der Konzentration infolge der Absättigung der Transporter in umgekehrter Richtung einen konstanten Abfall des Permeabilitätskoeffizienten zur Folge haben. Der P_{eff} sinkt zwar von 10 zu 50 $\mu\text{g/mL}$ ab, jedoch bleibt er von 50 $\mu\text{g/mL}$ bis 1000 $\mu\text{g/mL}$ in demselben Bereich und verringert sich nicht weiter.

Da diese Ergebnisse nicht eindeutig zeigen konnten, auf welche Weise Harpagosid transportiert wird, wurde weiterhin die Beeinflussung des P-Glykoproteins durch Zusatz von Verapamil (Kap. 5.4.2.3.1, S.177) und der Transport über die Tight Junctions durch Zugabe von EDTA zum Transportpuffer (Kap. 5.4.2.4.1, S.181) untersucht.

5.4.2.2.2 8-PCHG

Der basolaterale zu apikale Transport von 8-PCHG wurde in den Konzentrationen 50 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL beobachtet.

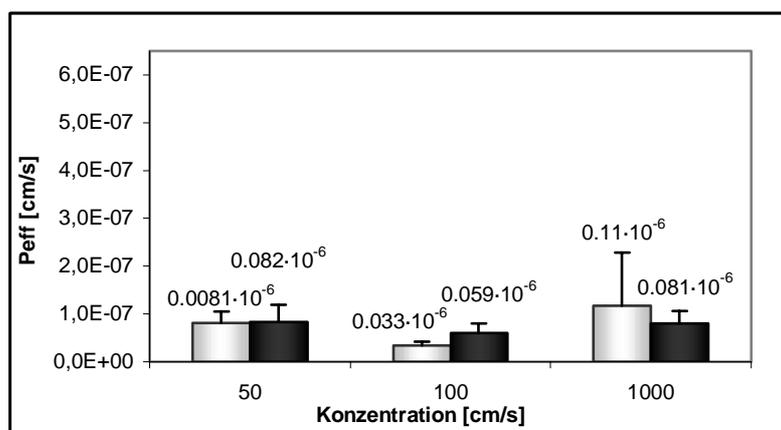


Abb. 5.4.2.2-2 Permeabilitätskoeffizienten von 8-PCHG, Transportrichtung von basolateral zu apikal (*helle Balken*) und apikal zu basolateral (*dunkle Balken*)

In allen getesteten Konzentrationen liegen die Permeabilitätskoeffizienten beider Richtungen in derselben Größenordnung. Die Differenzen sind zufällig und nicht signifikant. Weiterhin scheint auch der Permeabilitätskoeffizient des umgekehrten Transportes von 50 µg/mL zu 1000µg/mL konzentrationsunabhängig zu sein. Beides weist daraufhin, dass 8-PCHG passiv über die Caco-2-Zellschicht transportiert wird.

5.4.2.2.3 Pagosid

Pagosid wurde wie 8-PCHG in den Konzentrationen 50 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL getestet.

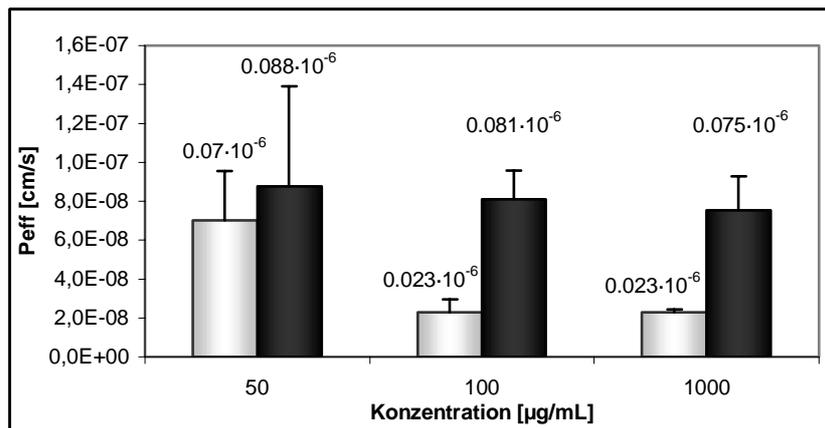


Abb. 5.4.2.2-3 Permeabilitätskoeffizienten von Pagosid, Transportrichtung von basolateral zu apikal (*helle Balken*) und apikal zu basolateral (*dunkle Balken*)

Bei 50 µg/mL unterscheiden sich die Permeabilitätskoeffizienten beider Richtungen nicht signifikant voneinander. Das deutet auf einen passiven Transportmechanismus hin. Bei 100 µg/mL und 1000 µg/mL wird Pagosid von apikal zu basolateral signifikant schneller transportiert als von basolateral zu apikal. Der Grund dafür könnte ein aktives Transportsystem sein, das Verbindungen von der apikalen zur basolateralen Seite transportiert. Die Permeabilitätskoeffizienten aktiv transportierter Verbindungen dürften in umgekehrter Richtung (basolateral zu apikal) keine Konzentrationsabhängigkeit zeigen, da in dieser Richtung die Verbindungen passiv und nicht über den Transporter befördert werden. Der P_{eff} von 50 µg/mL ist im Gegensatz zu 100 und 1000 µg/mL jedoch erhöht. Das widerspricht einem aktiven Transportmechanismus.

Gegen einen aktiven Transportmechanismus spricht weiterhin, dass der Permeabilitätskoeffizient solcher Verbindungen meistens in einem höheren Bereich liegt, wie z.B. Glucose mit einem P_{eff} von $8.5 \cdot 10^{-5}$ cm/s [Hilgers et al., 1990]. Niedrige Permeabilitätskoeffizienten liegen bei Substanzen vor, die entweder passiv paracellulär transportiert oder aktiv über das P-Glykoprotein wieder in den apikalen Bereich sezerniert werden.

5.4.2.2.4 Zimtsäure

Die Permeabilität der Zimtsäure vom apikalen in das basolaterale Kompartiment wurde in den Konzentrationen 5 µg/mL, 10 µg/mL und 20 µg/mL ermittelt.

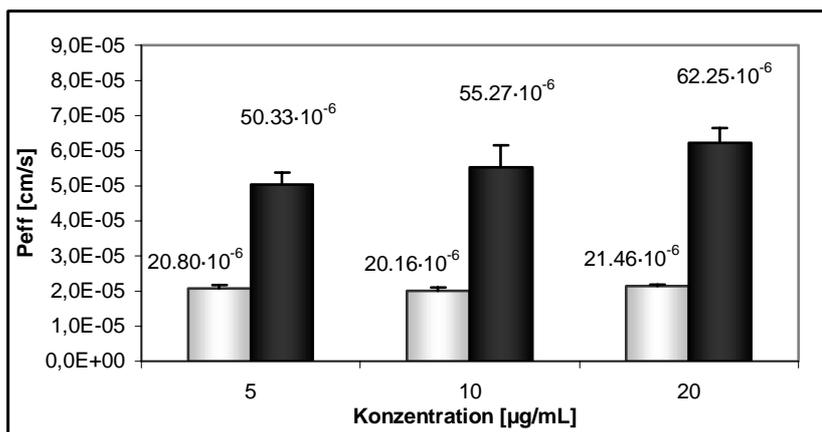


Abb. 5.4.2.2-4 Permeabilitätskoeffizienten von Zimtsäure, Transportrichtung von basolateral zu apikal (*helle Balken*) und apikal zu basolateral (*dunkle Balken*)

Die Permeabilitätskoeffizienten der Zimtsäure von der apikalen zur basolateralen Seite sind signifikant größer als die der umgekehrten Transportrichtung (basolateral zu apikal). Dafür können aktive Transportmechanismen verantwortlich sein. Beachtet man jedoch die Konzentrationsunabhängigkeit in einem Bereich von 0.2 bis 800 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 5.4.2.2-4), ist ein aktiver Transportmechanismus nicht wahrscheinlich.

Nimmt man allerdings an, dass Zimtsäure bei dem pH von 7.4 undissoziiert vorliegt und den transcellulären Transportweg vorzieht, kann der Unterschied der Permeabilitätskoeffizienten durch die unterschiedliche Größe der Oberfläche von apikaler und basolateraler Membran zu Stande kommen. Die Oberfläche der apikalen Membran ist um das 1000fache größer als die der basolateralen Membran, wodurch transcellulär transportierte Verbindungen von der apikalen Seite in größerem Maße aufgenommen werden können als von der basolateralen.

Da Zimtsäure keinen bekannten, antiinflammatorischen Wirkstoff darstellt und ubiquitär in der Pflanzenwelt vorhanden ist, wurde der Transportweg der Zimtsäure nicht weiter untersucht. An Hand der bereits durchgeführten Experimente liegt entweder passiv transcellulärer oder ein aktiver Transportmechanismus vor. Durch einen Vergleich mit Permeabilitätskoeffizienten ähnlicher Verbindungen [Padi et al., 1997] und an Hand der hier durchgeführten Untersuchungen ist jedoch der passiv transcelluläre Weg wahrscheinlicher.

5.4.2.3 Zusatz von Verapamil

Insbesondere bei Harpagosid besteht durch den insgesamt höheren Permeabilitätskoeffizienten in der basolateral zu apikalen Richtung (Abb. 5.4.2.2-1, S.173) gegenüber der apikal zu basolateralen Richtung die Möglichkeit, dass ein Efflux-System wie

das P-Glykoprotein an dem Transport beteiligt ist. Bei dem P-Glykoprotein handelt es sich um eine ATP-abhängige Pumpe, die an der apikalen Membran von Epithelzellen lokalisiert ist. Da dieser Transporter bereits in die Zelle aufgenommene Substanzen wieder auf die apikale Seite rücktransportiert, ist er zum Teil verantwortlich für eine limitierte Absorption. In Krebszellen wird das P-Glykoprotein für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht [Hunter et al., 1993]. Dort kommen die Efflux-Systeme auch gehäuft vor. In gesundem Gewebe verhindern sie die Anreicherung von toxischen Substanzen.

Um zu überprüfen, in wieweit ein Efflux-System an dem Transport beteiligt ist, versetzt man den Transportpuffer mit einem P-Glykoprotein-Inhibitor wie z. B. Verapamil, Nifedipin oder Taxotere [Hunter et al., 1993]. Dieser verdrängt andere Substrate von dem P-Glykoprotein, die dann nicht mehr aus der Zelle in den apikalen Raum transportiert werden, sondern auf die basolaterale Seite gelangen. Daher ist der Permeabilitätskoeffizient (apikal zu basolateral) von P-Glykoprotein-Substraten nach der Zugabe eines „P-Glykoprotein-Inhibitors“ erhöht.

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde dem Transportpuffer 200 µM Verapamil hinzugefügt. Die Konzentrationsangaben in der Literatur liegen zwischen 50 und 300 µM [Hunter et al., 1993; Lang et al., 1997; Walgren et al., 2000; Alsenz et al., 2001; Chung et al., 2001].

5.4.2.3.1 Harpagosid

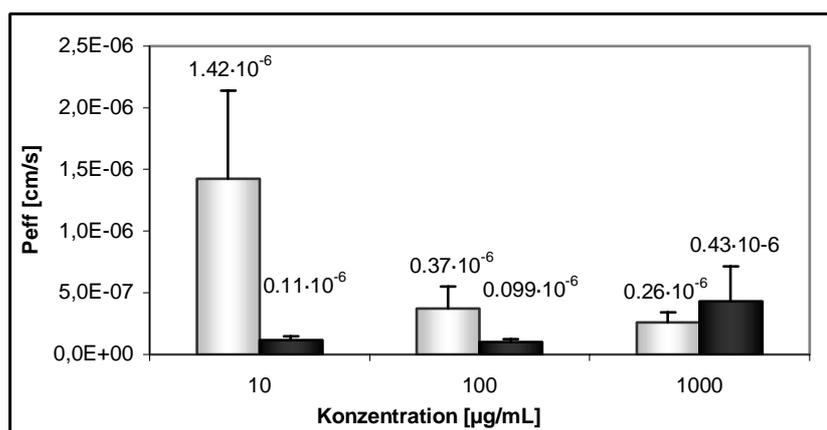


Abb. 5.4.2.3-1 Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid, mit (helle Balken) und ohne Zusatz (dunkle Balken) von Verapamil

Wie bei der Testung des Harpagosids in basolateraler zu apikaler Richtung (Kap. 5.4.2.2.1, S.173) widersprechen sich die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Harpagosids erzielt werden. Bei 1000 µg/mL Harpagosid scheint Verapamil keinen Einfluss

auf die Permeabilität zu haben; die Permeabilitätskoeffizienten mit und ohne Zusatz von Verapamil unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, während bei 10 µg/mL und 100 µg/mL der Permeabilitätskoeffizient durch den Zusatz Verapamil signifikant erhöht ist. Demzufolge stellt Harpagosid im Konzentrationsbereich unter 100 µg/mL ein P-Glykoprotein-Substrat dar. Erklärt werden könnte das damit, dass Harpagosid und Verapamil um die Bindungsstelle am P-Glykoprotein konkurrieren. Niedrige Konzentrationen von Harpagosid können Verapamil von dem P-Glykoprotein nicht verdrängen. Harpagosid kann daraufhin durch die Zelle transportiert werden. Hohe Konzentrationen von Harpagosid verdrängen Verapamil aus der Bindungsstelle. Die Verbindung wird somit aus der Zelle in den apikalen Bereich rücktransportiert; der Permeabilitätskoeffizient ist geringer als bei niedrigen Harpagosid-Konzentrationen.

Ein weiteres Kriterium, das auf eine Beteiligung des P-Glykoproteins hindeuten kann, ist ein konzentrationsunabhängiger Permeabilitätskoeffizient nach dem Zusatz eines entsprechenden Inhibitors [Hunter et al., 1993]. Das trifft für Harpagosid jedoch nicht zu, da der P_{eff} bei kleineren Substanzkonzentrationen höher ist als bei größeren.

5.4.2.3.2 8-PCHG

Auf Grund der bereits durchgeführten Untersuchungen ist es wahrscheinlich, dass 8-PCHG passiv über die Zellmembran transportiert wird. Um trotzdem die Beteiligung eines P-Glykoproteins auszuschließen, wurde 8-PCHG ebenfalls in dieser Testreihe untersucht.

Die hier erzielten Ergebnisse (Abb. 5.4.2.3-2, S.179) widersprechen jedoch zum Teil den bisherigen Annahmen (Kap. 5.4.2.1.2, S.168; Kap. 5.4.2.2.2, S.174). Wie bei Harpagosid beeinflusst Verapamil den Transport bei 1000 µg/mL und 100 µg/mL 8-PCHG nicht, während der Transport bei 10 µg/mL erhöht wird. Das bedeutet, dass in höheren Konzentrationen 8-PCHG kein P-Glykoprotein-Substrat darstellt und bestätigt somit die bereits ermittelten Ergebnisse. Mit sinkender Konzentration an 8-PCHG nimmt jedoch der Einfluss des Verapamils auf die Permeabilität des 8-PCHGs zu, d.h. geringe 8-PCHG-Konzentrationen weisen eine Affinität zu dem P-Glykoprotein auf. Demnach hätten jedoch auch geringe 8-PCHG-Konzentrationen von der apikalen zu der basolateralen Seite ohne Verapamil-Zusatz einen geringeren Permeabilitätskoeffizienten aufweisen müssen als höhere. Das trifft jedoch nicht zu. Wie in Abbildung 5.4.2.1-2 (S.169) und Abb. 5.4.2.2-2 (S.174) gezeigt, verändert sich der P_{eff} in einem Bereich von 10 µg/mL bis 1000 µg/mL nicht wesentlich.

Wie bei Harpagosid besteht auch hier die Möglichkeit, dass eine hohe 8-PCHG-Konzentration Verapamil von dem P-Glykoprotein verdrängt, während geringe Konzentrationen keine Auswirkung auf diese Bindung zeigen.

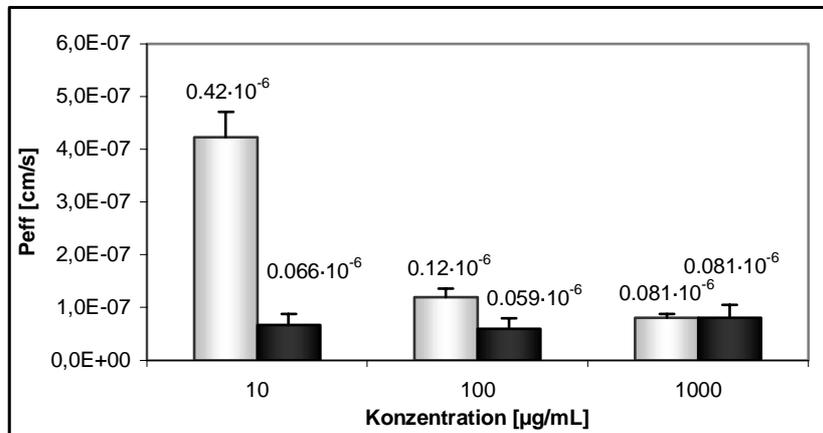


Abb. 5.4.2.3-2 Permeabilitätskoeffizienten von 8-PCHG, mit (helle Balken) und ohne Zusatz (dunkle Balken) von Verapamil

5.4.2.3.3 Pagosid

Obwohl die Beteiligung des P-Glykoproteins an Hand der bereits durchgeführten Ergebnisse unwahrscheinlich ist, wurde Pagosid zur Bestätigung dieser Ergebnisse in dieser Testreihe mit aufgenommen.

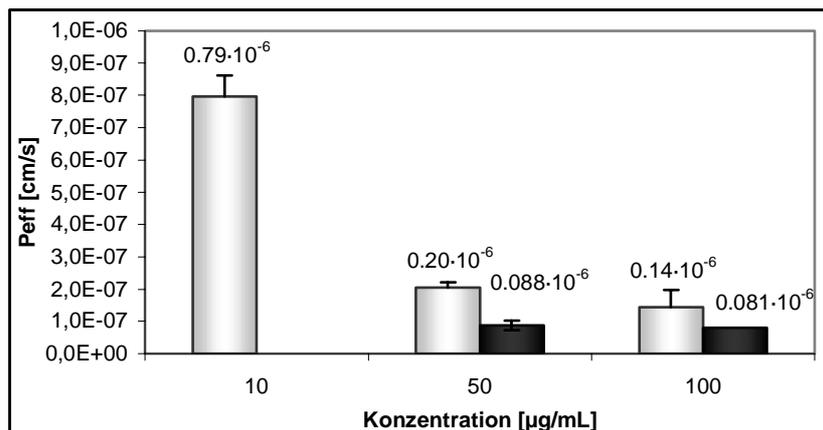


Abb. 5.4.2.3-3 Permeabilitätskoeffizienten von Pagosid; mit (helle Balken) und ohne Zusatz (dunkle Balken) von Verapamil

Der Permeabilitätskoeffizient von 10 µg/mL Pagosid in „normaler“ (apikal zu basolateral) Transportrichtung konnte nicht ermittelt werden, da die Konzentrationen der aus dem

basolateralen Bereich entnommenen Proben für eine eindeutige Identifizierung im HPLC-Chromatogramm zu gering waren (Abb. 5.4.2.3-3, S.179).

Für Pagosid wird nach den bisherigen Ergebnissen entweder ein passiver oder Carrier-vermittelter Transport angenommen. Demnach dürfte der Zusatz von Verapamil keinen Einfluss auf den Permeabilitätskoeffizienten haben und dürfte sich von dem, der ohne Verapamil ermittelt worden ist, nicht wesentlich unterscheiden.

An Hand der Grafik kann man jedoch erkennen, dass wie bei Harpagosid und 8-PCHG mit sinkender Konzentration der zu testenden Verbindung das Verapamil den Transport stärker beeinflusst. Das würde bedeuten, dass Pagosid in niedriger Konzentration ein P-Glykoprotein-Substrat darstellt.

5.4.2.4 Zusatz von EDTA

Durch die obigen Untersuchungen (Kap. 5.4.2.1, S.165; Kap. 5.4.2.2, S.172) deutet sich an, dass Harpagosid und 8-PCHG auch passiv über die Kittleisten transportiert werden. Eine Möglichkeit, den paracellulären Transport von Substanzen zu untersuchen, besteht in der Öffnung der Kittleisten durch den Entzug von Calcium. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch calciumfreien Transportpuffer [Tomita et al., 1994] oder den Zusatz von Calciumchelatoren wie EDTA [De Boer et al., 1991, Tomita et al., 1994, Gan et al., 1993] oder EGTA [Artursson et al., 1990] zum Transportpuffer der TEER sinkt und die Permeabilität paracellulär transportierter Verbindungen steigt. Die Permeabilität transcellulär transportierter Substanzen wird durch die Öffnung der Kittleisten nicht beeinflusst [Artursson et al., 1990, Gan et al., 1993]. Artursson et al. (1990) zeigten weiterhin durch mikroskopische Untersuchungen der Zellschicht, dass die Erhöhung der Permeabilität und das Absinken des TEER durch eine Veränderung der Tight Junctions und nicht durch eine Zellzerstörung hervorgerufen wird.

Um zu untersuchen, in wieweit die paracelluläre Route für Harpagosid und 8-PCHG eine Rolle spielt, wurde dem Transportpuffer EDTA-Na₂ in einer Konzentration von 1 mM und 2.5 mM hinzugefügt [Gan et al., 1993]. Die Experimente wurden weiterhin unter denselben Bedingungen wie die Untersuchungen des Stofftransportes von apikal zu basolateral durchgeführt. Durch den Zusatz von EDTA sank wie erwartet [De Boer et al., 1991] der TEER bei einer Konzentration von 1mM von $435 \pm 18 \Omega/\text{cm}^2$ auf $348 \pm 20 \Omega/\text{cm}^2$ und bei einer Konzentration von 2.5 mM EDTA von $386 \pm 67 \Omega/\text{cm}^2$ auf $69 \pm 21 \Omega/\text{cm}^2$. Mit dem

Zusatz von EDTA sinkt nicht nur konzentrationsabhängig der TEER-Wert. Die Permeabilität der zu testenden Substanzen (Harpagosid, 8-PCHG) wird ebenfalls deutlich erhöht, wie man an Hand der Abbildungen 5.4.2.4-1 (S.181) und 5.4.2.4-2 (S.182) sehen kann.

Der paracelluläre Transport von Pagosid konnte auf Grund von Substanzmangel im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

5.4.2.4.1 Harpagosid

In diesem Experiment wurde Harpagosid in einer Konzentration von 100 µg/mL untersucht.

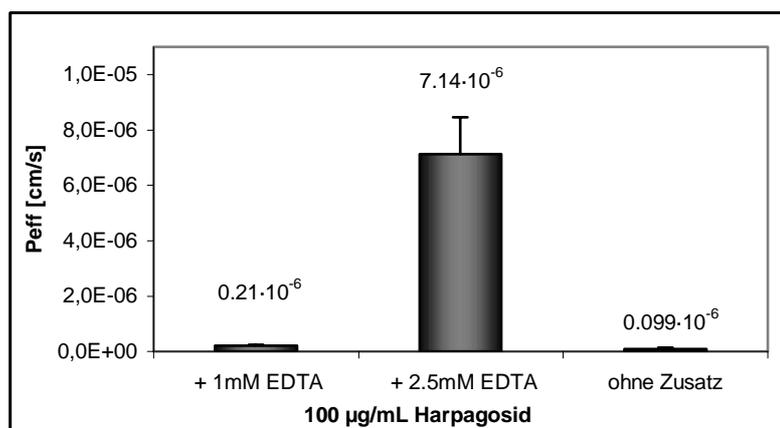


Abb. 5.4.2.4-1 Permeabilitätskoeffizienten von Harpagosid (mit und ohne Zusatz von EDTA); Signifikanzangaben beziehen sich auf den P_{eff} ohne Zusatz

Durch den Zusatz von 2.5 mM EDTA konnte die Permeabilität von Harpagosid um das 70fache gesteigert werden. Eine EDTA-Konzentration von 1mM zeigte wie oben bereits erwähnt eine geringere, aber signifikante Auswirkung auf die Tight Junctions und damit auf die Permeabilität. Eine grafische Darstellung ist in der Abbildung 5.4.2.4-1 gegeben. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Testung mit dem HBSS-Puffer ohne Zusatz. Die Erhöhung des Permeabilitätskoeffizienten durch den Zusatz von EDTA weist daraufhin, dass Harpagosid über die Kittleisten, d.h. paracellulär passiv, transportiert wird. Der passive Transportmechanismus deutete sich schon durch die Konzentrations- (Kap. 5.4.2.1.1, S.166) und teilweise auch die Richtungsunabhängigkeit (Kap. 5.4.2.2.1, S.173) des Permeabilitätsquotienten an.

Das bedeutet, dass Harpagosid hauptsächlich über den paracellulären Weg in das basolaterale Kompartiment transportiert wird. Wie in Kapitel 5.4.2.3.1 (S.177) beschrieben, kann Harpagosid auch transcellulär über die Epithelschicht resorbiert werden. Dieser Weg wird jedoch durch die Aktivität eines P-Glykoproteins eingeschränkt.

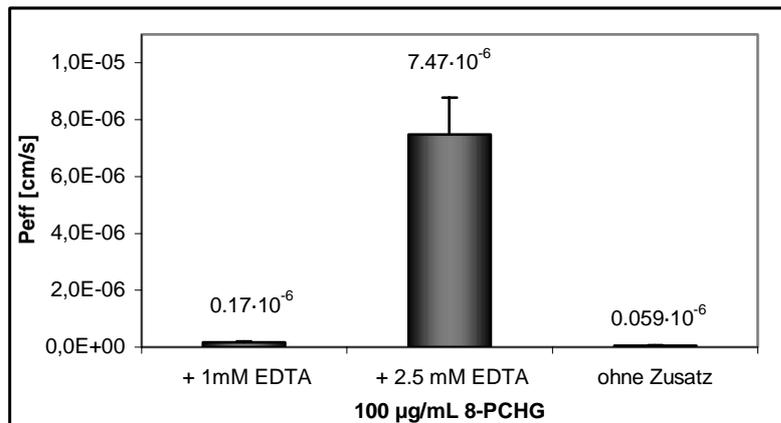
5.4.2.4.2 8-PCHG

Abb. 5.4.2.4-1 Permeabilitätskoeffizienten von 8-PCHG, mit und ohne Zusatz von EDTA; Signifikanzangabe beziehen sich auf den P_{eff} ohne Zusatz

Wie bei Harpagosid konnte die Permeabilität des 8-PCHGs durch einen Zusatz von 2.5 mM EDTA erheblich gesteigert werden. Demnach wird auch diese Verbindungen passiv paracellulär über den Caco-2-Monolayer transportiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung stimmt mit denen der vorherigen Untersuchungen überein. Der Permeabilitätskoeffizient zeigt weder eine Konzentrations- (Kap. 5.4.2.1.2, S.168) noch eine Richtungsabhängigkeit (Kap. 5.4.2.2.2, S.174). Der transcelluläre Transport von 8-PCHG wird wie in Kapitel 5.4.2.3.2 (S.178) gezeigt durch die Aktivität eines P-Glykoproteins eingeschränkt.

5.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Mit Hilfe der Caco-2-Zellen wurde die Absorption von Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid und Zimtsäure untersucht. Auf Grund der Instabilitäten der Phenylethanoide wurden deren Permeabilitäten in diesem System nicht bestimmt.

Die Reinsubstanzen wurden häufig als Gemisch getestet. Diese Möglichkeit schlugen Tannergren et al. (2001) zur Erhöhung der Durchsatzrate vor. Dabei muss nur beachtet werden, dass die Verbindungen nicht miteinander reagieren und sich nicht bezüglich des Transportes beeinflussen. Zwischen dem Transport von Harpagosid als Reinsubstanz und in einem Substanzgemisch konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

Harpagosid wird nur in geringem Maße über die Caco-2-Zellschicht transportiert. Der ermittelte Permeabilitätskoeffizient liegt in derselben Größenordnung wie FITC-Dextran, eine

Verbindung mit einer geringen Permeabilität. Weitere Inhaltsstoffe des Extraktes beeinflussen dabei den P_{eff} -Wert von Harpagosid nicht. Die Koeffizienten des isolierten Harpagosids und der Verbindung im Extrakt lagen in derselben Größenordnung.

An Hand der hier durchgeführten Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass Harpagosid passiv paracellulär über die Poren der Kittleisten transportiert wird. Die Permeabilität der Verbindung ist konzentrationsunabhängig und kann durch die Öffnung der Tight Junctions mit EDTA signifikant gesteigert werden. Widersprüchliche Ergebnisse lieferten jedoch die Untersuchung des umgekehrten (basolateral zu apikal) und des durch Verapamil beeinflussten Transportes. In höherer Konzentration (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zeigen die Permeabilitätskoeffizienten beider Experimente keinen signifikanten Unterschied zu dem der normalen (apikalen zu basolateralen) Transportrichtung, wodurch zunächst wiederum die Annahme eines passiven Transportmechanismus unterstützt wird. In geringeren Konzentrationen (10 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) war die Permeabilität sowohl in umgekehrter Richtung als auch durch Verapamil Zusatz signifikant größer. Das weist daraufhin, dass P-Glykoprotein den Transport von Harpagosid beeinflusst [Pade et al., 1998]. Vermutlich verdrängen höhere Harpagosid-Konzentrationen Verapamil von dem P-Glykoprotein, infolge dessen die Verbindung wieder in den apikalen Raum rücktransportiert wird. Niedrigere Konzentrationen können die Bindung von Verapamil an das P-Glykoprotein nicht beeinflussen. Unter diesen Umständen kann Harpagosid durch die Zelle in das basolaterale Kompartiment gelangen.

Betrachtet man den niedrigen Permeabilitätskoeffizienten des Harpagosids, so wäre sowohl der paracelluläre als auch ein P-Glykoprotein Transport wahrscheinlich. Bei verschiedenen Untersuchungen von Arzneistoffen weisen paracellulär transportierte Verbindungen [Artursson et al., 1991; Pade et al., 1998; Pade et al., 1997] und P-Glykoprotein-Substrate [Pade et al., 1998; Yee, 1997] einen niedrigeren Permeabilitätskoeffizienten im Caco-2-Zellkultursystem auf.

Untersuchungen der Abhängigkeit des Absorptionsweges von der Lipophilie [Artursson, 1990; Artursson et al., 1996] der Verbindung zeigen, dass hydrophile Verbindungen den Weg über die Kittleisten bevorzugen. P-Glykoprotein-Substrate müssen jedoch erst die apikale Zellmembran durchdringen, ehe sie mittels dieses Efflux-Systemes wieder hinaus transportiert werden. Die Zellmembran kann jedoch besser von lipophileren Verbindungen passiert werden. Harpagosid ist eine hydrophile Substanz mit einem Molekulargewicht von 494. Auf Grund dessen ist es wahrscheinlicher, dass Harpagosid hauptsächlich auf dem paracellulären Weg transportiert wird. An Hand der hier durchgeführten Untersuchungen ist jedoch auch eine Beteiligung des P-Glykoproteins denkbar.

Über die Absorption *in vivo* können mit Hilfe von Literaturdaten Vermutungen angestellt werden. Verbindungen mit einem kleinen Permeabilitätskoeffizienten weisen im allgemeinen auch eine geringe Absorption *in vivo* auf [Yee, 1997; Artursson et al., 1991]. Eine Korrelation zwischen dem P_{eff} und der humanen Absorption ist in Tabelle 5.1-1 (S.149) gegeben. An Hand dieser Korrelation dürfte Harpagosid fast nicht resorbiert werden. Jedoch weicht diese Korrelation bei Substanzen ab, die paracellulär oder über das P-Glykoprotein rücktransportiert werden. Die Porengröße der Kittleisten der Caco-2-Zellen ist geringer als in den Dünndarmepithelzellen [Artursson et al., 1991]. Das bedeutet, dass Verbindungen, die diesen Transportweg nutzen, im Caco-2-Modell eine geringere Permeabilität aufweisen als sie im Dünndarmepithel hätten. Weiterhin überexprimieren Krebszellen, wie z.B. die Caco-2-Zellen, das P-Glykoprotein. Substanzen, dessen Permeabilitätskoeffizient im Caco-2-Modell auf Grund der Affinität zum P-Glykoprotein sehr niedrig ist, werden *in vivo* eine höhere Permeabilität aufweisen.

Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass die Resorption von Harpagosid größer ist, als durch das Caco-2-Modell gezeigt wird. Eine geringe Resorption konnte bereits durch Bioverfügbarkeitsstudien von Loew et al. (1996) und Chrubasik (1997) bestätigt werden. Ob die aufgenommene Harpagosidmenge jedoch für eine Wirkung ausreicht, ist fraglich. Möglich ist weiterhin, dass Harpagosid ein Prodrug darstellt und Metabolisierungsprodukte für die Wirkung verantwortlich sind. In diesem System konnte eine Metabolisierung des Harpagosids nicht beobachtet werden. Um diese Fragestellung zu überprüfen, müssen andere, vor allem *in vivo* Testsysteme verwendet werden. Dort wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, inwieweit die Bakterienflora, die Mukusschicht und die Darmmotilität die Metabolisierung und den Transport von Harpagosid beeinflussen.

Der Permeabilitätskoeffizient des 8-PCHGs war noch geringer als der des Harpagosids. Wie Pade et al. (1997) und Camenish et al. (1998) zeigen, sinkt die Permeabilität paracellulär und transcellulär transportierter Verbindungen mit steigendem Molekulargewicht und größerer Polarität. Infolge der zusätzlichen Hydroxylgruppe im aromatischen Rest weist 8-PCHG ein geringfügig größeres Molekulargewicht und eine höhere Polarität als Harpagosid auf. Das könnte für die geringere Permeabilität verantwortlich sein.

Die Ergebnisse der weiteren Experimente ähneln denen des Harpagosids. Die Konzentrations- und Richtungsunabhängigkeit des Transportes weist auf einen passiven Mechanismus hin. Die Permeabilitätserhöhung durch die Öffnung der Tight Junctions mit EDTA bestätigen diese Annahme.

Durch einen Zusatz von Verapamil wird nur die Permeabilität geringer 8-PCHG-Konzentrationen (10 µg/mL und 100 µg/mL) signifikant erhöht. Bei einer hohen Konzentration (1000 µg/mL) unterscheiden sich die P_{eff} -Werte mit und ohne Verapamil Zusatz nicht signifikant voneinander. Auch 8-PCHG scheint in hoher Konzentration Verapamil von dem Transporter zu verdrängen.

An Hand der hier durchgeführten Untersuchungen wird ersichtlich, dass 8-PCHG wie auch Harpagosid hauptsächlich über den passiv paracellulären Weg in das basolaterale Kompartiment gelangt. Der transcelluläre Transport wird durch die Aktivität eines P-Glykoproteins eingeschränkt.

Der Permeabilitätskoeffizient des Pagosids liegt in derselben Größenordnung wie der des 8-PCHGs. Infolge widersprüchlicher Ergebnisse gestaltet sich die Einordnung des Transportmechanismus schwierig. Die Konzentrationsunabhängigkeit des P_{eff} in einem Konzentrationsbereich von 50 µg/mL bis 1000 µg/mL weist auf einen passiven Transport hin. Die höhere Permeabilität der Verbindung in „normaler“ (apikal zu basolateral) im Vergleich zur „umgekehrten“ Richtung (basolateral zu apikal) deutet auf einen Carrier-vermittelten Transport [Yee, 1997] hin. Die Unterschiede im P_{eff} sind jedoch nur für höhere Konzentrationen (100 µg/mL und 1000 µg/mL) signifikant. Bei geringerer Konzentration (50 µg/mL) liegen die Permeabilitätskoeffizienten in derselben Größenordnung, was die Annahme eines passiven Mechanismus unterstützt. Es ist jedoch ungewöhnlich, dass aktiv transportierte Verbindungen einen so niedrigen P_{eff} aufweisen. Yee (1997) zeigte an Hand seiner Untersuchungen, dass solche Substanzen einen großen P_{eff} -Wert aufweisen ($30.67 - 80 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Durch den Zusatz von Verapamil erhöht sich wie bei Harpagosid und 8-PCHG nur der P_{eff} bei geringer Pagosid-Konzentration, was wieder auf eine Beteiligung des P-Glykoproteins schließen lässt. Wie bereits oben erwähnt wurden die Verbindungen (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) im Gemisch getestet. Es wäre demnach möglich, dass Harpagosid und 8-PCHG eine höhere Affinität zum P-Glykoprotein aufweisen als Pagosid. In „normaler“ Richtung würde das den Transport erhöhen, da das Efflux-System ausgelastet wäre und Pagosid nicht rücktransportiert werden könnte. Der Transport in „umgekehrter“ Richtung wäre gegenüber dem „normalen“ Transport erniedrigt, da das P-Glykoprotein die anderen beiden Verbindungen befördert. Eine Beschleunigung des Transportes von basolateral zu apikal wäre somit nicht zu erwarten.

Wie bei Harpagosid lässt sich auf Grund des kleinen Permeabilitätskoeffizienten für 8-PCHG und Pagosid eine geringe Resorbierbarkeit *in vivo* vermuten.

Zimtsäure zeigt von den hier getesteten Verbindungen aus dem Extrakt von Harpagophyti radix den größten Permeabilitätskoeffizienten. Dieser Wert befindet sich in derselben Größenordnung wie Propranolol, dass sowohl im Caco-2-Zellsystem als auch *in vivo* eine hohe Permeabilität aufweist [Pade et al., 1998]. Demnach ist zu vermuten, dass auch Zimtsäure eine hohe Resorption *in vivo* aufweist.

Die Konzentrationsunabhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten von Zimtsäure in einem Bereich von 0.2 µg/mL bis 800 µg/mL weist auf einen passiven Transport hin. Der hohe P_{eff} -Wert würde einen passiven Mechanismus unterstützen, wenn Zimtsäure bei dem verwendeten pH-Wert von 7.5 zum größten Teil undissoziiert vorliegt. In dieser Form würde die Verbindung bevorzugt über transcellulär transportiert werden. Die signifikant größeren Koeffizienten in der apikalen zu basolateralen gegenüber der basolateralen zu apikalen Richtung könnten dann durch die unterschiedlich große Oberfläche der apikalen und basolateralen Membran erklärt werden. Liegt die Zimtsäure jedoch dissoziiert vor, wäre sie zu hydrophil für eine Permeation durch die Zellmembran. Der hohe Permeabilitätskoeffizient wäre dann nur wahrscheinlich durch den Transport mittels eines aktiven Carriers. In diesem Fall könnte der P_{eff} -Unterschied zwischen dem Transport in normaler und umgekehrter Richtung durch einen aktiven Mechanismus erklärt werden. Die Konzentrationsunabhängigkeit über einen weiten Bereich spricht allerdings gegen einen aktiven Transport.

Der passiv paracelluläre Weg ist sowohl für die undissoziierte Zimtsäure auf Grund der hohen Lipophilie als auch für die dissoziierte, anionische Form nicht denkbar. Untersuchungen haben gezeigt, dass der paracelluläre Weg kationenselektiv ist. Auf Grund der geringen Oberfläche der Tight Junctions gegenüber der Zellmembran [Artursson, 1990] weisen paracellulär transportierte Verbindungen außerdem einen geringeren P_{eff} auf als transcellulär transportierte.

Auf Grund der obigen Ausführungen und mittels eines Vergleiches mit Transportmechanismen von Verbindungen, die einen ähnlichen P_{eff} und ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen, ist der passiv transcelluläre Weg am wahrscheinlichsten. Weitere Experimente wurden somit nicht durchgeführt.

6 Untersuchungen zur antiinflammatorischen und spasmolytischen Aktivität von *Harpagophytum procumbens*

Wie bereits in Kapitel 4 (S.122) beschrieben wird *Harpagophytum procumbens* zur unterstützenden Therapie bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkapparates eingesetzt. Die Wirksamkeit konnte in verschiedenen Anwendungsbeobachtungen, experimentellen und klinischen Studien bestätigt werden. Der Wirkmechanismus des Extraktes konnte bisher jedoch noch nicht ausreichend geklärt werden.

Die Hemmung der Elastase-Aktivität als ein Aspekt der antirheumatischen Wirksamkeit, wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit untersucht (Kap. 4, S.122). Ein weiteres antirheumatisches Wirkprinzip besteht in der Hemmung der Arachidonsäurekaskade, die in Kapitel 1.2.2 (S.25) näher beschrieben wurde. Diese Kaskade, d.h. die Produktion von Entzündungsmediatoren kann unter anderem durch die Hemmung der Cyclooxygenase, Lipoxygenase oder Phospholipase A₂ unterbunden werden. Whitehouse et al. (1983) und Moussard et al. [1992 zit. in Wegener, 1998] konnten keine Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch den Extrakt von *Harpagophytum procumbens* feststellen. Tippler et al. (1996) zeigten jedoch, dass sowohl ein *Harpagophyti radix*-Extrakt als auch Harpagosid die Aktivität der Lipoxygenase und der Cyclooxygenase hemmen. Dabei zeigte der Extrakt eine ausgeprägtere hemmende Wirkung als Harpagosid. Daraus lässt sich schließen, dass Harpagosid nicht alleine für die Wirkung des Extraktes verantwortlich ist.

Wie bei der Hemmung der Lipoxy- und Cyclooxygenase-Aktivität widersprechen sich auch die Ergebnisse bezüglich der spasmolytischen Aktivität des *Harpagophyti radix*-Extraktes. Am Meerschweinchenileum konnte Harpagosid die durch Papaverin induzierten Spasmen nicht aufheben [Eichler und Koch, 1970]. Bei Untersuchungen, die Occhiuto et al. (1985) durchführten, konnten sowohl ein methanolischer Extrakt als auch Harpagosid den durch Acetylcholin oder Bariumchlorid erhöhten Muskeltonus senken. Harpagid dagegen zeigte eine spasmogene Wirkung.

Auf Grund widersprüchlicher Ergebnisse in der Literatur wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Hemmung der Lipoxygenase als auch die spasmolytische Aktivität des Extraktes noch einmal untersucht.

6.1 Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels

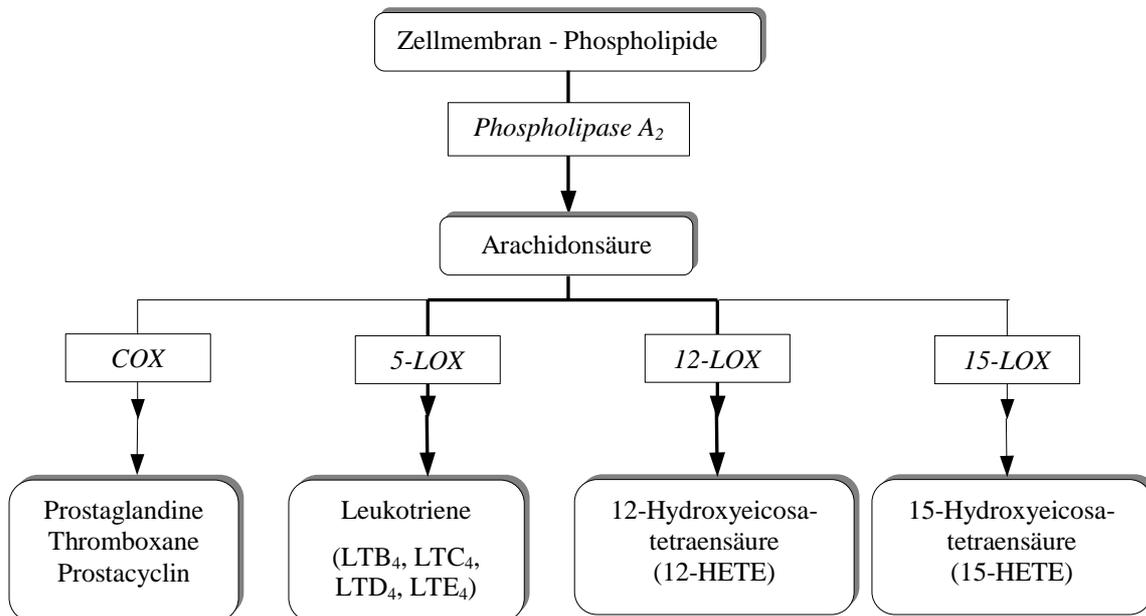


Abb. 6.1-1 Vereinfachte Darstellung der Arachidonsäurekaskade; kräftigere Linien beschreiben die in dieser Arbeit untersuchten Wege

Die Aktivierung der Arachidonsäurekaskade im rheumatischen Geschehen wird durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine aus Macrophagen als Folge einer Autoimmunreaktion eingeleitet. Diese Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , usw.) aktivieren die cytosolische Phospholipase A₂, die anschließend aus Membran-Phospholipiden die Arachidonsäure (eine mehrfach ungesättigte, langkettige Fettsäure) freisetzt. Je nach Enzymausstattung der Zellen kann die Arachidonsäure entweder über Lipoxygenasen oder über Cyclooxygenasen zu stark wirksamen Entzündungsmediatoren umgewandelt werden. Über den Cyclooxygenaseweg entstehen Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxane. Durch die Aktivität der Lipoxygenase werden unter anderem Leukotriene gebildet. Diese Mediatoren sind zum Teil mitverantwortlich für die typischen Entzündungssymptome wie Fieber, Schmerzen und Schwellungen. Im Verlauf des rheumatischen Geschehens sind Prostaglandine und Leukotriene an der Entzündung und Zerstörung des Synovialgewebes beteiligt. Es wird ein funktionsunfähiges Pannusgewebe ausgebildet, das Gelenksteifigkeit und Schmerzen hervorruft. Durch eine Hemmung der Lipoxygenasen, Cyclooxygenase oder Phospholipase A₂ könnte die Produktion aggressiver Entzündungsmediatoren eingeschränkt werden. Das würde zum einen die Schmerzen vermindern und zum anderen die Progredienz des Krankheitsverlaufes verlangsamen.

6.1.1 HEMMUNG DER PHOSPHOLIPASE A₂²

Die Hemmung des Extraktes wurde in zwei unterschiedlichen Testsystemen [Lehr, 1997] untersucht. Die Freisetzung der Arachidonsäure wurde zum einen durch Calcium-Ionophor A23187 und zum anderen durch einen Phorbolster induziert.

6.1.1.1 Induktion durch Calcium-Ionophor A23187

6.1.1.1.1 Versuchsdurchführung

Aus dem Buffy Coat menschlichen Blutes wurden durch aufeinanderfolgende Zentrifugierungsschritte die Thrombozyten isoliert. Die genaue Aufarbeitung des Blutes ist in Kapitel 9.7.1 (S.236) beschrieben. Die Zellzahl dieser Suspension wurde mit PBS auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL eingestellt.

In Zentrifugengläser wurden ETYA-Lösung (5,8,11,14-Eicosatetrainsäure), die Testlösungen bzw. Kontrolllösung und die Thrombozytensuspension vorgelegt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde Calcium-Ionophor-Lösung hinzupipettiert. Nach 1 min wurde die Enzymreaktion durch eine Inhibitorlösung (Kap. 9.7.1, S.236) gestoppt. Die Testlösung wurde zentrifugiert, über eine RP-18-Festphase aufgereinigt und anschließend mittels HPLC analysiert

ETYA ist eine Verbindung, die die in den Thrombozyten vorhandene Cyclooxygenase und 12-Lipoxygenase inhibiert. In dem Testsystem dient diese Lösung dazu, den Abbau der Arachidonsäure über diese beiden Stoffwechselwege zu verhindern. Die in den Zellen angereicherte Arachidonsäure kann anschließend mittels HPLC quantifiziert werden und dient als Maß für die Aktivität der Phospholipase A₂.

Bei dem Calcium-Ionophor A23187 handelt es sich um einen Calciumcarrier, der die intrazelluläre Konzentration an Calcium erhöht. Durch die Zugabe dieser Verbindung wird die Phospholipase A₂ aktiviert und die Enzymreaktion gestartet. Wie bereits erwähnt setzt die Phospholipase A₂ Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden frei. Wird nun ein Inhibitor der Phospholipase A₂ als Testlösung hinzugesetzt, wird weniger Arachidonsäure freigesetzt. Bezieht man diese Menge auf die Menge Arachidonsäure, die unter Zusatz einer

² Für die Testung des Extraktes auf eine Hemmung der Phospholipase-Aktivität möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Lehr und Frau Schulze Elfringhoff (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Münster) bedanken.

Negativkontrolle (DMSO) freigesetzt worden ist, so erhält man die prozentuale Inhibierung der Phospholipase A₂ durch die Testlösung.

6.1.1.1.2 Testung des Extraktes

Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 10mg/mL getestet. Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet, das hier ebenfalls als Kontrolllösung verwendet worden ist.

Es wurde eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

Für den Extrakt konnte eine Hemmung von 2.2 % ermittelt werden. Das weist daraufhin, dass der Extrakt die Aktivität der Phospholipase A₂ nicht beeinflusst.

Für die Positivkontrolle (1-[2-(4-Carboxyphenoxy)ethyl]-3-dodecanoylindol-2-carbonsäure: Lehr und Schulze Elfringhoff, 2000) konnte ein IC₅₀-Wert von 0.86 µM ermittelt werden.

6.1.1.2 **Induktion durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)**

6.1.1.2.1 Versuchsdurchführung

Dieses Experiment wurde in derselben Weise durchgeführt, wie die in Kapitel 6.1.1.1 (S.189) und 9.7.1 (S.236) beschriebene Untersuchung. Anstelle des Ca-Ionophors wurde TPA als Reaktionsstarter eingesetzt. TPA induziert die Bildung der Arachidonsäure nicht durch eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration, sondern über die Aktivierung einer Proteinkinase. Dieses Enzym startet die Reaktion durch die Phosphorylierung der Phospholipase A₂. Da die Freisetzung der Arachidonsäure mit TPA langsamer verläuft als mit dem Ca-Ionophor, wurde die Reaktionszeit von 1 min auf 10 min erhöht.

Wie in Kapitel 6.1.1.1.2 (S.190) gezeigt, inhibiert der Extrakt nicht direkt die Aktivität der cytosolischen Phospholipase A₂. Die Arachidonsäurekaskade kann jedoch auch über die Hemmung der Proteinkinase inhibiert werden. Dies soll im Folgenden nachgewiesen werden.

6.1.1.2.2 Testung des Extraktes

Der Extrakt wurde in diesem Experiment in den Konzentrationen 10.7 mg/mL und 1.3 mg/mL eingesetzt. Als Lösungsmittel und Kontrolllösung wurde erneut DMSO verwendet.

Auch über eine Beeinflussung der Proteinkinase kann der Extrakt die Arachidonsäurekaskade nicht hemmen. In einer Konzentration von 10 mg/mL konnte eine Hemmung von 8.8 % und für 1 mg/mL eine Hemmung von 9.9 % ermittelt werden.

Die Positivkontrolle (1-[2-(4-Carboxyphenoxy)ethyl]-3-dodecanoylindol-2-carbonsäure: Lehr und Schulze Elfringhoff, 2000) inhibierte die Aktivität des Enzyms bei einer Konzentration von 3.3 µM um 88.68 %.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Harpagophyti radix-Extrakt *in vitro* die Aktivität der Phospholipase A₂ nicht inhibieren kann.

6.1.2 HEMMUNG DER LIPOXYGENASEN³

Die Lipoxygenasen bauen die Arachidonsäure regio- und stereospezifisch zu Hydroperoxyfettsäuren mit konjugierter Dienstruktur um. Je nachdem an welcher Position (5, 12, 15) der Arachidonsäure die Sauerstofffunktion eingebaut wird, wird die entsprechende Lipoxygenase als 5-Lipoxygenase (5-LOX), 12-Lipoxygenase (12-LOX) und 15-Lipoxygenase (15-LOX) bezeichnet. Die Hydroperoxyfettsäuren werden weiter in mehreren Schritten zu Entzündungsmediatoren wie Leukotrienen und Hydroxyeicosatetraensäuren umgesetzt.

Für die Umsetzungsprodukte der 5-Lipoxygenase als auch für die der 12-Lipoxygenase ist es bekannt, dass sie an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Sie wirken z.B. chemotaktisch auf Leukozyten und Makrophagen. Die Bedeutung der in der Position 15 oxidierten Derivate ist noch nicht geklärt [Mutschler, 2001]. Aus diesem Grund wurde die Inhibierung der 5- und der 12-Lipoxygenase durch den Extrakt untersucht.

6.1.2.1 5-Lipoxygenase

6.1.2.1.1 Versuchsdurchführung im intakten Zellsystem

Das Lipoxygenase-Testsystem wurde nach der Methode von Leukel (1994) durchgeführt. Die exakte Versuchsbeschreibung erfolgt in Kapitel 9.7.2.1 (S.238).

Die Gerinnbarkeit des frisch gewonnenen Blutes wurde durch eine EDTA-Lösung verhindert. Daraus wurden anschließend mittels Zentrifugation neutrophile Granulozyten isoliert. Es

³ Ich möchte mich bei Professor Dr. Wiegrebe, seinem Arbeitskreis und insbesondere bei Herrn Ziereis für die großartige Hilfestellung, Diskussionsbereitschaft und für die freundliche, vorübergehende „Aufnahme“ in den Arbeitskreis bedanken.

wurde eine Granulozytensuspension mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL eingestellt. In Zentrifugengläser wurden die Granulozytensuspension und die Test- bzw. Kontrolllösungen vorgelegt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe der Calciumchlorid- und Calcium-Ionophorlösung gestartet. Wie bei der Phospholipase wird die Lipoxygenase durch eine erhöhte intracelluläre Calciumkonzentration aktiviert. Die Calcium-Ionophorlösung dient dabei wieder als Calciumcarrier. Nach einer Inkubation von 5 min im Wasserbad bei 37°C wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe einer Inhibitorlösung (Kap. 9.7.2.1, S.238) abgestoppt. Nach Zentrifugation und Aufreinigung der Proben über RP-18-Säulen (Baker-Bond-Säulen), wurden die Lösungen mittels HPLC/UV-Detektion und PGB₂ als internem Standard quantifiziert. Die Hemmung der 5-Lipoxygenase wurde dabei über die Fläche des Lipoxygenasemetaboliten Leukotrien B₄ (LTB₄) bestimmt.

6.1.2.1.2 Testung im intakten Zellsystem

In dem Testsystem wurde die Inhibierung der 5-Lipoxygenase-Aktivität durch den Extrakt (0.1 mg/mL) und durch Harpagosid (100, 50, 10 µM) untersucht. Alle Werte wurden dreifach bestimmt.

In den eingesetzten Konzentrationen konnte weder der Extrakt noch Harpagosid die Aktivität der 5-Lipoxygenase beeinflussen. Die Konzentration an LTB₄ war nach Zusatz der Testverbindungen sogar minimal größer als nach der Zugabe des reinen Lösungsmittels. Da es sich hier um ein biologisches Testsystem mit bekanntlich größerer Schwankungsbreite handelt, kann die erhöhte LTB₄-Konzentration nicht als eine Aktivierung des Enzyms durch die Verbindungen gedeutet werden.

Prozentuale „Hemmung“ der Lipoxygenase:

Extrakt (0.1 mg/mL)	Harpagosid (100 µM)	Harpagosid (50 µM)	Harpagosid (10 µM)
- 3 %	- 6 %	- 3 %	- 7 %

Für NDGA (Nordihydroguaiaretsäure), ein 5-Lipoxygenase-Inhibitor (Leukel, 1994), konnte in diesem Testsystem ein IC₅₀-Wert von 0.5 µM ermittelt werden.

6.1.2.1.3 Versuchsdurchführung im zerstörten Zellsystem

Die Inhibierung der Lipoxygenase im intakten Zellsystem ist von der Permeation der Verbindungen durch die Zellmembran abhängig. Falls diese zu hydrophil sind, um in den Granulozyten hinein transportiert zu werden, können sie die Lipoxygenase auch nicht beeinflussen.

Um das zu überprüfen, wurde die eingestellte Granulozytensuspension für 90 s dem Ultraschallbad ausgesetzt. Dadurch werden die Zellen, nicht aber die 5-Lipoxygenase zerstört [Leukel, 1994]. Da auf diese Weise kein intaktes Zellsystem mehr vorhanden ist, muss auch kein Calcium-Ionophor als Carrier eingesetzt werden. Das Enzym wird durch die Calciumchlorid-Lösung aktiviert.

6.1.2.1.4 Testung im zerstörten Zellsystem

Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 0.1 mg/mL getestet.

Im zerstörten Zellsystem konnte für den Extrakt eine schwache, inhibierende Wirkung auf die 5-Lipoxygenase ermittelt werden. Die prozentuale Hemmung lag bei 22 %.

6.1.2.2 **12-Lipoxygenase aus Thrombozyten**

6.1.2.2.1 Versuchsdurchführung

Die inhibierende Wirkung des Extraktes auf die 12-Lipoxygenase wurde im intakten Zellsystem untersucht. Dazu wurden aus ungerinnbar gemachtem Rinderblut die Thrombozyten isoliert (Kap. 9.7.2.2, S.241). Es wurde eine Suspension mit $5 \cdot 10^7$ Thrombozyten/mL hergestellt. Diese Suspension wurde in Zentrifugengläser vorgelegt. Es wurden nacheinander in festgesetzten Zeitabständen die Test-/Kontrollösungen, Arachidonsäurelösung und Calciumchloridlösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Calcium-Ionophorlösung gestartet. Gestoppt wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe der Inhibitorlösung nach 5 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C.

Da in den Thrombozyten für eine ausreichende Konzentration an Metaboliten nicht genügend Arachidonsäure zur Verfügung steht, muss diesem Testsystem Arachidonsäure hinzugefügt werden.

6.1.2.2.2 Testung des Extraktes

Der Extrakt wurde in den Konzentrationen 100, 50 und 10 µg/mL getestet.

Wie bei der 5-Lipoxygenase konnte der Extrakt die Aktivität der 12-Lipoxygenase nicht hemmen. Es konnte wiederum nur eine leicht erhöhte Aktivität des Enzyms festgestellt werden.

Prozentuale „Hemmung“ der 12-Lipoxygenase in Thrombozyten:

Extrakt (100 µg/mL)	Extrakt (50 µg/mL)	Extrakt (10 µg/mL)
- 6 %	- 11 %	- 12 %

6.1.2.3 12-Lipoxygenase aus Mäusehautepidermis

Das Vorkommen der 12-Lipoxygenase ist nicht nur auf die Thrombozyten beschränkt. Sie konnte auch in der Epidermis, in polymorphkernigen Leukozyten, in Lymphozyten und im Lungengewebe nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels Inhibitoren zeigten, dass es sich bei der epidermalen und der in Thrombozyten vorkommenden 12-Lipoxygenase um Isoenzyme handelt. Das bedeutet, dass Verbindungen, die die 12-Lipoxygenase aus Thrombozyten nicht inhibieren, durchaus die Aktivität der epidermalen 12-Lipoxygenase vermindern könnten [Gawlik, 1996]. Eine Inhibierung dieses Isoenzym würde darauf hindeuten, dass der Extrakt auch topisch eine antientzündliche Wirkung ausüben könnte.

6.1.2.3.1 Versuchsdurchführung

Die Durchführung der Testung erfolgte nach Gawlik (1996).

Für die Testung wurde die Epidermis von NMRI-Mäusen verwendet. 2 Tage vor der Testung wurde der Rücken der Tiere rasiert. Sie wurden am Testtag durch Genickluxation getötet. Die Haut wurde vorsichtig entfernt, gereinigt und im eisgekühlten Puffer mittels eines Ultraturrax homogenisiert. Diese Suspension wurde mit der Testlösung, Calciumchlorid-Lösung, Arachidonsäurelösung und Calcium-Ionophorlösung versetzt. Nach 25 min (5 min Inkubationszeit) wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe der Inhibitorlösung abgestoppt.

Zur Ermittlung der prozentualen Hemmung der 12-Lipoxygenase wurde die Konzentration des Reaktionsproduktes 12-HETE mittels HPLC in der Testlösung und in der Kontrolllösung bestimmt. Da die Mäuseepidermis auch nativ 12-HETE bildet, musste ein Korrekturwert bestimmt werden. Er wurde durch die sofortige Zugabe der Inhibitorlösung nach dem Erwärmen auf 37°C ermittelt. Dieser Wert ist notwendig, da nur das während der Inkubation entstehende 12-HETE gehemmt werden kann.

6.1.2.3.2 Testung des Extraktes

Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL eingesetzt.

Auch in diesem Testsystem zeigte der Extrakt keine inhibierende Wirkung auf das Enzym. Es war wiederum eine schwache Steigerung der Enzymaktivität um 21 % erkennbar.

Der IC₅₀-Wert für Dithranol (Positivkontrolle, Gawlik, 1996) betrug in diesem Testsystem 9 µM.

6.2 HETCAM-Test⁴

Da Pagosid eine neue Verbindung im Pflanzenreich ist (Kap.3.1.5, S.82) und ähnliche Strukturen außer Harpagogenin [Vanhaelen et al., 1981] nicht bekannt sind, bestand ein großes Interesse, in der Untersuchung der antiinflammatorischen Wirkung dieser Verbindung. Da für eine einzige Verbindung eine tierexperimentelle Studie einen zu großen Aufwand darstellt, wurde nach einem Testsystem gesucht, mit dem nicht nur ein Aspekt der antientzündlichen Wirkung überprüft, sondern mit dem insgesamt die antiinflammatorische Wirkung einer Substanz aufgezeigt werden kann.

Diese Art von Testsystem stellt der HET-CAM-Test (Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test) dar. Die Untersuchungen werden an der Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereis durchgeführt.

Das Testpellet wurde nach Dobson et al. (1990) [zit. in Marchesan et al., 1998] hergestellt. Die Durchführung der Testung erfolgte nach D'Arcy und Howard (1967) [zit. in Marchesan et al., 1998].

6.2.1 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Vor der Zugabe der Testverbindungen werden die befruchteten Hühnereier 70 h bei 37 °C und 80 %iger Luftfeuchtigkeit unter mehrmaligem Drehen inkubiert. Auf der stumpfen Seite des Eies wurde sowohl die Eierschale als auch die Luftsackmembran vorsichtig entfernt. Die Inkubation wurde für weitere 75 h fortgeführt. Anschließend wurde auf die gebildete Chorioallantoismembran ein Testpellet (Natriumlaurylsulfat mit oder ohne Testverbindung in Agaroselösung) gelegt. Durch das Natriumlaurylsulfat wird auf der Membran eine

⁴ Für die Testung dieser Verbindung im HET-CAM-Test möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Paper (Regensburg) bedanken.

Entzündung ausgelöst, die sich durch eine sternförmige Vascularisierung im Pelletbereich bemerkbar macht.

Eine antiinflammatorische Wirkung der Testsubstanzen wird durch eine Verringerung der Membranirritation, d.h. durch Normalisierung des auf der CAM gebildeten Adernetzes gezeigt. Die Eier, die einen positiven Effekt aufweisen, werden in Prozent angegeben und stehen als Maß für die antientzündliche Wirkung.

Eine genauere Versuchsbeschreibung wird in Kapitel 9.7.3 (S.243) gegeben.

6.2.2 TESTUNG VON PAGOSID

Pagosid wurde in den Konzentrationen 40 µg/Pellet und 100 µg/Pellet in dem Testsystem eingesetzt. Als Positivkontrolle mit guter antientzündlicher Wirkung wurde Hydrocortison (50 µg/Pellet) mitgeführt.

Bei 40 µg Pagosid /Pellet konnte eine Hemmung der Entzündung von 49 % (± 2.8 %), bei 100µg/Pellet konnte eine Hemmung von 44 % (± 8.5 %) erreicht werden.

Hydrocortison zeigte eine Inhibition von 84 % (± 5.5 %).

Demnach weist Pagosid weder eine ausgeprägte, noch eine konzentrationsabhängige entzündungshemmende Eigenschaft auf. Von den Embryonen wurde die Verbindung ansonsten gut vertragen.

6.3 Spasmolytische Aktivität⁵

Wie oben bereits erwähnt widersprechen sich zum Teil die Ergebnisse bezüglich der spasmolytischen Aktivität von *Harpagophytum procumbens*. Eichler und Koch (1970) konnten nach dem Zusatz von Harpagosid am isolierten Meerschweinchendarm keine Verminderung der durch Histamindihydrochlorid, Bariumchlorid und Acetylcholin ausgelösten Kontraktionen ermitteln. Im Gegensatz dazu zeigte Harpagosid in den Untersuchungen von Occhiuto et al. (1985) und Fontaine et al. (1981) eine spasmolytische Aktivität. Auch der Extrakt konnte im Rahmen dieser Versuche die ausgelösten Kontraktionen vermindern. Beide Arbeitsgruppen wiesen für Harpagid eine spasmogene Wirkung auf verschiedene Agonisten nach. Fontaine et al. (1981) untersuchten ebenfalls die

⁵ Für die Durchführung dieser Versuche möchte ich Herrn Dr. Fleer (Münster) danken.

spasmolytische Aktivität des Harpagogenins. Dabei stellten sie fest, dass das Genin eine größere Aktivität aufweist als Harpagosid und Harpagid.

6.3.1 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Durchgeführt wurde die Testung nach Fleer (2000).

Das isolierte Meerschweinchenilium wurde in einem Organbad mit 37 °C warmem und mit Carbogen begastem Puffer umspült. Das Organ wurde equilibriert und mit dem Agonisten kontrahiert. Dieser Wert stellte den Kontrollwert dar. Nach dem Waschen des Ileums mit Puffer wurde die Testverbindung hinzugegeben. Es wurde erneut eine Kontraktion mit dem Agonisten ausgelöst. Dieser Wert wird auf den der gemessenen Kontrolle bezogen und in Prozent angegeben.

6.3.2 TESTUNG DES EXTRAKTES

Der Extrakt wurde in den Konzentrationen 1 mg/mL und 0.1 mg/mL getestet. Als Agonisten wurden Bariumchlorid und Acetylcholin (55nM) verwendet. Für die Testung mit Bariumchlorid (80 µM) als Agonisten wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

Für den Extrakt konnte keine spasmolytische Aktivität ermittelt werden. Er konnte weder die durch Acetylcholin noch die durch Bariumchlorid ausgelösten Kontraktionen vermindern.

Die Acetylcholin-induzierte Kontraktion konnte durch Atropin (140 nM) auf -1% (\pm 3.2) der Kontrolle reduziert werden. Papaverin (100 µM) verminderte die Barium-induzierte Kontraktion auf -12 % (\pm 1.2) der Kontrolle.

Damit stimmen diese Ergebnisse nicht mit denen von Occhiuto et al. (1985) und Fontaine et al. (1981) überein. Ursachen könnten in der unterschiedlichen Durchführung der Testungen oder in der Verwendung eines anderen Extraktes liegen. Fontaine et al. (1981) und Occhiuto et al. (1985) verwendeten z.B. einen methanolischen Extrakt.

6.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch den Extrakt die Arachidonsäurekaskade nicht unterbunden werden. Es konnte keine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der cytosolischen Phospholipase A₂, der 5-Lipoxygenase und der 12-Lipoxygenase ermittelt werden. Harpagosid wurde nur auf die Hemmung der 5-Lipoxygenase untersucht. Die Verbindung wies in dem System keine hemmende Aktivität auf.

Whitehouse et al. (1983) konnten ebenfalls keine Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade durch den Extrakt der Teufelskralle feststellen. Ihre Untersuchung beschränkte sich jedoch auf die Prostaglandin-Synthetase. Tippler et al. (1996) untersuchten die Eicosanoid-Synthese im Ionophor A23187 stimulierten Vollblut und konnten sowohl für den Extrakt als auch für Harpagosid eine konzentrationsabhängige Hemmung der Lipoxygenase und der Cyclooxygenase (Thrombozyten) ermitteln.

Die Unterschiede in den Ergebnissen von Tippler et al. (1996) und den hier ermittelten können durch Variationen des Testsystems zu Stande kommen. Tippler et al. (1996) verwendeten anstelle von isolierten Granulozyten aus Rinderblut menschliches Vollblut. Weiterhin betrug die Inkubationszeit nach der Zugabe des Calcium-Ionophors bei Tippler et al. (1996) 60 min. In dem hier durchgeführten Testsystem betrug diese Zeit nur 5 min. Anstelle von LTB₄ quantifizierten Tippler et al. (1996) LTC₄.

Da Harpagosid der Hauptinhaltsstoff des Extraktes ist, wurde neben dem Extrakt auch meist nur Harpagosid getestet. Es stellte sich dabei jedoch häufig heraus, dass Harpagosid keine oder nur eine schwache, dem Extrakt unterlegene Wirkung aufwies (Kap. 1.1.6, S.16; Caesar, 2001). Neben den Iridoidglykosiden sind jedoch auch Phenylethanoide, wie Acteosid und Isoacteosid in *Harpagophytum procumbens* nachgewiesen worden [Burger et al., 1987; Kap. 3.2, S.94]. Insbesondere Acteosid ist für eine 5-Lipoxygenase-Hemmung bekannt [Kimura et al., 1997]. Zu vermuten wäre, dass die Phenylethanoide zu den Wirksubstanzen des Extraktes zählen. Das wurde bisher allerdings noch nicht untersucht.

Auch wenn der Extrakt die Arachidonsäurekaskade *in vitro* nicht hemmt, kann dadurch nicht auf die Wirkung *in vivo* geschlossen werden. Wie bereits erwähnt, zeigt der Extrakt in *in vivo*-Testmodellen eine antirheumatische Wirkung. Diese Wirkung könnte durch Metabolisierungsprodukte der Inhaltsstoffe des Extraktes hervorgerufen werden. Wie Baghdikian et al. (1999 a,b) gezeigt haben, werden Harpagosid, 8-PCHG und Harpagid durch die intestinale Bakterienflora zu Pyridin-Monoterpen-Alkaloiden umgesetzt. Die Wirkung dieser Verbindungen wurde jedoch *in vitro* noch nicht weiter untersucht. Für andere Iridoide,

die auf dieselbe Weise metabolisiert worden sind, konnte eine antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden [Ghisalberti, 1998].

Es ist auch zu bedenken, dass die Hemmung der Arachidonsäurekaskade nicht das einzige antirheumatische Wirkprinzip darstellt. Bei der rheumatoiden Arthritis z.B. spielt ebenfalls die Ausschüttung entzündungsauslösender Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6, TNF α) eine Rolle. Dass der Extrakt von *Harpagophyti radix* die Ausschüttung von TNF α einschränkt, konnte bereits von Fiebich et al. (2001) gezeigt werden. Infolge der Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen kommt es neben der Freisetzung von Leukotrienen und Prostaglandinen als Entzündungsmediatoren ebenfalls zu einer Ausschüttung von Histamin und Bradykinin. Die Knorpel- und Knochenzerstörung ist nicht nur auf die Aktivität lysosomaler Enzyme (Elastase, Kollagenasen) zurückzuführen, sondern auch auf reaktive Sauerstoffspezies, die im Laufe dieser Entzündungsreaktionen freigesetzt werden. Somit bestehen noch weitere zahlreiche Möglichkeiten, die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises zu beeinflussen.

Eine entzündungshemmende Eigenschaft konnte auch nicht für die im Pflanzenreich neue Verbindung Pagosid ermittelt werden. Die prozentuale Inhibition im HET-CAM-Test war weder ausgeprägt noch konzentrationsabhängig. Bedenken muss man bei dem HET-CAM-Test, dass die direkte inhibierende Wirkung der Substanz überprüft wird. Metabolisierungsreaktion werden auch hier außer Acht gelassen.

Ein spasmolytischer Effekt konnte mit dem hier untersuchten wässrigen Extrakt ebenfalls nicht erzielt werden. Die durch Bariumchlorid und Acetylcholin ausgelösten Kontraktionen konnten durch den Extrakt nicht vermindert werden.

7 Zusammenfassung der Dissertation und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

Die sekundäre Speicherwurzel der im Südwesten Afrikas beheimateten Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) wird in Europa und Nordamerika als Antirheumatikum und Bittermittel verwendet. Das Inhaltsstoffspektrum dieser Wurzeln ist hauptsächlich gekennzeichnet durch das Vorkommen von Iridoidglykosiden, Phenylethanoidglykosiden und Kohlenhydraten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Kenntnisse über das Inhaltsstoffspektrum erweitert werden. Aus der Ethylacetat-Fraktion eines wässrigen Extraktes von *Harpagophyti radix* konnten 5 Iridoidglykoside, 3 Phenylethanoide und 2 Phenolcarbonsäuren isoliert werden. Neben den für die Pflanze bekannten Iridoidglykosiden Harpagosid und 8-PCHG konnten die Verbindungen 8-Feruloylharpagid, 8-Cinnamoylmyoporosid und auch Pagosid gewonnen werden. Die letzten beiden Substanzen konnten hier zum ersten Mal aus pflanzlichem Material isoliert werden. Pagosid weicht in seiner Struktur von den anderen Iridoidglykosiden ab. Der Pentanring liegt in einer geöffneten Form vor und ähnelt somit dem bereits isolierten Harpagogenin [Vanhaelen et al., 1981]. Im Gegensatz zu dieser Verbindung besitzt Pagosid eine Carbonsäure-Funktion und ist mit p-Cumarsäure und Glucose verbunden.

Aus der Gruppe der Phenylethanoide konnten die bereits bekannten Verbindungen Acteosid und Isoacteosid [Burger et al., 1987] isoliert werden. Weiterhin konnte 6'-O-Acetylacteosid, ein neues Acteosid-Derivat, gewonnen werden.

Neben Zimtsäure, die von Bauersfeld 1974 isoliert worden ist, enthält die Speicherwurzel von *Harpagophytum procumbens* noch Kaffeesäure als freie Phenolcarbonsäure.

Es wurde weiterhin ein DC-, HPLC- und CE-System zur analytischen Charakterisierung des Extraktes und der gewonnenen Fraktionen entwickelt. Eine Quantifizierung der Inhaltsstoffe erfolgte mit HPLC und CE. Mit diesen beiden Methoden wurde ebenfalls ein wässriger Extrakt aus der sekundären Speicherwurzel von *Harpagophytum zeyheri* Decne, eine weitere Art der Gattung *Harpagophytum*, untersucht. Diese Droge ist, wie bereits bekannt, durch einen höheren Gehalt an 8-PCHG und einen niedrigeren Gehalt an Harpagosid gekennzeichnet. Isoacteosid, Acteosid und Pagosid liegen hier in gering höheren Konzentrationen vor. 6'-O-Acetylacteosid konnte in diesem Drogenmaterial nicht gefunden werden. In den hier untersuchten *Harpagophytum procumbens* Extrakten konnte die Verbindung stets identifiziert werden.

Als ein antirheumatisches Wirkprinzip wurde hier die inhibierende Wirkung des Extraktes und seiner Inhaltsstoffe auf die Aktivität der humanen neutrophilen Elastase untersucht. Der Extrakt von *Harpagophytum procumbens* DC. (IC_{50} 542 $\mu\text{g/mL}$) zeigte eine schwache Hemmung der Elastase. Die Hemmung war beim Extrakt von *Harpagophytum zeyheri* Decne (IC_{50} 1012 $\mu\text{g/mL}$) dagegen noch schwächer ausgeprägt. Bei der Untersuchung der wässrigen und der Ethylacetat-Fraktion, die beide im ersten Fraktionierungsschritt aus dem wässrigen Extrakt gewonnen worden sind, fiel auf, dass die Elastase inhibierende Wirkung maßgeblich durch Verbindungen der Ethylacetatfraktion hervorgerufen wird.

Von diesen im Ethylacetat-Extrakt vorhandenen Substanzen zeigte 6'-O-Acetylacteosid (IC_{50} 0.070 mmol/L) die ausgeprägteste inhibierende Wirkung auf die Elastase-Aktivität. Kaffeesäure (IC_{50} 0.475 mmol/L), für die bereits Melzig et al. (2000) eine schwache Elastase Hemmung ermittelte, inhibierte das Enzym schwächer als 6'-O-Acetylacteosid. 8-PCHG (IC_{50} 0.350 mmol/L), Pagosid (IC_{50} 0.260 mmol/L) und Isoacteosid (IC_{50} 0.286 mmol/L) zeigten ebenfalls eine hemmende Aktivität, die jedoch schwächer ausgeprägt war als die des 6'-O-Acetylacteosids. Harpagosid, Acteosid und Zimtsäure beeinflussten die Elastase-Aktivität nur in sehr geringem Maße. Ein IC_{50} -Wert konnte für diese Substanzen nicht ermittelt werden. Da die Elastase inhibierende Aktivität des *Harpagophyti radix* Extraktes und der Inhaltsstoffe nur schwach ausgeprägt ist, ist es fraglich, ob dieser Mechanismus therapeutisch eine Rolle spielt.

Die Arachidonsäurekaskade, ein weiteres antirheumatisches Wirkprinzip, konnte durch den Extrakt weder über Lipoxygenasen noch über die Phospholipase A_2 unterbunden werden. Für Pagosid konnte im HETCAM-Test keine antiphlogistische Wirkung ermittelt werden.

Weiterhin wurde die Resorption über die Dünndarmepithelschicht und der Transportweg von Verbindungen des *Harpagophyti radix* Extraktes im Caco-2-Zellsystem untersucht. Zimtsäure zeigte dabei die höchste Resorptionsrate. Weitere Experimente (umgekehrte Transportrichtung, Konzentrationsabhängigkeit) deuten daraufhin, dass in dem Fall ein passiv transcellulärer Mechanismus vorliegt. Bei Harpagosid, 8-PCHG und Pagosid ist die Resorptionsrate sehr gering. Diese Verbindungen werden hauptsächlich passiv paracellulär, über die Poren der Tight Junctions, transportiert. Eine Beteiligung des P-Glykoproteins, eines Efflux-Systems, kann an Hand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Die Transportrate der Phenylethanoide (Acteosid, Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid) wurde nicht weiter untersucht. Unter den gegebenen Transportbedingungen im Caco-2-Zellsystem waren die Verbindungen nicht stabil.

7.2 Ausblick

Nach den durchgeführten phytochemischen und biopharmazeutischen Untersuchungen zu *Harpagophytum procumbens* DC. bleiben einige Fragestellungen offen, denen wegen des begrenzten Zeitraums dieser Arbeit nicht nachgegangen werden konnte. Diese werden im folgenden kurz zusammengefasst.

↳ Die Verbindung 6'-O-Acetylacteosid konnte in verschiedenen Extrakten von *Harpagophyti radix* identifiziert werden. In dem hier untersuchten Drogenmaterial von *H. zeyheri* war dieses Acteosid-Derivat jedoch nicht vorhanden. Könnte das Fehlen von 6'-O-Acetylacteosid in weiteren Drogenmustern von *H. zeyheri* bestätigt werden, wäre das neben dem 8-PCHG/Harpagosid-Quotienten und der 8-PCHG-Kennzahl eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung der Arten. Leider stand für diese Untersuchungen kein ausreichendes authentisches Drogenmaterial zur Verfügung.

↳ Stabilitätsuntersuchungen zeigen deutlich, dass sich die in *H. procumbens* vorhandenen Phenylethanoide bei 37 °C und einem pH-Wert von 7.4 (HBSS-Puffer) innerhalb kurzer Zeit abbauen. Es wäre interessant zu wissen, welche Metabolisierungsprodukte entstehen und in wieweit diese zur pharmakologischen Wirkung beitragen.

↳ Für Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid konnte *in vitro* eine Elastase inhibierende Aktivität nachgewiesen werden. Die Hemmung wurde nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und einem pH-Wert von 7.5 ermittelt. Wie oben bereits dargestellt, liegen diese Verbindungen zu dem Zeitpunkt verändert vor. Nach Identifizierung der Abbau- bzw. Umbauprodukte könnte man somit diese Inkubationsansätze näher charakterisieren und weiter untersuchen, auf welche Verbindungen diese Hemmung zurückzuführen ist. Hilfreich wäre dabei ebenfalls eine kinetische Untersuchung des Abbaus innerhalb des Testzeitraums.

↳ Weiterhin sollte die Permeabilität der Phenylethanoid-Abbauprodukte im Caco-2-Zellmodell untersucht werden.

Eine Vergleich z.B. der Zusammensetzung der basolateral entnommenen Proben mit und ohne Monolayerschicht könnte Hinweise auf metabolische Aktivität ergeben.

↳ Infolge des beobachteten Konzentrationsanstieges von Pagosid nach 1700 min bei 37°C im Extrakt liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Verbindung um ein Metabolisierungsprodukt handelt. Die Struktur des Pagosids unterstützt diese Annahme. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll zu überprüfen, ob Pagosid auch in frischem Drogenmaterial von *H. procumbens*, das uns nicht zur Verfügung stand, vorhanden ist.

↳ Wie bereits in Kapitel 5.4 (S.159) erwähnt, gelang es der Arbeitsgruppe von Baghdikian (1999) durch Zusatz z.B. von humaner Bakterienflora Iridoide aus *H. procumbens* (Harpagosid, 8-PCHG, Harpagid) zu Pyridinmonoterpen-Alkaloiden umzusetzen. Die Umsetzung (hier nicht näher beschrieben) gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Pharmakologische und biochemische Untersuchungen der dort entstandenen Verbindungen sind noch nicht durchgeführt worden.

↳ An Hand der hier durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Harpagosid und 8-PCHG passiv paracellulär transportiert werden. Die Einschränkung des transcellulären Transportes durch die Aktivität eines P-Glykoproteins ist sehr wahrscheinlich. Weitere Experimente, die diese Behauptung stützen könnten, wären sinnvoll.

- ⇒ Können die Ergebnisse mit anderen P-Glykoprotein-Inhibitoren bestätigt werden?
- ⇒ Wie verhält sich die Permeabilität von Verapamil nach dem Zusatz von Harpagosid?
- ⇒ Wie verhält sich Pagosid, wenn es als Reinsubstanz und nicht im Gemisch getestet wird?
- ⇒ Verändert sich die Permeabilität bei einer Temperatur von 4°C? (Bei dieser Temperatur sind Transporter und Enzyme nicht aktiv.)

8 Material

8.1 Pflanzenextrakte

8.1.1 *HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS DC.*

Der Teufelskrallenwurzel-Trockenextrakt mit der Chargen-Nummer 98220004 (*Harpagophyti radix aquos. sicc.*) wurde von der Firma Sertürner Arzneimittel (Berlin) zur Verfügung gestellt und wie folgt hergestellt:

50 T Drogenpulver wurden in einer mehrstufigen, erschöpfenden Extraktion mit 500 T Wasser bei 85-95°C über 20 Stunden extrahiert. Anschließend wurde das Filtrat bei 45-60°C sprühgetrocknet. Dabei ergab sich eine DEV-Toleranz von 1.5-2.5 : 1 und einem Trocknungsverlust von maximal 5 % nach Ph.Eur. 2001. Nach einer analytischen Untersuchung dieses Extraktes enthielt das Material keine Stellmittel.

Dieser Trockenextrakt dient zur Herstellung des Arzneimittels Harpago-Sern[®].

Mit diesem Extrakt wurden sowohl die phytochemischen als auch die biochemischen Untersuchungen durchgeführt.

Aus einem Drogenpulver aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens*, ebenfalls von Firma Sertürner Arzneimittel zu Verfügung gestellt, wurden unterschiedliche Extrakte hergestellt:

Bezeichnung	Extraktionsart	Lösungsmittel	Extraktionsdauer	Temperatur	DEV
Hp-HS	Soxhlet	Aqua dest.	24 h	Siedetemperatur	1.4 : 1
Hp-ES	Soxhlet	Ethanol 96 %	24 h	Siedetemperatur	1.5 : 1
Hp-H90	Wasserbad	Aqua dest.	10 h	90°C	1.4 : 1
Hp-E90	Wasserbad	Ethanol 50 %	10 h	90°C	1.5 : 1
Hp-H50	Wasserbad	Aqua dest.	4 h	50°C	1.5 : 1
Hp-E50	Wasserbad	Ethanol 50 %	4 h	50°C	1.6 : 1
Hp-HU	Ultra Turrax	Aqua dest.	3 x 3 min	Eiskühlung	1.6 : 1
Hp-EU	Ultra Turrax	Ethanol 50 %	3 x 3 min	Eiskühlung	1.4 : 1

Die Extraktionslösungen wurden abfiltriert, im Rotationsverdampfer eingengt und gefriergetrocknet.

Die so gewonnenen Extrakte wurden mittels HPLC (Kap. 9.1.2, S.208) auf die quantitative Zusammensetzung der bekannten Inhaltsstoffe untersucht.

8.1.2 *HARPAGOPHYTUM ZEYHERI* DC.

Das Drogenpulver der Wurzel von *Harpagophytum zeyheri* wurde von der Firma Sertürner Arzneimittel zur Verfügung gestellt. Aus dieser Droge wurden folgende Extrakte hergestellt:

Bezeichnung	Extraktionsart	Lösungsmittel	Extraktionsdauer	Temperatur	DEV
Hz-ES	Soxhlet	Ethanol 96 %	24 h	Siedetemperatur	1.6 : 1
Hz-H90	Wasserbad	Aqua dest.	10 h	90°C	1.6 : 1
Hz-E90	Wasserbad	Ethanol 50 %	10 h	90°C	1.6 : 1
Hz-H50	Wasserbad	Aqua dest.	4 h	50°C	1.6 : 1
Hz-E50	Wasserbad	Ethanol 50 %	4 h	50°C	1.6 : 1
Hz-HU	Ultra Turrax	Aqua dest.	3 x 3 min	Eiskühlung	1.6 : 1
Hz-EU	Ultra Turrax	Ethanol 50 %	3 x 3 min	Eiskühlung	1.5 : 1

In diesen Extrakten wurde der Gehalt der bekannten Inhaltsstoffe mittels HPLC (Kap. 9.1.2, S.208) bestimmt und mit dem Inhaltsstoffmuster von *Harpagophytum procumbens* verglichen.

Weitere vier Extrakte (Li 174) aus den Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* wurden von der Firma Lichtwer zur Verfügung gestellt:

Li 174 Ch. 01020100	Li 174 Ch. 00070100	Li 174 Ch. 02011435	Li 174 Ch. 99070200
------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

8.2 Geräte und Chemikalien

8.2.1 ALLGEMEINE LABORGERÄTE

Analysenwaagen:	1. Sartorius MC I; Fa. Sartorius, Göttingen 2. Sartorius RC 250 S; Fa. Sartorius, Göttingen 3. Sartorius 2442; Fa. Sartorius, Göttingen 4. Mikrowaage Sartorius Typ 440; Fa. Sartorius, Göttingen
DC-UV-Detektion:	Camag UV-Lampe, FA. Camag, Berlin
Extrakttherstellung:	Ultra-Turrax T25/n (max. 24000 U/min), Fa. Christ, Osterode
Fraktionssammler:	LKB SuperFrac, Fa. Pharmacia, Uppsala/ Schweden
Gefriertrocknungsanlage:	1. Alpha I-5, Fa. Christ, Osterode 2. Beta 1-16, Fa. Christ, Osterode 3. Gamma 1, Fa. Christ, Osterode
Laborwaage:	Sartorius MC1, Fa. Sartorius, Göttingen
pH-Meter:	pH 537, Fa. WTW, Weinheim
Rotationsverdampfer:	1. Rotavapor RE 111 und RE 120, Fa. Büchi, Konstanz 2. Flawil mit Vacuum Membranpumpe, Fabr. Nr. 16010, Fa. Vacuubrand, Wertheim
Trockenschrank:	WTC, Fa. Binder, Tuttlingen
Ultraschallbad:	1. Sonorex RK 106, Fa. Bandelin, Berlin 2. Sonorex RK 255, Fa. Bandelin, Berlin

8.2.2 CHEMIKALIEN

Alle Chemikalien und Lösungsmittel, die nicht gesondert aufgeführt worden sind, wurden in p.a.- oder reinst Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) geliefert. HPLC-Lösungsmittel wurden in Lichrosolv[®]- Qualität von der Firma Merck und in ChromAr[®]-Qualität von der Firma Promochem (Wesel) bezogen. Hochgereinigtes Wasser für HPLC Untersuchungen wurde an dem Water Purification System Milli-Q, Fa. Millipore (Eschborn), gewonnen. Für die Kapillarelektrophorese wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Mit Petroleumbenzin vergälltes Ethanol 96 % wurde von der Firma Auf's Blatt (Lippstadt) geliefert. Die verwendeten Reinsubstanzen wurden entweder selbst isoliert oder von der Firma Fluka Chemie AG (Buchs/ Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

9 Methoden

9.1 Chromatographische Methoden

9.1.1 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Zur schnellen Charakterisierung und Untersuchung von Extrakten, Fraktionen und isolierten Verbindungen wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet. Nach Entwicklung der DC-Platte in einer mit Fließmittel gesättigten Kammer erfolgte die Detektion der Zonen erst mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm. Anschließend wurde die Platte mit dem Detektionsmittel (Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz) besprüht und bei 105 °C für 10 min im Trockenschrank erhitzt. Die Banden wurden durch eine unspezifische Reaktion mit dem Reagenz angefärbt und konnten nun an Hand der Farbe und des R_f -Wertes näher bestimmt werden.

Das Fließmittelgemisch „Mobile Phase 2“ diente zur Charakterisierung des polaren Bereiches des Extraktes und der Zuckerbestandteile.

Stationäre Phase: DC-Aluminiumfolien, 20 x 20 cm, 0.2 mm Schichtdicke,
Kieselgel 60 F₂₅₄, Firma Merck (Darmstadt)

Mobile Phase 1: Ethylacetat / Ameisensäure / Wasser
9 : 2 : 2

Mobile Phase 2: Ethylacetat / Methanol / Essigsäure / Wasser
60 : 15 : 15 : 15

Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz [Jork et al., 1993]

0.5 mL Anisaldehyd, 10 mL Eisessig, 85 mL Methanol und Schwefelsäure wurden in der angegebenen Reihenfolge unter Eiskühlung gemischt. Nach dem Besprühen der DC-Platte mit dem Reagenz wurden die DC-Platten bis zur optimalen Farbentwicklung (5-10 min) im Trockenschrank auf ca. 105°C erhitzt. Die farbigen Zonen konnten anschließend im Tageslicht ausgewertet werden.

9.1.2 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

9.1.2.1 Analytische HPLC

Die analytische HPLC Methode diente neben der Dünnschichtchromatographie sowohl zur Charakterisierung der Extrakte und Fraktionen als auch zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe.

Probengeber: Waters 717 Plus Autosampler
Detektor: Waters 990, Photodiode Array Detector
Controler: Waters 600 Controler
Entgasung: Waters Inline Degaser
Auswertung: Millennium Software, Waters

Stationäre Phase: LiChroCART[®] 250-4, LiChrospher[®] 100, RP-18 (5µm)
Vorsäule: LiChroCART[®] 4-4, LiChrospher[®] 100 RP-18, (5µm)
Fa. Merck (Darmstadt)

Mobile Phase: A Acetonitril
B 0,1% TFA in Aqua Millipore

Detektion: 280 nm, 312 nm, 330 nm

Fluss: 1 mL/min

Injektionsvolumen: Screening/ Quantifizierung 20 µL
Caco-2-Testungen 10 µL, 100 µL

Gradient:

Min.	Acetonitril (A)	0,1 %TFA (B)
0	10	90
20	50	50
30	70	30
35	100	0
40	100	0

9.1.2.2 Präparative HPLC

Mittels der präparativen HPLC wurden aus den MLCCC-Fractionen die Reinsubstanzen gewonnen. Es handelte sich um den letzten Aufreinigungsschritt der Aufarbeitung.

Pumpe: 1. Waters Multisolvent Delivery System 600
2. Waters 515 HPLC Pump

Detektor: 1. Waters 490, Programmable Multiwavelength Detector
2. Waters Model 481 LC Spectrophotometer

Plotter: 1. Hewlett Packard HP 3394 A
2. NEC Pinwriter P20

Stationäre Phase: 1. Eurospher 100, C-18, 250 x 20 mm (5µm)
2. Hypersil ODS, RP-18, 250 x 16 mm (5µm)

Mobile Phase: A Acetonitril oder Methanol
B Aqua Millipore

Detektion: 280 nm, 312 nm, 330 nm

Fluss: 6 mL/min

Injektionsvolumen: 800-2000µL

Gradienten: HPLC-1 Aufreinigung der Fraktion IB2 (280 nm)

Min.	Methanol (A)	Aqua millipore (B)
0	30	70
20	60	40
30	100	0
35	100	0

HPLC-2 Aufreinigung der Fraktion IB3/IB10 (280 nm)

Min.	Methanol (A)	Aqua millipore (B)
0	40	60
30	70	30
35	100	0
40	100	0

HPLC-3 Aufreinigung der Fraktion IB4 (280 nm)

Min.	Methanol (A)	Aqua millipore (B)
0	40	60
30	80	20
35	100	0
40	100	0

HPLC-4 Aufreinigung der Fraktion IB7 (278 nm)

Min.	Acetonitril (A)	Aqua millipore (B)
0	20	80
20	70	30
30	100	0
35	100	0

HPLC-5 Aufreinigung der Fraktion IIB2 (280 nm)

Min.	Acetonitril (A)	Aqua millipore (B)
0	10	90
20	30	70
30	100	0
35	100	0

HPLC-6 Aufreinigung der Fraktion IIIB8 (330 nm)

Min.	Acetonitril (A)	Aqua millipore (B)
0	30	70
20	50	50
30	100	0
35	100	0

9.1.2.3 Quantifizierung mit HPLC

Die Extrakte (Kap. 8.1, S.204) und auch die Testlösungen der Resorptionsstudien (Kap. 5, S.147) wurden mit Hilfe der HPLC quantifiziert. Dabei wurden die isolierten Verbindungen als externe Standards eingesetzt. Aus Substanzmangel wurden Pagosid und 8-Feroylharpagid als 8-PCHG berechnet, 8-O-Cinnamoylmyoporosid als Harpagosid.

Geräte und Bedingungen: s. Analytische HPLC (Kap. 9.1.2.1, S.208)

9.1.2.3.1 Aufarbeitung der Proben

10-20 mg Extrakt wurden in 10 mL Aqua Millipore im Ultraschallbad gelöst. Die Lösungen wurden anschließend membranfiltriert.

Die Proben aus den Caco-2-Testungen wurden ohne weitere Probenaufbereitung in die HPLC-Anlage aufgegeben.

9.1.2.3.2 Erstellung der Kalibriergeraden.

Die Kalibriergeraden von Harpagosid, 8-PCHG, Zimtsäure, Acteosid, Isoacteosid und 6'-O-Acetylacteosid wurden mit Hilfe selbst isolierter Verbindungen erstellt. Aus einer Stammlösung der Substanzen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (Lösungsmittel: Aqua Millipore), um 7-9 Kalibrierpunkte zu erhalten. Für die Auswertung wurde die Geradengleichung $y = ax + b$ zugrunde gelegt. Die Verbindungen wurden in der Nähe ihrer Absorptionsmaxima bestimmt.

Substanz	Geradengleichung	r^2	Konzentrationsbereich [$\mu\text{g/mL}$]	Wellenlänge [nm]
Harpagosid	$y = 48606x + 34165$	0.9999	0.0027 – 498	280 nm
8-PCHG	$y = 30509x - 2302$	0.9999	0.027 – 498	312 nm
Kaffeensäure	$y = 105509x - 12552$	1.0000	0.0020 – 204	330 nm
Zimtsäure	$y = 151146x + 153398$	0.9991	0.0021 – 206	280 nm
Acteosid	$y = 26698x - 61993$	0.9998	0.032 – 396	330 nm
Isoacteosid	$y = 25022x - 30133$	0.9998	0.027 – 498	330 nm
6'-O-Acetylacteosid	$y = 19113x + 31956$	0.9999	0.03 – 404	330 nm

9.1.3 SÄULENCHROMATOGRAPHIE

9.1.3.1 Trennung an Celite® 545

Mit Hilfe von Celite® 545, ein Filterhilfsmittel auf Kieselgurbasis, wurde aus dem Extrakt von *H. procumbens* die Ethylacetatphase gewonnen, die im Rahmen dieser Arbeit weiter aufgearbeitet worden ist.

Material	Celite® 545, Fa. Roth KG (Karlsruhe)
Füllhöhe	39 cm (~ 260 g Celite® 545)
Säule	Glassäule, 71 cm x 5.5 cm I.D.
Elutionsmittel	Ethylacetat Aqua destillata

Das Säulenmaterial wurde locker und ohne vorheriges Suspendieren im Elutionsmittel in die Glassäule eingefüllt. Die Elutionsmittel, Aqua destillata und Ethylacetat, wurden vor der Trennung gegeneinander ausgeschüttelt und im Ultraschallbad entgast.

70 g des gepulverten Extraktes wurden in 180 mL Wasser gelöst und vorsichtig auf das Säulenmaterial aufgegeben. Zur vollständigen Benetzung der porösen Oberfläche des Kieselgurs mit Wasser, wurde die Extrakt-Lösung 20 Minuten auf dem Säulenmaterial belassen. Die Fraktion B (3.96 g) wurde durch die Elution mit Ethylacetat erhalten. Die Vollständigkeit dieser Trennung wurde mit DC (Kap. 9.1.1, S.207) überprüft. Anschließend wurde die Säule mit 5000 mL Wasser gereinigt. Die so gewonnene Phase (66.02 g) wurde als Fraktion A bezeichnet.

Die aufgefangenen Eluate wurden im Rotations-Verdampfer eingengt und gefriergetrocknet. Bei der Aufarbeitung des Extraktes mittels Kieselgur sind 1 % der eingesetzten Menge verloren gegangen. Der Anteil an Fraktion B betrug 5.7 %, an Fraktion A 94.3%.

9.1.4 MULTILAYER COIL COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY (MLCCC)

Die MLCCC diente zur weiteren Auftrennung der Fraktion B.

Gerät:	Ito Multilayer Coil Separator-Extractor, P.C. Inc. Potomac (Maryland / USA)	
	Vertrieb: Zinsser Analytik (Frankfurt)	
Säule:	325 mL, 1.6 mm I.D.	
Injektor:	Rheodyne 502, Probenschleife 10 mL	
Pumpe:	Knauer HPLC Pumpe 64	
Rotation:	800 Umdrehungen/min	
Fluss:	1 mL/min	
Zweiphasensystem:	Ethylacetat / Wasser / Propanol	14 : 8 : 0.5
	Stationäre Phase:	Untere Phase
	Mobile Phase:	Obere Phase

Das Zweiphasensystem wurde im Scheidetrichter gegeneinander abgesättigt. Die beiden Phasen wurden nach der Trennung im Ultraschallbad eine halbe Stunde lang entgast.

Fraktion B wurde in einer Mischung aus 5 mL Ober- und 5 mL Unterphase gelöst und auf die MLCCC gegeben. Die Fraktionszeit betrug 4 min pro Reagenzglas, entsprechend 4 mL pro Fraktion. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kap. 9.1.1, S.207) überprüft und anhand des chromatographischen Bildes zusammengeführt. Die vereinigten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer einrotiert und gefriergetrocknet.

Da bei der MLCCC für eine gute Trennleistung höchstens 2 g aufgegeben werden dürfen, wurde diese Trennung drei Mal durchgeführt.

MLCCC I:

Die Auftrennung von 880 mg Fraktion B ergab 279 Reagenzgläser, die nach dem dünnschichtchromatographischen Bild zu den Fraktionen IB1 bis 1 B11 vereinigt wurden.

MLCCC II:

1900 mg der Fraktion B wurden in 280 Fraktionen getrennt, die weiterhin zu den Fraktionen IIB1 bis IIB10 vereinigt wurden.

MLCCC III:

Die Auftrennung von 1500 mg Fraktion B ergab nach Vereinigung der 260 Reagenzgläser nach dünnschichtchromatographischen Bild die Fraktionen IIIB1-IIIB10.

Vereinigte Fraktionen	MLCCC I	MLCCC II	MLCCC III
Fraktion 1	1 – 39	1 – 35	1 – 30
Fraktion 2	40 – 58	36 – 42	31 – 40
Fraktion 3	59 – 70	43 – 59	71 – 48
Fraktion 4	71 – 83	60 – 76	49 – 63
Fraktion 5	84 – 106	77 – 94	64 – 76
Fraktion 6	107 – 135	95 – 118	77 – 95
Fraktion 7	136 – 179	119 – 135	96 – 105
Fraktion 8	180 – 214	136 – 240	106 - 116
Fraktion 9	215 – 244	241 – 280	117 – 260
Fraktion 10	245 – 279	Stationäre Phase	Stationäre Phase
Fraktion 11	Stationäre Phase		

9.1.5 MEDIUM PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (MPLC)

Die MPLC wurde genutzt, um aus der Fraktion IIB6 in größeren Mengen Acteosid, Isoacteosid und Harpagosid zu isolieren.

Glassäule: 2.5 cm I.D., 22 cm Länge
 Pumpe Besta E 100, Besta Technik (Wilhelmsfeld)
 Stationäre Phase: Europrep C-18, Besta Technik, 20-45 µm (Wilhelmsfeld)
 Injektor: Rheodyne 502 mit 10 mL Probenschleife
 Fluss: 2 mL/min
 Mobile Phase: Acetonitril (A)
 Wasser (B)

Die Säule wurde mit den Anfangsbedingungen equilibriert. Nach Aufgabe der gelösten Fraktion wurde ein linearer Gradient von 40 % bis 60 % Acetonitril gefahren.

Die Fraktionszeit betrug 4 min pro Reagenzglas, entsprechend 8 mL pro Fraktion. Die Fraktionen wurden nach ihrem dünnenschichtchromatographischen Bild vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeengt und gefriergetrocknet.

9.2 Kapillarelektrophoretische Methoden

Die Kapillarelektrophorese wurde zur Quantifizierung der Phenylethanoide und der Iridoide genutzt. Mit einer anderen kapillarelektrophoretischen Methode war es ebenfalls möglich, die Zuckerbestandteile der isolierten Verbindungen zu identifizieren (Kap. 9.2.2, S.216).

Gerät: P/ACE 5010 Beckmann Instruments (Palo Alto/ USA)
Detektor: DAD-UV
Auswertung: System Gold Software, Beckman Instruments (Palo Alto/ USA)

9.2.1 QUANTIFIZIERUNG

Zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe wurde p-Hydroxymandelsäure als interner Standard verwendet. Die Phenylethanoide wurden als Acteosid berechnet. Pagosid wurde wie bei der HPLC als 8-PCHG berechnet.

Puffer: 100mM Natriumtetraborat
Kapillare: 50 µm I.D., 57 cm lang, 50 cm bis zum Detektor
Injektionsdauer: 3 s
Injektionsdruck: 0,5 psi
Detektion: 280 nm, 330 nm
Spannung: 25 kV
Temperatur: 25 °C

Lösungsmittel: Bidestilliertes Wasser

9.2.1.1 Aufbereitung der Proben

Die Extrakte (Kap. 8.1, S.204) wurden mit einer Konzentration von 20 mg/mL in bidestilliertem Wasser gelöst. Der interne Standard wurde in einer Konzentration von 5 mg/

mL eingesetzt. Zu 1 mL des gelösten Extraktes wurden 0.25 µL des internen Standards gegeben, entsprechend einer Endkonzentration von 1.00 mg/ mL.

9.2.1.2 Erstellung der Kalibriergeraden

Aus den Reinsubstanzen Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid und Acteosid wurde eine Stammlösung hergestellt. Um 6 Kalibrierpunkte zu erhalten, wurde aus der Stammlösung eine Verdünnungsreihe erstellt.

Zu 1 mL jeder Lösung wurde 0.25 mL Interner Standard mit einer Konzentration von 5mg/mL hinzupipettiert.

Aus den ermittelten Corrected Peak Areas des Internen Standards und der jeweiligen Verbindung wurde ein Quotient gebildet. Trug man diesen Quotienten mit dem Quotienten der eingesetzten Konzentrationen in ein x-y-Diagramm ein, so ergab sich eine lineare Beziehung mit der Geradengleichung $y = ax + b$. Diese Gleichung wurde der Auswertung zu Grunde gelegt.

Substanz	Geradengleichung	r^2	Konzentrationsbereich [µg/mL]	Wellenlänge [nm]
Harpagosid	$y = 4.1889x + 0.0744$	0.9994	10.2 – 2040	280 nm
8-PCHG	$y = 1.6157x + 0.0136$	0.9987	4.2 – 840	330 nm
Acteosid	$y = 1.4003x + 0.0334$	0.9981	9.8 – 1960	330 nm

9.2.2 ZUCKERBESTIMMUNG

Die Kapillarelektrophorese wurde weiterhin zur Identifizierung der Zuckerbestandteile der isolierten Verbindungen verwendet.

Um die glykosidischen Bindungen zu spalten und damit die Zuckerbestandteile freizusetzen, wurden die Glykoside einer sauren Hydrolyse unterzogen. Dazu wurde ca. 1 mg des Glykosids in 0.5 mL einer 23 %igen wässrigen Trifluoressigsäure gelöst. Diese Mischung wurde 1 Stunde lang bei 120 °C in einer zugeschweißten Ampulle inkubiert und anschließend in einen Spitzkolben überführt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurde der

Rückstand mehrmals in Wasser aufgenommen und wieder eingengt, um die Trifluoressigsäure zu entfernen.

Nach der Hydrolyse wurden die Zucker einer reduktiven Aminierung unterzogen [Noe et al., 1995]. Sie wurden in 50 μL destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt und mit einer 0.1 molaren Lösung von S-(-)-1-Phenylethylamin (pH 6.5) versetzt. Dieses Gemisch wurde 10 min lang bei 90 °C inkubiert. Anschließend folgte noch die Zugabe von 22.5 μL einer 0.46 molaren, wässrigen Lösung von Natriumcyanoborohydrid und eine erneute Inkubation für 60 min bei 90 °C.

Die entstandenen Diastereomere wurden mit Hilfe ebenso umgesetzter Zucker zugeordnet.

CE-Bedingungen:

Puffer:	50 mM Natriumborat; 4.4 M Acetonitril Einstellung des pH-Wertes auf 10.3 mit NaOH
Kapillare:	50 μm I.D., 77 cm lang, 70 cm bis zum Detektor
Injektionsdauer:	1-5 s
Injektionsdruck:	0,5 psi
Detektion:	200 nm
Spannung:	30 kV
Temperatur:	25 °C

9.3 Optische und spektroskopische Methoden

9.3.1 UV-SPEKTROSKOPIE

UV-Spektren wurden zur Identifizierung der isolierten Verbindungen verwendet.

Ebenso wurde die Photometrie eingesetzt zur Messung des 4-Nitroanilins bei der Elastase-Testung (Kap. 9.5, S.224) und zur Quantifizierung des Propranolols (Kap. 9.6.5.2.5, S.234), einer Kontrollsubstanz der Caco-2-Testungen.

Neben den UV-Maxima der Verbindungen wurden auch die Absorptionskoeffizienten bestimmt. Der Berechnung des Koeffizienten liegt folgende Formel zu Grunde [Rücker et al., 1992]:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot b}$$

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient

A = gemessene Absorption

c = Konzentration [mol/L]

b = Schichtdicke [cm]

Gerät: Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-260

Küvetten: Quarzküvetten, 1 cm

9.3.2 NMR-SPEKTROSKOPIE

Die Substanzen wurden in deuteriertem Methanol (Uvasol[®]-Qualität, Fa. Merck) gelöst und durch Watte in ein NMR-Röhrchen (Norell 508-UP) filtriert. Es wurde auf ca. 0.7 mL aufgefüllt. Substanzen, Watte und Pipetten wurden vorher im Vakuum-Trockenschrank getrocknet.

Die Chemische Verschiebung (δ) wurde in ppm und die Kopplungskonstante (J) in Hz angegeben. Das Lösungsmittelsignal wurde als interner Standard verwendet. Für Methanol-d₆ betrug die chemische Verschiebung für δ_{H} 3.30 ppm und für δ_{C} 49.0 ppm.

Geräte:

1. Varian Gemini 200
(Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie,
WWU Münster)
2. Bruker AM-360
(Institut für Organische Chemie, WWU Münster)
3. Varian Unity 600
(Institut für Organische Chemie, WWU Münster)

Auswertung /

Spektrennachbearbeitung: NutsPro-NMR Utility Transform Software
Fa. Acorn NMR Inc. (Fremont / Kanada)

Für einige Verbindungen wurde weiterhin zur Überprüfung der angegebenen Kopplungskonstanten mit Hilfe von NUTS-Software eine Simulation durchgeführt.

9.3.3 MASSENSPEKTROSKOPIE

Die Massenspektren wurden zur Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen genutzt. Zur Ermittlung größerer Fragmente und des Molekulargewichtes wurde als schonendes Ionisierungsverfahren die Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) im positiven und im negativen Modus angewendet.

Gerät: 1. LCQ-Finnigan MAT
 (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie,
 WWU Münster)
 2. Quattro LC Z
 (Institut für Organische Chemie, WWU Münster)

9.3.4 POLARIMETRIE

Die spezifische Drehung ($[\alpha]_D^{20}$) diente der Charakterisierung und Reinheitsbestimmung der isolierten Verbindungen. Die Substanzen wurden genau eingewogen und in Methanol (Uvasol[®] Qualität) gelöst. Die Lösung wurde blasenfrei in die Küvette pipettiert. Der Drehwert wurde 25 mal gemessen. Zur weiteren Berechnung wurde der Mittelwert verwendet. Die spezifische Drehung ließ sich nach folgender Formel berechnen [Rücker et al., 1992]:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

α = gemessener Drehwinkel [°], 20°C
 l = Länge der Küvette [dm]
 c = Konzentration [g/mL]

Gerät: Polarimeter 341, Fa. Perkin-Elmer (Düsseldorf)
Küvette: Länge 1 dm
Detektion: Na-Licht der Wellenlänge 589.3 nm
Lösungsmittel: Methanol

9.4 Isolierung der Reinsubstanzen

9.4.1 FRAKTIONIERUNG DES EXTRAKTES

Bei dem Ausgangsmaterial handelte es sich um einen wässrigen, sprühgetrockneten Extrakt (Kap. 8.1.1, S.204) aus den sekundären Speicherwurzeln von *Harpagophytum procumbens* DC., der von der Firma Sertürner (Berlin) zur Verfügung gestellt worden ist.

Dieser Extrakt wurde mit einer Kieselgur-Säule weiter aufgearbeitet (Kap. 9.1.3.1, S.212). Er wurde in Wasser gelöst, auf die Säule aufgegeben und zunächst mit Ethylacetat (Fraktion B) und anschließend mit Wasser (Fraktion A) eluiert. Die vollständige Elution wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kap. 9.1.1 S.207) überprüft. Der Anteil der Ethylacetat Phase (Fraktion B) betrug 5.7% und der Wasserphase 94.3 %.

Die wässrige Phase (Fraktion A) wurde nur dünnschichtchromatographisch untersucht und nicht weiter bearbeitet.

Fraktion B wurde mit der MLCCC (Kap. 9.1.4, S.213) weiter aufgetrennt. Um eine genügend große Masse für weitere Aufarbeitungsschritte zu gewinnen, wurde diese Trennung insgesamt 3 Mal durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels DC und analytischer HPLC (Kap. 9.1.2.1, S.208) überprüft. Bei dem ersten Lauf wurden 880 mg verwendet, die in 11 Fraktionen (IB1-IB11) getrennt wurden. Der 2. MLCCC Lauf (1900 mg) ergab 10 und die dritte Fraktionierung (1500 mg) ergab ebenfalls 10 Fraktionen. Ein Teil der Fraktionen wurde mit präparativer HPLC (Kap. 9.1.2.2, S.208) zur Gewinnung der Reinsubstanzen aufgereinigt (Fraktionschema Kap. 2.3).

Fraktion IIB6 (414 mg) wurde mittels MPLC (Kap. 9.1.5, S.214) mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten weiter bearbeitet.

9.4.2 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER VERBINDUNGEN

Die angegebenen R_f -Werte und Farben beziehen sich auf das in Kapitel 9.1.1 (S.207) beschriebene DC-System; die Retentionszeiten (R_t) sind mit der analytischen HPLC-Methode, die in Kapitel 9.1.2.1 (S.208) erläutert worden ist, ermittelt worden.

Harpagosid

Harpagosid (15.9 mg) wurde aus der Fraktion IB7 (351.4 mg; 544 - 716 mL MLCCC) mit dem HPLC-4 (R_t 16.6 min) System gewonnen. Von der Fraktion IB7 wurden nur 49 mg aufgearbeitet. Größere Mengen Harpagosid (173.6 mg; 2040 – 2488 mL MPLC) wurden mittels MPLC aus der Fraktion IIB6 isoliert.

ESI-MS (m/z): 517 $[M + Na]^+$

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-41.2° (c = 0.21, CH ₃ OH)	280 (log 4.330) 223 (log 3.944)	0.56	rot	19.8

8-PCHG

Aus der Fraktion IB10 (57.4 mg, 980 – 1116 mL MLCCC) wurde mit dem HPLC-2 (R_t 29 min) System 8-p-Cumaroylharpagid (19.4 mg) gewonnen.

ESI-MS (m/z): 533 $[M + Na]^+$, 549 $[M + K]^+$, 369, 351, 203

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-32.2° (c = 0.29, CH ₃ OH)	312 (log 4.240) 225 (log 4.032)	0.53	rot	17.2

8-O-Cinnamoylmyoporosid

Die Aufarbeitung der Fraktion IB4 (26.7 mg; 284 – 332 mL MLCCC) mit dem HPLC-3 (R_t 28.5 min) System ergab 8-O-Cinnamoylmyoporoside (1.6 mg).

ESI-MS (m/z): 745.4, 725.2, 501 $[M + Na]^+$, 371, 369, 351

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-28.6° (c = 0.15, CH ₃ OH)	---	0.72	rot	20.5

8-Feruloylharpagid

8-Feroylharpagid (9.9 mg) wurde aus der Fraktion IIIB8 (24.1 mg) unter Verwendung des HPLC-6 (R_t 14.3 min) Systems isoliert.

ESI-MS (m/z): 563.2 $[M + Na]^+$, 1103 $[2M + Na]^+$, 579.2 $[M + K]^+$, 539.6 $[M - 1]^-$, 540.5 $[M]^-$, 1080.3 $[2M - 1]^-$

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-40.8° (c = 0.15, CH ₃ OH)	---	0.49	rot	17.4

Pagosid

Die Fraktion IIIB5 (88.5 mg) stellte Pagosid dar. Nach Überprüfung dieser Fraktion mit analytischer HPLC zeigte sich eine genügend hohe Reinheit zur Strukturaufklärung, so dass sie nicht mehr aufgereinigt werden musste.

ESI-MS (m/z): 515 $[M + Na]^+$, 516 $[M + 1 + Na]^+$, 531 $[M + K]^+$, 491 $[M - 1]^-$, 492 $[M]^-$, 1080.3 $[2M - 1]^-$

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-123.5° (c = 0.49, CH ₃ OH)	312 (log 4.158) 233 (log 4.216)	0.66	blau	18.6

Acteosid

Die Aufreinigung der Fraktion IIB6 mit MPLC ergab unter anderem Acteosid (23.7 mg; 1536 – 1672 mL MPLC).

ESI-MS (m/z): 647.4 $[M + Na]^+$, 648.4 $[M + 1 + Na]^+$, 1271.1 $[2M + Na]^+$, 623.6 $[M - 1]^-$, 624.4 $[M]^-$, 1247.2 $[2M - 2]^-$, 1248.2 $[2M - 1]^-$, 1249.2 $[2M]^-$

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-84.8° (c = 0.30, CH ₃ OH)	330 (log 4.295) 219 (log 4.445)	0.69	grün	15.3

Isoacteosid

Isoacteosid (13.9 mg; R_t 14.2 min) wurde neben Harpagosid aus der Fraktion IB7 isoliert. Ebenso konnte Isoacteosid (169 mg; 1680 – 2032 mL MPLC) aus der Fraktion IIB6 neben Harpagosid und Acteosid isoliert werden.

ESI-MS (m/z): 647.4 $[M + Na]^+$, 648.4 $[M + 1 + Na]^+$, 501 $[M + Na - Glucose]^+$,

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-51.2° (c = 0.16, CH ₃ OH)	326 (log 4.250) 219 (log 4.427)	0.63	grün	16.1

6'-O-Acetylacteosid

6'-O-Acetylacteosid (20.2 mg) wurde mit demselben System wie 8-PCHG (HPLC-2; R_t 22.8 min) aus der Fraktion IB3 (54.3 mg; 236 – 280 mL MLCCC) isoliert.

ESI-MS (m/z): 689 $[M + Na]^+$, 690 $[M + 1 + Na]^+$, 543 $[M + Na - Glucose]^+$

$[\alpha]_D^{20}$	ϵ	R_f	Anisaldehyd-Schwefelsäure	R_t [min]
-56.5° (c = 0.16, CH ₃ OH)	330 (log 4.211) 300.4 (log 4.153) 219 (log 4.407)	0.77	grün	18.2

Zimtsäure

Zimtsäure (7.3 mg und 14.5 mg) konnte aus der Fraktion IB2 (49.2) mit HPLC-1 (R_t 24.9 min) und IIB2 (25 mg) mit HPLC-5 (R_t 31 min) isoliert werden.

ESI-MS (m/z): 147.4 $[M - 1]^-$, 148.4 $[M]^-$

R_f 1

R_t 22.8 min

Kaffeesäure

Die Aufreinigung der Fraktion IIB2 (25 mg) mit HPLC-5 (R_t 21 min) ergab neben Zimtsäure auch Kaffeesäure (4.2 mg).

ESI-MS (m/z): 179.5 $[M - 1]^-$, 180.6 $[M]^-$, 359.3 $[2M - 1]^-$

R_f 0.88

R_t 12.3 min

9.5 Elastase-Testsystem¹

9.5.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE

9.5.1.1 Chemikalien

Human Neutrophil Elastase (20-22 U/mg Protein)	ICN Biomedicals Inc. (Aurora/ USA)
N-(Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl- L-prolyl-L-valin-4-nitranilid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS)	Fa. Merck (Darmstadt)
Trypsin Inhibitor Type I-S aus Sojabohnen	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)

9.5.1.2 Geräte

Wasserbad	Thermomix 1420, Fa B.Braun
Schüttler	Minishaker MS2, IKA Works Inc. (Wilmington, USA)
Photometer:	Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-260
Reaktionsgefäße	Plastibrand [®] 1.5 mL, Fa. Brand (Wertheim)
Pipetten	Pipetman [®] , Rainin Instrument Co, Inc. (USA)

9.5.2 TESTSYSTEM

Die Testungen wurden nach der Methode von Löser et al. (2000) durchgeführt.

9.5.2.1 Lösungen

<u>TRIS-HCl-Puffer</u>	(60 mM, pH 7.5)
TRIS	3.63 g
Aqua bidest.	125 mL
0,1N Salzsäure	203 mL
Aqua bidest.	ad 500 mL

¹ Für die Einarbeitung in dieses Testsystem und für zahlreiche Hilfestellungen danke ich Herrn Prof. Dr. Melzig und Frau B. Rennert (Berlin).

TRIS wurde mit einem Magnetrührer vollständig in Wasser gelöst. Nacheinander wurden die Salzsäure und das restliche Wasser hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.5 eingestellt.

Die Pufferlösung wurde im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen frisch hergestellt.

Substratlösung

Stammlösung:

29,53 mg	N-(Methoxysuccinyl)-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-valin-4-nitranilid
250 µL	DMSO
4750 µL	TRIS-HCl-Puffer

Das Substrat wurde vollständig in DMSO gelöst und anschließend mit dem Puffer versetzt. Bei der Zugabe des Puffers fällt zum Teil wieder Substrat aus, welches aber nach gutem Schütteln wieder in Lösung geht. Diese Stammlösung wurde in Eppendorf Gefäßen aliquotiert (300-500 µL) in der Tiefkühltruhe bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Testung wurden 140 µL Stammlösung mit 860 µL TRIS-HCl-Puffer versetzt.

Enzymlösung

Elastase	100 µg (gesamter Inhalt der Lieferung, \cong 20-21 U/mg Protein)
Aqua bidest.	ad 1000µL

Das gefriergetrocknete Enzym wurde in Wasser gelöst und aliquotiert im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lagerung des gelösten Enzyms bei -20 °C war nicht geeignet, weil sie dessen Aktivität verminderte.

In der Testung wurde das Enzym in einer Konzentration von 0.05-0.13 µg Protein /10 µL Enzymlösung (entsprechend einer Aktivität von 10-26 mU pro Ansatz) eingesetzt. Dazu wurde die Stammlösung vor der Testung mit Puffer in einem Verhältnis von ca. 1:20 verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt richtete sich nach der Aktivität des Enzyms in der jeweiligen Charge (Kap. 9.5.2.4, S.227).

Inhibitorlösung

Trypsin-Inhibitor	10 mg
TRIS-HCl-Puffer	ad 50 mL

Der Inhibitor wurde eingewogen und in 50 mL TRIS-HCl-Puffer gelöst. Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert und alle zwei Tage frisch hergestellt.

Testlösungen

Die eingesetzten Testsubstanzen wurden in TRIS-HCl-Puffer gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt.

Der Konzentrationsbereich der einzelnen Verbindungen ist im Rahmen der Untersuchungen (Kap. 4.3.3, S.133) angegeben.

9.5.2.2 Inkubationsansatz

Die Aktivität der Elastase wurde nach folgendem Ansatz bestimmt:

	Ansatz	Testleerwert	Substrat- Leerwert	Puffer- Leerwert	100 %-Wert
Testlösung	465 µL	465 µL			
Puffer		135 µL	475 µL	600 µL	465 µL
Enzym	10 µL				10 µL
Substrat	125 µL		125 µL		125 µL
Inhibitor	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
<i>Gesamtvol.</i>	1100 µL	1100 µL	1100 µL	1100 µL	1100 µL

Temperatur: 37 °C
 pH-Wert: 7.5
 Inkubationszeit: 60 min

9.5.2.3 Methodik

Die Eppendorf-Gefäße wurden zunächst mit der in TRIS-HCl-Puffer gelösten Substanz beschickt. Die Enzymlösung wurde hinzupipettiert, gemischt und für 5 Minuten im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Nach dieser Aufwärmzeit wurde die enzymatisch katalysierte Reaktion durch die Zugabe der Substratlösung gestartet. Nach 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad stoppte man die Reaktion durch Zugabe des Trypsin-Inhibitors. Anschließend wurde die Absorption des enzymatisch freigesetzten 4-Nitroanilins bei 405 nm gemessen. Der 100 % Wert und die Leerwerte wurden in der gleichen Weise behandelt wie die Testansätze.

Die Leerwerte sollten verhindern, dass Eigenabsorptionen von Substrat, Puffer oder von der Testsubstanz das Ergebnis beeinflussen. Der Testleerwert bestand aus der in dem Puffer gelösten Substanz, der Substratleerwert enthielt die in den Ansätzen eingesetzte Konzentration an Substrat verdünnt mit Puffer und für den Puffer-Leerwert wurde nur TRIS-HCl-Puffer verwendet. Die erhaltenen Messwerte wurden von den entsprechenden Absorptionen der Testlösungen abgezogen.

Der Lösung des 100 %-Wertes setzte sich aus dem Enzym, dem Substrat und Puffer zusammen. Hiermit wurde die ungehemmte Aktivität des Enzyms bestimmt. Die ermittelten Absorptionen der gemessenen Verbindungen wurden prozentual auf diesen Wert bezogen.

Eine Testreihe beinhaltete die dreifache Bestimmung für eine Konzentration. Für eine IC_{50} Bestimmung wurden 3-4 Testreihen an einem Tag durchgeführt und gemittelt.

9.5.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Da die Enzymaktivität in den Chargen nicht immer konstant war, wurde bei jedem neu gelieferten Enzym bestimmt, wie viel 4-Nitroanilin es pro μg Protein abspaltete. Dadurch konnte ermittelt werden, in welcher Konzentration das Enzym eingesetzt werden musste, um in einem einheitlichen Aktivitätsbereich während der Testungen zu bleiben.

Die Messungen wurden bei gleichbleibender Substratmenge und unterschiedlichen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Die gesamte Menge des Enzyms (100 μg laut Angabe des Herstellers) wurde in Aqua bidest. gelöst. 10 μL dieser Stammlösung wurde mit 190 μL Puffer versetzt. Diese Enzymlösung wurde in einem Bereich von 5 μL bis 30 μL (37.5 ng – 225 ng) eingesetzt. Wie in Kapitel 9.5.2.2 (S.226) beschrieben, wurde zunächst die benötigte Menge TRIS-HCl-Puffer (bezogen auf ein Gesamtvolumen von 600 μL) mit der Enzymlösung vermischt und inkubierte diese Mischung für 5 min bei 37 °C im Wasserbad. Durch Zugabe der Substratlösung wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe des Inhibitors beendet. Anschließend wurde die Absorption der Lösungen bei 405 nm bestimmt. Im weiteren Verlauf der Testungen wurde daraufhin die Konzentration an Enzym eingesetzt, dessen Inkubationslösung eine Absorption zwischen 0.500 und 0.800 hatte. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die Aktivität des Enzyms in jeder Testreihe in dem gleichen Bereich lag.

Die Ermittlung der Aktivität wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt.

9.5.2.5 Einfluss der Substratkonzentration

Die Messungen wurden durchgeführt, wie in Kapitel 9.5.2.2 (S.226) beschrieben, mit einer konstanten Enzymmenge und variierender Substratmenge. Von einer 1.4 mM Substratlösung wurden 25 μL – 150 μL eingesetzt.

Auch diese Untersuchung wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt.

9.5.2.6 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Bei diesem Wert handelt es sich um die InhibitorKonzentration, bei der die ungehemmte Aktivität des Enzyms um 50 % reduziert wird. Die Angabe erfolgte für Extrakte und Fraktionen in $\mu\text{g/mL}$ und für Reinsubstanzen sowohl in $\mu\text{g/mL}$ als auch in mmol/L (Tab. 4.4-1, S.145).

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde die hemmende Aktivität der Testverbindungen in 5 unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Jede Konzentration unterlag einer dreifachen Bestimmung. Die gemessenen Absorptionen wurden gemittelt und die gemessenen Leerwerte (Testleerwert, Pufferleerwert, Substratleerwert) subtrahiert. Diesen Wert prozentual bezogen auf den 100%-Wert ergab die Restaktivität des Enzyms und somit dessen Hemmung.

Eine Testreihe wurde 3 bis 4 Mal wiederholt, und aus den ermittelten Hemmungen wurden die Mittelwerte bestimmt. Nach Auftragung der prozentualen Hemmung gegen die logarithmische Konzentration der Testsubstanzen konnte eine Gerade erhalten werden, aus der man durch logarithmische Regression den IC_{50} -Wert ablesen konnte. Zur Erstellung der Diagramme wurde Excel verwendet.

9.6 Caco-2 Zellmodell

9.6.1 MATERIAL

9.6.1.1 Geräte

Sterilbank	Sterilgard [®] Class II Type A/B3, SG400DIN The Baker Company (Sanford, USA)
Zentrifuge	Sigma 3K20
CO ₂ -Brutschrank	CB 150, Fa. Binder (Tuttlingen)
Wasserbad	GFL (Burgelwedel)
Mikroskop	ICM 405, Zeiss
Pipetten	Pipetman [®] , Rainin Instrument Co, Inc. (USA) Multipipette [®] plus, Fa. Eppendorf (Hamburg) Portable Pipet [®] Aid, Becton Dickinson Labware (France)

9.6.1.2 Chemikalien

FITC-Dextran	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
D,L-Propranolol	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Verapamil	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)

Die getesteten Verbindungen wurden selbst isoliert.

9.6.1.3 Caco-2 Zellen

Material

Kulturflaschen (175 cm ²)	Nunclon [™] Surface, Nalge Nunc International Corp. (Naperville, USA)
Zentrifugenröhrchen	Nunc [™] , Nalge Nunc International Corp.
Earle's Medium 199	PAA Lab. (Linz / Österreich)
PBS Dulbecco's	Gibco BRL (Paisley, Scotland)
HBSS (pH 7.4)	Hanks-Balanced Salt Solution (H-8264, Sigma-Aldrich)
FKS (Fötales Kälberserum)	Foetal Bovine Serum, Gibco BRL (Paisley, Scotland)
Penicillin/Streptomycin	10000 IU/mL, 10000 UG/mL, Gibco BRL

Trypsin-EDTA in HBSS	Gibco BRL (Paisley, Scotland)
Transwell [®] Filter Kammersystem	Polycarbonat, 12 mm ID, 0.4 µm, 12 well Corning Costar (Bodenheim), Cat. No. 3401

Herkunft

Die Zellen wurden von Dr. B. Glodny (Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, WWU Münster) zur Verfügung gestellt. Für die Absorptionsstudien wurden Zellen der Passage 14-32 verwendet.

9.6.2 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Die Caco-2 Zellen wurden in Earles Medium 199 mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum und 2.5 mL der Mischung von Penicillin und Streptomycin in einem Brutschrank mit 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

2 Mal pro Woche wurde das verbrauchte Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. 1 mal pro Woche, bei einer Dichtigkeit von ca. 80 %, wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abpipettiert und Restmedium durch Spülen mit calcium- und magnesiumfreien Puffer (PBS) entfernt. Zur Ablösung der Zellen wurde Trypsin-EDTA in die Kulturflasche gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37 °C im Brutschrank, wurde Trypsin durch einen Überschuss an Medium inaktiviert und abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in frischen Medium suspendiert und ein Aliquot davon auf weitere Kulturflaschen verteilt.

9.6.3 BESTIMMUNG DER STABILITÄT DER VERBINDUNGEN

Für die Absorptionsstudien war es wichtig, dass die Substanzen in gelöster Form zur Verfügung standen und während der Testung unter den Bedingungen stabil blieben.

Die getesteten Verbindungen waren in den angegebenen Konzentrationen im Transport-Puffer klar löslich. Um die Löslichkeit der Zimtsäure in dem HBSS-Puffer zu erhöhen, wurden in diesem einen Fall 0.5 % DMSO hinzugefügt.

Weiterhin wurde die Stabilität der eingesetzten Verbindungen im Transportpuffer bestimmt. Die Iridoide (Harpagosid, 8-PCHG, Pagosid) und die Phenylethanoide (Acteosid, Isoacteosid, 6'-O-Acetylacteosid) wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL in HBSS-Puffer gelöst und zu 0.1 mg/mL und 0.01mg/mL weiter verdünnt. Die Überprüfung der Stabilität erfolgte im

Wasserbad bei 37 °C über einen Zeitraum von 150 min. In festgesetzten Zeitabständen (Kap. 9.6.5.2, S.233) wurden Proben entnommen und mittels HPLC analysiert (Kap. 9.1.2.1, S.208). Ebenso wurde die Stabilität der Verbindungen im Extrakt bestimmt. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, als noch nicht genügend Reinsubstanzen zur Verfügung stand, und diente der ersten, vorläufigen Charakterisierung der Substanzen. Weiterhin konnte in dieser Weise eine Beeinflussung der Permeabilität durch weitere Inhaltsstoffe des Extraktes beobachtet werden. Der Extrakt (1mg/mL) wurde sowohl in Wasser als auch in dem Transportpuffer (HBSS) gelöst. Die Untersuchung erfolgte über 48 Stunden bei 37°C im Wasserbad, bei 4 ° im Kühlschrank und bei –20 °C in der Tiefkühltruhe. Die gefrorenen Analysen wurden vor dem HPLC Lauf bei Raumtemperatur aufgetaut. Hier sollte nicht nur die Stabilität der Substanzen während des Testverlaufes sondern auch die Stabilität während der Lagerzeit zwischen der Testung und den HPLC-Analysen bestimmt werden.

9.6.4 BESTIMMUNG DER INTEGRITÄT DES ZELLMONOLAYERS

Die Dichtigkeit des Monolayers und die Ausbildung der Tight Junctions wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen untersucht.

9.6.4.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Gerät: EVOM™ mit STX2-Elektroden
World Precision Instruments (Berlin)

Vor der Testung wurde die Integrität der Zellschicht mit der Messung des TEER bestimmt. Dazu wurde das Evom® Gerät, ein Voltohmmeter mit STX-2 Elektroden, genutzt. Der elektrische Widerstand wurde in den 3 Öffnungen jedes Inserts bestimmt. Zur Ermittlung des TEER pro cm² bildete man aus diesen 3 Messungen den Mittelwert, subtrahierte den Leerwert (Widerstand des Filters ohne Zellschicht) und rechnete diesen Wert mit der unten angegebenen Formel auf die Fläche des Filters um.

$$x = a \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4}$$

x = TEER [Ω /cm²]

a = gemessener Widerstand [Ω]

d = Durchmesser des Filters [cm]

9.6.4.2 FITC-Dextran

Die Konfluenz des Monolayers wurde weiterhin noch durch die Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten von FITC-Dextran 4400 (Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran) überprüft. Auf Grund der hohen Hydrophilie und der Molekülgröße zeigte die Substanz eine geringe Permeabilität bei einer geschlossenen Monolayerschicht [Cogburn et al., 1991]. Es wurden Transportstudien (Kap. 9.6.5.1, S.233) mit einer 0.1 mM Lösung von FITC-Dextran in HBSS durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC und einer Kalibrierung mit externem Standard.

Gerät: Waters 2690 Alliance™
 Stationäre Phase: LiChroCART® 250-4, LiChrospher® 100, RP-18 (5µm)
 Vorsäule: LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100 RP-18, (5µm)
 Fa. Merck (Darmstadt)
 Software: Millennium³² Version 3.20, Waters Corporation
 Detektor: Waters 474 Scanning Fluorescence Detektor
 Fluoreszenzanregung: 493 nm
 Emission: 526 nm
 Injektionsvolumen: 10 µL, 100 µL
 Mobile Phase: Acetonitril (A); 0.1 % TFA in Aqua millipore (B)
 Isokratisch 50 % A, 50 % B

Retentionszeit	Geradengleichung	r ²	Konzentrationsbereich
7.5 min	y = 1080253x + 627741	0.9986	22 – 0.088 µg/mL

Es wurde für FITC-Dextran ein Permeabilitätskoeffizient von $0.2 \times 10^{-6} \pm 0.04 \times 10^{-6}$ cm/s (n = 23) ermittelt. Dieser Wert wurde erreicht ab einem TEER von 200 Ω/cm². Mit einer höheren Dichte konnte der P_{eff} von FITC-Dextran nicht vermindert werden.

FITC-Dextran wurde nicht nur zur Integritätsbestimmung eingesetzt, es wurde auch als Kontrollsubstanz für eine niedrige Permeabilität mitgeführt.

9.6.5 TRANSPORTSTUDIEN

9.6.5.1 Transwell®-Filter

Für eine Testung wurden die Zellen direkt auf die Transwell-Filter, bestehend aus Polycarbonat mit einer Porengröße von 0.4 µm, ausgesät. Dazu wurden sie trypsiniert und auf eine Zellzahl von 120000 Zellen/mL verdünnt. Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. 0.5 mL (entsprechend 60000 Zellen) dieser Zellsuspension wurde in den apikalen Bereich der im Medium vorinkubierten Filter pipettiert (entsprechend 60000 Zellen/Filter). Auf diesen Filtern wuchsen die Zellen bei einer Atmosphäre von 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ zu einem ausdifferenzierten Monolayer heran. Das verbrauchte Medium wurde 3 mal pro Woche gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 22 Tagen konnte mit den Filtern getestet werden.

9.6.5.2 Durchführung

9.6.5.2.1 Apikal zu basolateral

Vor der Testung wurden alle Lösungen und Puffer auf 37 °C erwärmt.

Das Medium wurde von den Filtern entfernt. Die Zellen wurden 2 mal mit Transportpuffer gespült und anschließend im Transport-Puffer für 30 min bei 37 °C (Wasserbad) äquilibriert. Danach wurde der TEER gemessen. Zellschichten unter einem Wert von 250 Ω/cm² wurden nicht für die Testung zugelassen.

Zu dem Testzeitpunkt 0 min wurde im apikalen Bereich der Transportpuffer gegen die in HBSS gelöste Testsubstanz ausgetauscht. In festgelegten Zeitabständen (20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 min und 150 min) wurde aus dem basolateralen Bereich 1 mL entnommen (0.5 mL verblieb im basolateralen Kompartiment) und durch frischen Transportpuffer ersetzt. Die Testung wurde im schüttelnden Wasserbad durchgeführt. Nach 150 min wurde aus dem apikalen Bereich ebenfalls die Lösung entnommen und durch HBSS ersetzt. Zum Schluss der Testung wurde noch einmal der Widerstand gemessen.

Die Proben wurden bis zur Quantifizierung mittels HPLC (Kap. 9.1.2.1, S.208) bei –20 °C gelagert.

Die weiteren Untersuchungen (Kap 9.6.5.2.2 – Kap. 9.6.5.2.4, S.234) wurden durchgeführt, um Information über den Transportweg der getesteten Substanzen zubekommen.

9.6.5.2.2 Basolateral zu apikal

Die Testung erfolgte hier in „umgekehrter“ Richtung [Artursson et al., 1996]. Der Transportpuffer im basolateralen Bereich wurde gegen 1.5 mL der Testlösung ausgetauscht. In festgelegten Zeitabständen (Kap. 9.6.5.2.1, S.233) wurden aus dem apikalen Bereich Proben (0.2 mL) abgenommen und durch frischen HBSS-Puffer ersetzt. Nach 150 min wurde die Testung beendet.

Die Proben wurden mittels HPLC quantifiziert.

9.6.5.2.3 Zugabe von Verapamil

Verapamil wurde als P-Glykoprotein-Hemmer [Hunter et al., 1993] verwendet. Es wurde dem HBSS-Puffer in einer Konzentration von 0.2 mM zugesetzt. Anstelle des normalen HBSS wurde diese Lösung während der Testungen als Transport-Puffer und Lösungsmittel der Substanzen verwendet. Die Inkubationszeit des Filters bei 37 °C wurde von 30 min auf 60 min erhöht.

9.6.5.2.4 Zugabe von EDTA

Bei dieser Testreihe wurde dem Transportpuffer EDTA-Na₂ zugesetzt. Es diente dazu, die Tight Junctions zu öffnen und die Permeabilität der Substanzen, die paracellular transportiert wurden, zu erhöhen [De Boer et al., 1991]. Gegenüber einer 1 mM Lösung von EDTA-Na in HBSS konnte eine 2.5 mM Lösung den Transport von Harpagosid noch steigern. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Testung eine Konzentration von 2.5 mM verwendet. Die Inkubationszeit wurde ebenfalls auf 60 min verlängert.

9.6.5.2.5 Propranolol

Neben FITC-Dextran wurde ebenfalls Propranolol als Kontrollsubstanz während einer Testung mitgeführt. Mit einem P_{eff} von $55.03 \times 10^{-6} \pm 1.13 \times 10^{-6}$ cm/s stand diese Substanz als Beispiel für eine hohe Permeabilität.

Die Bestimmung der Permeabilität wurde durchgeführt wie in Kap 9.6.5.2.1 beschrieben.

Die Quantifizierung in HBSS erfolgte photometrisch bei $\lambda = 290$ nm. Vor jeder Bestimmung wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0.09 µg/mL bis 90 µg/mL erstellt.

Gerät: Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-260
Wellenlänge: 290 nm

9.6.5.3 Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{eff})

Der Transport der Substanzen in diesem Testsystem wurde als effektiver Permeabilitätskoeffizient (P_{eff}) in cm/s ausgedrückt. Er stellt die Geschwindigkeit dar, mit der eine Substanz den Monolayer passiert und lässt sich nach folgender Formel [Sattler, 1997] berechnen:

$$P_{\text{eff}} = \frac{V_A}{c_0 \cdot A \cdot 60} \cdot \frac{dc}{dt}$$

V_A = Volumen im Akzeptor [mL]

c_0 = Anfangskonzentration im Donor [$\mu\text{g/mL}$]

A = Fläche des Filters [cm^2]

$\frac{dc}{dt}$ = Flussrate [$\mu\text{g/s}$]

Die Flussrate wurde aus der Steigung der Geraden von kumulativer Masse gegen die Zeit ermittelt.

Die Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE) wurden wie folgt berechnet [Sachs, 1999]:

$$SD = \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

9.7 Antiinflammatorische und spasmolytische Aktivität von *H. procumbens* DC.

9.7.1 HEMMUNG DER PHOSPHOLIPASE A₂²

ETYA-Lösung

5,8,11,14-Eicosatetrainsäure 1.19 mg/mL DMSO

Ca-Ionophor-Lösung

Calcium-Ionophor A 23187 0.21 mg/mL DMSO

TPA-Lösung

0.49 mg 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat / mL DMSO

Inhibitor-Lösung

Acetonitril 16

Methanol 15

0.1 % EDTA-Na₂ 1

+ Tridecansäure (interner Standard, 1.5 µg/2 mL)

+ NDGA (6 µg/2 mL)

50 mL Buffy Coat, erhalten aus menschlichem Blut verschiedener Spender, wurde bei 2000 g für 2 min zentrifugiert. Der thrombozytenreiche Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zur Entfernung noch vorhandener Erythrozyten wiederum für 1 – 2 min bei 2000 g zentrifugiert. Die so erhaltene, mit Thrombozyten angereicherte Fraktion, wurde anschließend bei 1000 g 15 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS (Zusatz von 3.7 % EDTA-Na₂) resuspendiert und auf das vorherige Volumen aufgefüllt. Die Suspension wurde erneut bei 1000 g für 15 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf ungefähr 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. 0.1 mL dieser Suspension ergab nach Verdünnung mit 0.9 mL PBS eine Absorption von 0.1 bei 800 nm.

² Für die Testung des Extraktes danke ich Frau Schulze Elfringhoff und Herrn Professor Dr. M. Lehr (Münster).

5 μL ETYA-Lösung, 5 μL der Test- und Kontrolllösungen (DMSO) und 2.0 mL Thrombozytensuspension wurden in Zentrifugengläsern 10 min lang bei 37 °C in einem schüttelnden Wasserbad vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 μL Ca-Ionophor-Lösung bzw. 5 μL TPA-Lösung (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat). Im ersten Fall wurde die Reaktion nach 1 min durch Zugabe von 2 mL der Inhibitor-Lösung abgestoppt, im zweiten nach 10 min.

Nach 10 min im Eisbad wurde die Suspension 10 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 15 mL Wasser verdünnt und über Festphasenextraktionssäulen (RP 18) aufgereinigt. Die Säulen wurden vor der Aufgabe der Probe mit Methanol (10 mL), Wasser (5 mL) und 0.1 % wässrige EDTA Na_2 -Lösung (5 mL) gespült. Nach Waschen der Säule mit Wasser wurde die adsorbierte Arachidonsäure mit 3 x 1 mL Methanol eluiert. Diese Lösung wurde vor der HPLC-Untersuchung mit Wasser zu 10 mL verdünnt.

Mit Ca-Ionophor als Stimulator wurde der Extrakt mit einer Konzentration von 10 mg/mL eingesetzt. Bei der Stimulation mit dem Phorbol-ester wurden 10.7 mg/mL und 1.3 mg/mL verwendet.

Injektionsvolumen: 2 mL

Stationäre Phase: Lichrospher 100 RP18 (5 μm), 250 x 4 mm

Mobile Phase: Acetonitril / H_2O 63 : 37 + 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
mit ortho-Phosphorsäure auf pH 7.4 eingestellt

Flussrate: 1 mL / min

Detektion: 200 nm

9.7.2 HEMMUNG VON LIPOXYGENASEN³

9.7.2.1 5-Lipoxygenase

Isotonische PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)

NaCl		8.00 g
KCl		0.20 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O		1.00 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		0.15 g
KH ₂ PO ₄		0.20 g
H ₂ O bidest.	ad	1000.0 mL

Hypertonische PBS-Lösung

NaCl		24.00 g
KCl		0.60 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O		3.00 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		0.45 g
KH ₂ PO ₄		0.60 g
H ₂ O bidest.	ad	1000.0 mL

EDTA-Lösung

Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O		2.87 g
NaCl		0.21 g
H ₂ O bidest.	ad	100.0 mL

CaCl₂-Lösung

CaCl ₂ · 2H ₂ O		0.147 g
NaCl		0.800 g
H ₂ O bidest.	ad	100.0 mL

³ Ich danke Herrn Professor Dr. Wiegrebe (Regensburg), seinem Arbeitskreis und insbesondere Herrn K. Zierreis für die Einführung in diese Testsysteme.

Inhibitor-Lösung

Methanol	100 mL
Acetonitril	100 mL
NDGA-Lösung	0.4 mL
PGB ₂ -Lösung	0.3 mL

Isolierung der Granulozyten

1 L Rinderblut (Metzgerei, Regensburg) wurde direkt von dem frisch geschlachteten Rind zur Verhinderung der Gerinnung in 100 mL EDTA-Na₂-Lösung gegeben. Das Blut wurde zur Abscheidung des Plasmas und der Thrombozyten 20 min bei 200 g zentrifugiert. Die Erythrozyten dieses Sediments wurden durch die Zugabe von 400 mL Aqua bidest. lysiert. Nach 30 s wurde diese Reaktion durch die Zugabe von 200 mL hypertotonischer PBS-Lösung gestoppt. Die Lösung wurde 10 min bei 485 g zentrifugiert, das Pellet wurde in isotonischer PBS resuspendiert und erneut 10 min bei 485 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 mL isotonischem PBS-Puffer resuspendiert und vorsichtig auf 10 mL Histo-Paque 1.077 (Fa. Sigma) pipettiert. Nach 45 min Zentrifugation bei 675 g wurde der Überstand entfernt und das Pellet (Granulozyten) in 20 mL isotonischer PBS resuspendiert.

Die Zelldichte wurde anschließend auf 1×10^7 Zellen / mL eingestellt.

Untersucht wurden eine wässrige Lösung des Extraktes (0.1 mg/mL) und eine wässrige Lösungen von Harpagosid (100, 50, 10 μ M).

Durchführung der Testung

2.4 mL der Granulozytensuspension wurden in ein Zentrifugenglasröhrchen gegeben und bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 min wurde 10 μ L Testlösung bzw. Aqua bidest. als Kontrolle dazugegeben. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 6 mL CaCl₂-Lösung, nach 20 min wurde 3 μ L Ca-Ionophor-Lösung (Fa. Sigma) hineinpipettiert und nach 25 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3 mL Inhibitor-Lösung gestoppt. Nach 20 min. im Eisbad wurde die Suspension 15 min lang bei 3300 g und 0 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde für die HPLC-Untersuchung mittels RP18-Extraktionssäulen (Octadecyl C18, 500 mg; Fa. Baker) aufgereinigt. Die mit 5 mL Wasser verdünnte Probe wurde auf die mit Wasser gespülte Säule gegeben. Zuerst wurden Begleitstoffe mit 2 x 5 mL

Wasser weggespült, anschließend wurden die Substanzen mit 3 x 1 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde mit 3 mL verdünnt und mittels HPLC analysiert.

Stationäre Phase: Nucleosil 100-7C18 (250 x 4 mm)
Injektionsvolumen: 2 mL
Mobile Phase: THF / Methanol / H₂O / Essigsäure 25 : 30 : 45 : 0.1
Mit NH₃ auf pH 5.5
Flussrate: 0.9 mL / min
Detektion: 270 nm

Die prozentuale Hemmung der 5-Lipoxygenase wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\% \text{Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{Q_T}{Q_K} \right)$$

Q_T = Quotient der Peakfläche von LTB₄ und PGB₂ (interner Standard) im Chromatogramm der Testlösung

Q_K = Quotient der Peakfläche von LTB₄ und PGB₂ (interner Standard) im Chromatogramm der Kontrolllösung

Für den Gesamtextrakt wurde weiterhin die Beeinflussung der 5-Lipoxygenase im zerstörten Zellsystem untersucht.

Die Gewinnung und Aufreinigung der Granulozyten erfolgte wie in Kapitel 9.7.2.1 (S.238) beschrieben. Nach Einstellung der Zellsuspension auf die vorgeschriebene Zellzahl wurde die Zellmembran durch 90 sec im Ultraschallbad zerstört. Dies hatte zur Folge, dass kein Ca-Ionophor eingesetzt werden musste. Die weitere Inkubation, Aufreinigung und HPLC-Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

9.7.2.2 12-Lipoxygenase aus Thrombozyten

Arachidonsäurelösung

Arachidonsäure	0.45 mg
Methanol	1.00 mL

Interner Standard (MMA)

1-Monomethoxyanthrachinon	0.16 mg
Methanol	1.00 mL

Inhibitor-Lösung

Methanol	100 mL
Acetonitril	100 mL
NDGA-Lösung	0.4 mL
MMA-Lösung	0.3 mL

Das EDTA-Blut (Kap. 9.7.2.1, S.238) wurde mit isotonischer PBS 1 : 1 verdünnt und bei 200 g 20 min zentrifugiert. Die thrombozytenreiche Oberphase wurde vorsichtig abpipettiert und erneut bei 200 g 15 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet, bestehend aus den Thrombozyten, wurde mit isotonischer PBS gewaschen und 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in isotonischer 30 mL isotonischer PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 5×10^7 Zellen / mL eingestellt.

Der Gesamtextrakt wurde in den Konzentrationen 100 µg/mL, 50 µg/mL und 10 µg/mL (DMSO) eingesetzt.

In Zentrifugengläsern wurden 2.4 mL der eingestellten Thrombozytensuspension vorgelegt. Zum Zeitpunkt 0 min wurde die Testlösung bzw. die Kontrolllösung hinzupipettiert. Nacheinander wurden nach 5 min 0.6 mL Calciumchloridlösung, nach 10 min 10 µL Arachidonsäurelösung und nach 15 min 3 µL Calcium-Ionophorlösung hinzugefügt. Die Enzymreaktion wurde nach 20 min durch die Zugabe von 3 mL Inhibitor-Lösung abgestoppt. Die Suspension wurde bei 500 g und 0 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Aufreinigung über die Baker Bond Säulen (Kap. 9.7.2.1, S.238) mittels HPLC untersucht.

Stationäre Phase:	Lichrospher 100RP-18 (5 μ M) 250 x 4 mm, Merck	
Injektionsvolumen:	2 mL	
Mobile Phase:	1. MeOH / H ₂ O / CH ₃ COOH	77 : 23 : 0.1
	Mit NH ₃ auf pH 5.5	
	2. MeOH / Acetonitril / H ₂ O / CH ₃ COOH	35 : 35 : 30 : 0.1
	Mit NH ₃ auf pH 5.5	
Flussrate:	1.1 mL / min	
Detektion:	232 nm	

Die prozentuale Hemmung der 12-Lipoxygenase wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{Q_T}{Q_K} \right)$$

Q_T = Quotient der Peakfläche von 12-HETE und MMA (interner Standard) im Chromatogramm der Testlösung

Q_K = Quotient der Peakfläche von 12-HETE und MMA (interner Standard) im Chromatogramm der Kontrolllösung

9.7.2.3 12-Lipoxygenase aus Mäusehauthomogenisat

2 Tage vor der Testung wurde der Rücken der Mäuse mit einem elektrischen Rasierapparat rasiert.

Die Tiere wurden durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Die Haut wurde vorsichtig mittels Skalpell und Schere entfernt und von Fettresten, Blutgefäßen und Haaren befreit. Die Haut wurde mit eisgekühlter PBS-Lösung 3 Mal gewaschen und mit der Schere zerkleinert. Dabei sollte die Temperatur der Epidermis mit Hilfe eines Eisbades bei 0 °C gehalten werden. Die PBS-Lösung wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Hautstücke zwischen Papiertüchern getrocknet. Das Nassgewicht wurde bestimmt. Die Haut wurde mit eisgekühlter Pufferlösung versetzt (50 mg/mL) und mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Nach der Filtration der Suspension über Glaswolle, wurden 2.4 mL zur Testung in Zentrifugenröhrchen einpipettiert. Die Proben wurden wie in Kapitel 9.7.2.2 (S.241) beschrieben inkubiert und aufgearbeitet.

Zusätzlich zu den Proben und Kontrollen wurde bei dieser Bestimmung noch ein Korrekturwert (K_S) bestimmt. Da die Mäuseepidermis auch nativ 12-HETE bildete, musste

diese Menge von dem ermittelten Wert abgezogen werden. Dazu wird das Homogenisat mit allen Bestandteilen gemischt und direkt mit dem Inhibitor versetzt.

Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 100 µg/mL DMSO getestet.

$$\% \text{Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{Q_T - K_S}{Q_K - K_S} \right)$$

$Q_T, Q_K =$ Kap. 8.7.2.2
 $K_S =$ Peakfläche der Korrekturlösung (natives 12-HETE)

9.7.3 HETCAM-ASSAY⁴

Testpellet: 5 mg Natriumlaurylsulfat
mit oder ohne Testsubstanz (Extrakt, Hydrocortison)
1 mL 2.5 % Agaroselösung (heiß)

Positivkontrolle: Hydrocortison (50 µg/Pellet)

Testung: Pagosid (40 µg/ Pellet, 100 µg/ Pellet)

Die bebrüteten Hühnereier wurden 65-70 h bei 37 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit in horizontaler Lage unter mehrmaligem Drehen inkubiert. Auf der stumpfen Seite wurde mit einer Pinzette vorsichtig die Eierschale und die Luftsackmembran entfernt. Um eine Absenkung des Eidotters hervorzurufen, wurde vorher von der spitzen Seite her 15-20 mL Eiweiß abgesaugt. Die präparierten Eier wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt und für weitere 75 h bei den oben angegebenen Bedingungen inkubiert.

Auf die gebildete Chorionallantoismembran (Durchmesser 2 cm) wurde ein Testpellet (10 µL) gelegt. Für jede zu untersuchende Verbindung wurden 15-20 Eier verwendet. Weiterhin wurden Agarose-Pellets und Natriumlaurylsulfathaltige Pellets (50 µg) als Blindwerte mitgeführt.

⁴ Herrn PD Dr. D. Paper (Regensburg) danke ich für die Testung von Pagosid.

Auswertung

Das Natriumlaurylsulfat führt auf dieser Membran zu einer entzündlichen Reaktion, die durch eine sternförmige Vaskularisierung im Pelletbereich sichtbar wird. Die entzündungshemmende Wirkung einer Verbindung wird darüber bestimmt, in wieweit die durch Natriumlaurylsulfat entzündliche Reaktion vermindert werden konnte. Die Aderbildung geht in dem Fall deutlich zurück. Die Eier, die eine positive Reaktion zeigten, werden in Prozent angegeben, und stehen als Maß für eine antiinflammatorische Wirkung.

9.7.4 SPASMOLYSETEST AM MEERSCHWEINCHENILEUM⁵

Zur Untersuchung der spasmolytischen Aktivität des Extraktes wurden 1cm große Stücke des Ileums von Hartly-Meerschweinchen (Charles River, Salzfild), verwendet. Die Tiere lebten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und bekamen Nahrung ad libitum bis zu dem Abend vor der Testung. Die Meerschweinchen wurden mit Dimethylether getötet, der Ileum wurde entnommen und nach Entfernung des Gekröses wurde er in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7.4) aufbewahrt. Dieser Puffer wurde ebenfalls zum Spülen des Darms während der Testung verwendet. Die Darmabschnitte wurden in Organbäder mit einem Fassungsvermögen von 10 mL gehängt. Dort wurden sie mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begastem Puffer umspült. Diese Organbäder wurden in eine Organbadapparatur (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, WWU Münster) gehängt, die durch einen zirkulierenden Wasserstrom die Temperatur konstant auf 37 °C hielt. Die Kontraktion des Darms wurde mit Hilfe eines Hebelarmes aufgenommen.

Vor der Testung wurde der Darm in dem Puffer 30 min äquilibriert und anschließend bis zur Erhaltung konstanter Kontraktionen mit dem Agonisten kontrahiert. Der Darm wurde gründlich mit dem Puffer gespült und der Extrakt wurde in die Organbadlösung gegeben. 5 min später wurde der Agonist hinzupipettiert.

Zur Testung des Extraktes wurde Acetylcholin in einer Konzentration von 55 nM verwendet. Für die Untersuchung mittels einer Konzentrations-Wirkungskurve wurde Barium in den folgenden Konzentrationen (µM) verwendet: 1, 10, 100, 1000, 9875, 29218

⁵ Ich danke Herrn Dr. H. Fleer (Münster) für die Durchführung dieser Testung.

Extrakt: 1 mg/mL Aqua millipore
 0.1 mg/mL Aqua millipore

Positivkontrolle: 140 nM Atropin-HCl
 100 µM Papaverin

Auswertung

Die Kontraktion der Kontrolle, die vor und nach dem Extrakt getestet worden ist, wurde als 100 % definiert. Die Kontraktion des Extraktes wurde prozentual auf diesen Wert bezogen.

Bei der Konzentrations-Wirkungskurve wurde auf den Maximal-Effekt bezogen und setzte diesen für den Agonisten als 100 % fest.

Literaturverzeichnis

A

Abou-Mandour, A. Pharmazeutisch-Biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum*
2. Mitteilung: Gewebekulturen von *Harpagophytum procumbens*.
Planta Medica **31**: 238-244; 1977.

Adam, K.P.; Becker, H.
Analytik biogener Arzneistoffe. Pharmazeutische Biologie Bd. 4.
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2000.

Agostini, A.; Guiso, M.; Marini-Bettolo, R.; Martinazzo, G.
5-Deoxylamioside, a new Iridoid Glucoside from *Lamium amplexicaule* L. and reassignment of OH-6
Configuration of Ajugol.
Gazzetta Chimica Italiana **112**: 9-12; 1982.

Alsenz, J.; Steffen, H.; Alex, R.
Active Apical Secretory Efflux of the HIV Protease Inhibitors Saquinavir and Ritonavir in Caco-2 Cell
Monolayers.
Pharmaceutical Research **15**: 423-428; 1998.

Andary, C.; Wylde, R.; Laffite, C.; Privat, G.; Winternitz, F.
Structures of Verbascoside and Orobanchoside, Caffeic Acid Sugar Esters from *Orobancha rapum-genistae*.
Phytochemistry **21**(5): 1123-1127; 1982.

Artursson, P.
Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over
Intestinal Absorptive (Caco-2) Cells.
Journal of Pharmaceutical Sciences **79**: 476-482; 1990.

Artursson, P.; Karlsson, J.
Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human
intestinal epithelial (Caco-2) cells.
Biochemical and Biophysical Research Communication **175** (3): 880-885; 1991.

Artursson, P.; Magnusson, C.
Epithelial Transport of Drugs in Cell Cultures. II: Effect of Extracellular Calcium Concentration on the
Paracellular Transport of Drugs of Different Lipophilicities across Monolayers of Intestinal Epithelial (Caco-)
Cells.
Journal of Pharmaceutical Sciences **79**: 595-600; 1990.

Artursson, P.; Karlsson, J.; Ocklind, G.; Schipper, N.
Studying transport processes in absorptive epithelia.
In: Shaw, A.J., ed. *Epithelial Cell Culture: A Practical Approach.*; Oxford: IRL Press; 1996: p. 111-133.

B

Baggiolini, M.; Schnyder, J.; Bretz, U.; Dewald, B.; Ruch, W.
Cellular mechanisms of proteinase release from inflammatory cells and the degradation of extracellular proteins.
Ciba Foundation Symposium **75**: 105-121; 1979.

Baghdikian, B.; Lanhers, M. C.; Fleurentin, J.; Ollivier, E.; Maillard, C.; Balansard, G.; Mortier, F.
An analytical Study, anti-inflammatory and analgesic Effects of *Harpagophytum procumbens* and
Harpagophytum zeyheri.
Planta Medica **63**: 171-176; 1997.

Baghdikian, B.; Ollivier, E.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Rathelot, P.; Balansard, G.
Two New Pyridine Monoterpene Alkaloids by Chemical Conversion of a Commercial Extract of
Harpagophytum procumbens.
Journal of Natural Products **62**: 211-213; 1999a.

- Baghdikian, B.; Guiraud-Dauriac, H.; Ollivier, E.; N'Guyen, A.; Dumenil, G.; Balansard, G.
Formation of Nitrogen-Containing Metabolites from the main Iridoids of *Harpagophytum procumbens* and *H. zeyheri* by Human Intestinal Bacteria.
Planta Medica **65**: 164-166; 1999b.
- Barthe, L.; Woodley, J.; Houin, G.
Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies.
Fundam. Clin. Pharmacol. **13**: 154-168; 1999.
- Bauer, K. H.; Frömming, K.-H.; Führer, C.
Pharmazeutische Technologie.
Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1993.
- Bauersfeld, H. J.
Über weitere Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1974.
- Becker, H.; Richter, S.
Eine einfache dünn-schichtchromatographische Untersuchung von *Harpagophytum procumbens* für das Apotheken-Labor.
Pharmazeutische Zeitung **14** (120): 441-442; 1975.
- Benito, P. B.; Lanza, A. M. D.; Sem, A. M. S.; De Santos Galindez, J.; Matellano, L. F.; Gomez, A. S.; Martinez, M. J. A.
Effects of some Iridoids from Plant Origin on Arachidonic Acid Metabolism in Cellular Systems
Planta Medica **66**: 324-328; 2000.
- Benkrief, R.; Ranarivelo, Y.; Skaltsounis, A.-L.; Tillequin, F.; Koch S.M.; Pusset, J.; Sévenet, T.
Monoterpene Alkaloids, Iridoids and Phenylpropanoid Glycosides from *Osmanthus austrocaledonica*.
Phytochemistry **47** (5): 825-832; 1997.
- Betti, G. J. R.
Harpagophytum procumbens DC. Complexe d'espèces: Description comparative du développement végétatif .
Origine, prevention et conséquences de la confusion entre.
Epos Rivista Italiana 1-15; 1994.
- Bianco, A.; Esposito, P.; Guiso, M.; Scarpati, M. C.
Iridoide X. - Sul procumbide, diastereoisomere dell'antirrhinoside
Gazzetta Chimica Italiana **101**: 764-773; 1971.
- Bianco, A.; Guiso, M.; Ivarone, C.; Trogolo, C.
20 / Iridoids XVI. Structure and Configuration of Mioporoside, a new Iridoid Glucoside.
Gazzetta Chimica Italiana **105**: 175-184; 1975.
- Bianco, A.; Caciola, P.; Guiso, M.; Ivarone, C.; Trogolo, C.
Iridoids. XXXI. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of free Iridoid Glucosides in D₂O Solution.
Gazzetta Chimica Italiana **111**: 201-206; 1981.
- Birkofer, L.; Kaiser, C.; Thomas, U.
Acteosid und Neoacteosid; Zuckerreste aus *Syringa vulgaris* L..
Z. Naturforsch. **23b**: 1051-1058; 1968.
- Bode, W.; Meyer, E.; Powers, J. C.
Human Leucocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-ray Crystal Structures, Mechanismen, Substrate Specificity, and Mechanism-Based Inhibitors.
Biochemistry **28**: 1951-1963; 1989.
- Boros, C. A.; Stermitz, F. R.
Iridoids. An updated Review. Part I.
Journal of Natural Products **53**: 1055-1147; 1990

Brossier, Y.

Harpagophytum procumbens DC.: Apport bénéfique de la phytothérapie dans le traitement de la maladie inflammatoire chronique.

Thèse de doctorat, Université de Toulouse; 1986.

Burger, J. H. W.; Brandt, E.V.; Ferreira, D.

Iridoid and Phenolic Glycosides from *Harpagophytum procumbens*.

Phytochemistry **26** (5): 1453-1457; 1987.

C

Caesar, W.

Teufelskralle zur Therapie der Osteoarthritis.

Deutsche Apotheker Zeitung **24**: 1-5 Supplement; 2001.

Camenish, G.; Alsenz, J.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.

Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight.

European Journal of Pharmaceutical Sciences **6**: 313-319; 1998.

Camenish, G.; Folkers, G.; van de Waterbeemd; H.

Shapes of membrane permeability - lipophilicity curves: Extension of theoretical models with an aqueous pore pathway.

European Journal of Pharmaceutical Sciences **6**: 321-329; 1998.

Caprasse, M.

Description, identification et usages thérapeutiques de la "Griffe du Diable": *Harpagophytum procumbens* DC." J.Pharm.Belg. **35**: 143-149; 1980.

Chantre, P.; Cappelaere, A.; Leblan, D.; Guedon, D.; Vandermader, J.; Fournie, B.

Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis.

Phytomedicine **7**: 177-183; 2000.

Chatterjee, S. S.; Koch, E.; Jaggy, H.; Krzeminski, T.

In-vitro und *In-vivo*-Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkung von oligomeren Procyanidinen in einem *Crataegus*-Extrakt aus Blättern mit Blüten.

Arzneimittel-Forschung **47**: 821-825; 1997.

Chaudhuri, R. K.; Afifi-Yazar, F. Ü.; Sticher, O.

¹³C Spectroscopy of naturally occurring Iridoid Glucosides and their Acylated Derivates.

Tetrahedron **36**: 2317-2326; 1980.

Chrubasik, S.

Biopharmazeutische Qualität und klinische Wirksamkeit von Zubereitungen aus Harpagophytumextrakt.

In: Chrubasik, S.; Wink, M., Rheumatherapie mit Phytopharmaka.;

Stuttgart: Hippokrates Verlag 1997: p. 77-85.

Chrubasik, S.; Ziegler, R.

Wirkstoffgehalt in Arzneimitteln aus *Harpagophytum procumbens* und Klinische Wirksamkeit von Harpagophytum-Trockenextrakt.

In: Loew, D.; Rietbrock, N., eds. Phytopharmaka II-Forschung und Klinische Anwendung.; 1996: p. 101-114. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag

Chrubasik, S.; Sporer, F.; Wink, M.

Zum Harpagosidgehalt verschiedener Trockenextraktpulver aus *Harpagophytum procumbens*.

Forsch. Komplementärmedizin **3**: 6-11; 1996.

Chrubasik, S.; Sporer, F.; Wink, M.

Zum Wirkstoffgehalt in Teezubereitungen aus *Harpagophytum procumbens*.

Forsch. Komplementärmedizin **3**: 116-119; 1996.

- Chrubasik, S.; Zimpfer, C.; Schütt, U.; Ziegler, R.
Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain.
Phytomedicine **3** (1): 1-10; 1996.
- Chrubasik, S.; Schmidt, A.; Junck, H.; Pfisterer, M.
Wirksamkeit und Wirtschaftlichkeit von Teufelskrallenwurzelextrakt bei Rückenschmerzen: Erste Ergebnisse einer therapeutischen Kohortenstudie.
Forsch. Komplementärmedizin **4**: 332-336; 1997.
- Chrubasik, S.; Junck, H.; Breitschwerdt, H.; Conradt, C.; Zappe, H.
Effectiveness of Harpagophytum extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind study.
European Journal of Anaesthesiology **16**: 118-129; 1999.
- Chung, S. M.; Park, E. J.; Swanson, S. M.; Wu, T. C.; Chiou, W. L.
Profound effect of plasma protein binding on the polarized transport of furosemide and verapamil in the Caco-2 model.
Pharmaceutical Research **18**: 544-547; 2001.
- Circosta, C.; Occhiuto, F.; Ragusa, S.; Trovato, A.; Tumino, G.; Briguglio, F.; de Pasquale, A. A
Drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC. II. Cardiovascular activity.
Journal of Ethnopharmacology **11**: 259-274; 1984.
- Cogburn, J. N.; Donovan, M. G.; Schasteen, C. S.
A Model of Human Intestinal Absorptive Cells. 1. Transport Barrier.
Pharmaceutical Research **8**: 210-216; 1991.
- Cometa, F.; Tomassini, L.; Nicoletti, M.
Phenylpropanoid glycosides. Distribution and pharmacological activity.
Fitoterapia **64** (3): 195-217; 1993.
- Costa de Pasquale, R.; Busa, G.; Circosta, C.; Lauk, L.; Ragusa, S.; Ficarra, P.; Occhiuto, F.
A Drug used in traditional Medicine: *Harpagophytum procumbens* DC III. Effects on Hyperkinetic ventricular arrhythmias by reperfusion.
Journal of Ethnopharmacology **13**: 193-199; 1985.
- Czygan, F. C.
Harpagophytum -Teufelskralle.
Zeitschrift für Phytotherapie **8**: 17-20; 1987.
- Czygan, F. C.; Krüger, A.
Pharmazeutisch-Biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum*-3.Mitteilung: Zur Verteilung des Iridoid-Glykosids Harpagosid in den einzelnen Organen von *Harpagophytum procumbens* und *Harpagophytum zeyheri*.
Planta Medica **31**: 305-307; 1977.
- Czygan, F. C.; Krüger, A.; Schier, W.; Volk, O. H.
Pharmazeutisch-biologische Untersuchungen der Gattung *Harpagophytum* (Bruch.) DC ex Meissn..
Deutsche Apotheker Zeitung **36** (117): 1431-1434; 1977.
- D**
- Damtoft, S.; Jensen, S. R.; Nielsen, B. J.
¹³C and ¹H NMR Spectroscopy as a tool in the Configuration Analysis of Iridoid Glucosides.
Phytochemistry **20** (129): 2717-2732; 1981.
- Damtoft, S.; Jensen, S. R.; Nielsen, B. J.
Structural Revision of Ajugol and Myoporoside.
Tetrahedron Letters **23** (11): 1215-1216; 1982.

De Boer, A.G.; Noach, A. B. J.; Roosemalen, M.C.M.; Kurosaki, J.; Breimer, D.D.
Effect of Apical and / or Basolateral Application of EDTA on the Permeability of Hydrophilic Compounds in a Human Intestinal Epithelial Cell-Line (Caco-2).
Pharmaceutical Research **8**: S215; 1991.

del Carmen Recio, M.; Giner, R.M.; Mánez, S.; Ríos, J.L.
Structural Consideration on the Iridoids as anti-inflammatory Agents.
Planta Medica **60**: 232-234; 1994.

Deshun, L.; Sadler, J. E.
Leukozyte Elastase.
In: Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F., eds. Handbook of Proteolytic Enzymes.
Academic Press; 1998: p. 54-60.

Díaz, A.; Fernández, L.; Ollivier, E.; Martín, T.; Villaescusa, L.; Balansard, G.
Reverse-Phase High Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Harpagoside, Scorodioside and Verbascoside from *Scrophularia scorodonia*: Quantitative Determination of Harpagoside.
Planta Medica **64**: 94-95; 1998.

Dittrich, C.
Harpagophytum procumbens DC.
Österreichische Apotheker Zeitung **3** (28): 53-54; 1974.

Duband, F.
Harpagophytum procumbens DC: Recherche d'une activité antiinflammatoire aigue.
Thèse de doctorat, Université de Clermont; 1986.

E

Eich, J.; Schmidt, M.; Betti, G.
HPLC Analysis of Iridoid Compounds of *Harpagophytum* taxa: Quality control of pharmaceutical drug material.
Pharmaceutical and Pharmacological Letters **8** (2): 75-78; 1998.

Eichler, O.; Koch, C.
Über die antiphlogistische, analgetische und spasmolytische Wirksamkeit von Harpagosid, einem Glykosid aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Arzneimittel-Forschung **20** (1): 107-109; 1970.

Erdös, A.; Fontaine, R.; Friehe, H.; Durand, R.; Pöppinghaus, T.
Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie verschiedener Extrakte, sowie des Harpagosids aus *Harpagophytum procumbens* DC.
Planta Medica **34**: 97-108; 1978.

Europäisches Arzneibuch.; 1997: p. 1723-1724.
Nachtrag 2001

F

Faller, A.
Der Körper des Menschen.
Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1988.

Feistel, B.; Gaedcke, F.
Analytische Identifizierung von Radix Harpagophyti procumbentis und zeyheri.
Zeitschrift für Phytotherapie **21**: 246-251; 2000.

Ficarra, P.; Ficarra, R.; Tommasini, A.
Analisi mediante HPLC di una droga della medicina tradizionale: *Harpagophytum procumbens* DC. Nota I
Soc. Ital. Farmacol, 250-252; 1985.

Fickentscher, K.

Beitrag zur chemischen Konstitution des Harpagids.

Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1963.

Fiebich, B. L.; Heinrich, M.; Hiller, K. O.; Kammerer, N.

Inhibition of TNF-alpha synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by Harpagophytum extract SteiHap 69.

Phytomedicine **8** (1): 28-30; 2001.

Fleer, H.

Spasmolytische und antiemetische Wirkung. Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen an *Plantago lanceolata* L. und *Cynara scolymus* L.

Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 2000.

Fleurentin, F.; Mortier, F.

TEUFELSKRALLENWURZEL-Entzündungshemmende und analgetische Wirkungen von *Harpagophytum procumbens* und *H. zeyheri*.

In: Chrubasik, S.; Wink, M., Rheumatherapie mit Phytopharmaka.;

Stuttgart: Hippocrates Verlag 1997: p. 68-76.

Franz, G.; Czygan, F. C.; Abou-Mandour, A.

Untersuchung der Gattung *Harpagophytum*.

Planta Medica **44**: 218-220; 1982.

Friebolin, H.

Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie.

Weinheim: WILEY-VCH; 1999.

Frohne, D.; Jensen, U.

Systematik des Pflanzenreichs.

Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1998.

G

Gan, L.-S.; Hsyu, P.-H.; Pritchard, J. F.; Thakker, D.

Mechanism of Intestinal Absorption of Ranitidine and Ondansetron: Transport across Caco-2 Cell Monolayers.

Pharmaceutical Research **10**: 1722-1725; 1993.

Gawlik, I. C.

Entwicklung und Durchführung von *in vitro*-Testsystemen zur Charakterisierung der antipsoriasischen Aktivität neuer Anthrone.

Dissertation, Universität Regensburg; 1996.

Ghisalberti, E. L.

Biological and Pharmacological Activity of Naturally Occuring Iridoids and Secoiridoids.

Phytomedicine **5** (2): 147-163; 1998.

Giner, R. M.; Villalba, M. L.; del Carmen Recio, M.; Mánez, S.; Gray, A. I.; Ríos, J. L.

A new Iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *pseudoauriculata*.

Journal of Natural Products **61**: 1162-1163; 1998.

Göbel, H.; Gerber, W. D.; Niederberger, U.; Windeck, T.; Langheinrich, M.

Placebokontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie zur Analyse der Wirkmechanismen von Harpagophytum-Extrakt LI 174 (sensorische, motorische und vaskuläre Muskelreagibilität).

Jahrestagung der Gesellschaft für Phytotherapie Münster, Abstracts S.56-57; 1999.

Göbel, H.; Heinze, A.; Ingwersen, M.; Niederberger, U.; Gerber, D.

Harpagophytum-Extrakt LI 174 (Teufelskralle) bei der Behandlung unspezifischer Rückenschmerzen

Schmerz **15**: 15; 2001.

Guillerault, L.; Ollivier, E.; Elias, R.; Balansard, G.
Determination of Harpagide, 8-Para-Coumaroyl Harpagide, and Harpagoside by High Performance Liquid Chromatography in *Harpagophytum procumbens* Drugs and in a commercial Extract.
Journal of liquid Chromatography **17** (13): 2951-2960; 1994.

Guiso, M.; Bettolo, M.; Agostini, A.
4 / Iridoids-XIII: Ajugoside and Ajugol: Structure and Configuration.
Gazzetta Chimica Italiana **104**: 25-33; 1974.

H

Hammer, H.-E.
Konstitution des Procumbids und ein Beitrag zur Kenntnis weiterer Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1974.

Hänsel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E.
Pharmakognosie und Phytopharmazie.
Heidelberg: Springer; 1999.

Hansen, C.
Die Afrikanische Teufelskralle.
Deutsche Apotheker Zeitung **2**: 153-157; 2000.

Hegnauer, R.
Chemotaxonomie der Pflanzen.; Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin
Bd. 5 (1968): p. 299-303; Bd. 9 (1990): p. 216-219

Hegnauer, R.; Kooiman, P.
Die systematische Bedeutung von iridoiden Inhaltsstoffen im Rahmen von Wettstein's Tubiflorae.
Planta Medica **33**: 1-33; 1978.

Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt; R.T.
Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability.
Gastroenterology **96**: 736-749; 1989.

Hilgers, A. R.; Conradi, R. A.; Burton, P. S.
Caco-2 Cell Monolayers as a Modell for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa.
Pharmaceutical Research **7** (9): 902-910; 1990.

Hovgaard, L.; Bronstedt, H.; Buur, A.; Bundgaard, H.
Drug Delivery Studies in Caco-2 Monolayers. Synthesis, Hydrolysis, and Transport of O-Cyclopropane Carboxylic Acid Ester Prodrugs of Various beta-Blocking Agents.
Pharmaceutical Research **12**: 387-392; 1995.

Hsin-Kai Wu; Wu-chang Chuang; Shuenn-Jyi Sheu
Separation of nine Iridoids by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography.
Journal of Chromatography A **803**: 179-187; 1998.

Hunter, J.; Hirst, B. H.; Simmons, N. L.
Drug Absorption limited by P-Glycoprotein-Mediated Secretory Drug Transport in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Layers.
Pharmaceutical Research **10**: 743-749; 1993.

I

Ihlenfeldt, H. D.; Hartmann, H.
Die Gattung *Harpagophytum* (BURCH.) DC.ex MEISSN (Monographie der afrikanischen Pedaliaceae).
Mitt. Staatsinst. Allg.Bot.Hamburg **13**: 15-47(69); 1970.

Irvine, J. D.; Takahashi, L.; Lockhart, K.; Cheong, J.; Tolan, J. W.; Selick, H.; Grove, J. R.
MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening.
Journal of Pharmaceutical Sciences **88** (1): 28-33; 1999.

Iwu, M. M.
Handbook of African Medicinal Plants.
Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Press; 2000.

J

Jensen, S. R.
Caffeoyl Phenylethanoid Glycosides in *Sanango racemosum* and in the Gesneriaceae.
Phytochemistry **41**: 777-783; 1996.

Jiménez, C.; Riguera, R.
Phenylethanoid Glycosides in Plants: Structures and Biological Activity.
Natural Products Report **12**: 591-606; 1994.

Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W.; Wimmer, H.
Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden.
Weinheim: VCH; 1993.

Jürgenliemk, G.
Phenolische Inhaltsstoffe aus dem Kraut von *Hypericum perforatum* L. - analytische, biopharmazeutische und pharmakologische Aspekte.
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 2001.

K

Kajimoto, T.; Hidaka, M.; Shoyama, K.; Nohara, T.
Iridoids from *Scrophularia ningpoensis*.
Phytochemistry **28**: 2701-2704; 1989.

Kamm, W.; Jonczyk, A.; Jung, T.; Luckenbach, G.; Raddatz, P.; Kissel, T.
Evaluation of absorption enhancement for a potent cyclopeptidic $\alpha_2\beta_3$ -antagonist in a human intestinal cell line (Caco-2).
European Journal of Pharmaceutical Sciences **10**: 205-214; 2000.

Kämpf, R.
Harpagophytum procumbens DC. Teufelskralle.
Schweizerische Apotheker Zeitung **15** (114): 337-342; 1976.

Kaneko, T.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Duc, N.M.
Iridoids and Iridoid Glucosides from fruits of *Crescentia cujete*
Phytochemistry **46**: 907-910; 1997

Kasai, R.; Ogawa, K.; Ohtani, K.; Ding, J.; Chen, P. Q.
Chem. Pharm. Bull. **39**: 927-929; 1991.

Kernan, M. R.; Amarquaye, A.; Lu Chen, J.; Chan, J.; Sesin, D.
Antiviral phenylethanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*.
Journal of Natural Products **61**: 564-570; 1985.

Kikuchi, T.; Matsuda, S.; Kubo, Y.; Namba, T.
New Iridoid Glucosides from *Harpagophytum procumbens* DC..
Chem. Pharm. Bull. **31** (7): 2296-2301; 1983.

Kimura, Y.; Okuda, H.; Nishibe, S.; Arichi, S.
Effects of Caffeoylglycosides on Arachidonate Metabolism in Leukocytes.
Planta Medica **92**: 148-153; 1997.

Kobayashi, H.; Karasawa, H.; Miyase, T.; Fukushima, S.
Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. IV. Isolation and Structures of Two New Phenylpropanoid Glycosides, Cistanosides C and D.
Chem. Pharm. Bull. **32**: 3880-3885; 1984.

Kobayashi, H.; Oguchi, H.; Takizawa, N.; Miyase, T.; Ueno, A.; Usmanhani, K.; Ahmad, M.
New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa*.
Chem. Pharm. Bull. **35** (8): 3309-3314; 1987.

Koch, J. K. H.
Über ein Chinon und weitere Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1970.

Kong, L. D.; Wolfender, J.-L.; Cheng, C. H. K.; Hostettmann, K.; Tan, R. X.
Xanthine Oxidase Inhibitors from *Brandisia hancei*.
Planta Medica **65**: 744-746; 1999.

Kotzé, A. F.; Lueßen, H. L.; de Leeuw, R. J.; de Boer, B. G.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E.
N-Trimethyl Chitosan Chloride as a Potential Absorption Enhancer Across Mucosal Surfaces: *In-Vitro* Evaluation in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2).
Pharmaceutical Research **14** (9): 1197-1202; 1997.

Kruse, S. O.
Phytochemische Arbeiten zu *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt..
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 2000.

Kwasniewski, V.
Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe der Sekundärwurzel von *Harpagophytum procumbens* DC. und zur Frage ihres eventuellen Ersatzes durch einheimische Drogen.
Deutsche Apotheker Zeitung **118**: 49-50; 1978.

L

Lahloub, M. F.; Zaghoul, A. M.; El-Khayaat, S. A.; Afifi, M. S.; Sticher, O.
2'-O-Acetylpoliumoside: A New Phenylpropanoid Glycoside from *Orobancha ramosa*.
Planta Medica **57**: 481-485; 1991.

Lang, V. B.; Langguth, P.; Ottiger, C.; Wunderli-Allensbach, H.; Rognan, D.; Rothen-Rutishauser, B.; Perriard, J.-C.; Lang, S.; Biber, J.; Merkle, H. P.
Structure-Permeation Relations of Met-enkephalin Peptide Analogues on Absorption and Secretion Mechanisms in Caco-2 Monolayers.
Journal of Pharmaceutical Sciences **86**: 846-853; 1997.

Lanhers, M. C.; Fleurentin, J.; Mortier, J.; Vinche, A.; Younos, C.
Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of an Aqueous Extract of *Harpagophytum procumbens*.
Planta Medica **58**: 117-123; 1992.

Larionova, N. I.; Gladysheva, I. P.; Gladyshev, D.
Human leukocyte elastase inhibition by Bowman-Birk soybean inhibitor.
FEBS Letters **404**: 245-248; 1997.

Laudahn, D.; Gladitz, J.; Windeck, T.; Langheinrich, M.
Offene, multizentrische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Harpagophytum-Extrakt LI 174 bei Patienten mit chronischen nicht radikulären Rückenschmerzen.
Jahrestagung der Gesellschaft für Phytotherapie Münster, Abstracts S. 115-116; 1999.

Leblan, D.; Chantre, P.; Fournie, B.
Harpagophytum procumbens in the treatment of knee and hip osteoarthritis. Four-month results of a prospective, multicenter, double-blind trial versus diacerhein.
Joint Bone Spine **67**: 462-467; 2000.

Lehr, M.

Hemmstoffe der cytosolischen Phospholipase A₂ als potentielle nichtsteroidale Antiphlogistika mit neuartigem Wirkungsmechanismus

Habilitationsschrift; Ludwig-Maximilians-Universität München; 1997

Lehr, M.; Schulze Elfringhoff, A

Comparison of the Inhibition of the Cytosolic Phospholipase A₂-mediated Arachidonic Acid Release by Several Indole-2-carboxylic Acids and 3-(Pyrrol-2-yl)propionic Acids in Bovine and in Human Platelets

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. **333**: 312-314; 200

Leonhardt, H.

Innere Organe; In: dtv-Atlas der Anatomie Bd. 2

Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1979

Leukel, P.

C-2-substituierte Anthronderivate mit modifizierten Redoxeigenschaften: Synthese, 5-Lipoxygenasehemmung und antiproliferative Aktivität.

Dissertation, Universität Regensburg; 1994.

Lichti, H.; von Wartburg, A.

Zur Konstitution von Harpagosid.

Tetrahedron Letters **15**: 835-843; 1964.

Lichti, H.; von Wartburg, A.

178. Die Struktur des Harpagosids.

Helvetica chimica acta **49** (5): 1552-1580; 1966.

Loew, D.

Harpagophytum procumbens DC. - Eine Übersicht zur Pharmakologie und Wirksamkeit.

Erfahrungsheilkunde **2**: 74-79; 1995.

Loew, D.; Schuster, O.; Möllerfeld, J.

Stabilität und biopharmazeutische Qualität.

Voraussetzung für Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit von *Harpagophytum procumbens*.

In: Loew, D.; Ziegler, R., eds. Phytopharmaka 2 - Forschung und klinische Anwendung.; 1996: p. 83-93.

Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag

Loew, D.; Mollerfeld, F.; Schrodter, A.; Puttkammer, S.; Kaszkin, M.

Investigations on the pharmacokinetic properties of Harpagophytum extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis *in-vitro* and *ex-vivo*

Clinical Pharmacology and Therapeutics **69**: 356-364; 2001.

Löffler, G.

Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.

Berlin, Heidelberg, New Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2001.

Löser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A.

Inhibition of Granulocyte Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivates from *Cimicifuga racemosa*.

Planta Medica **66**: 751; 2000.

Lux, R. E.

Über ein Glukosid der Wurzel von *Harpagophytum procumbens*.

Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: 1-75; 1960.

M

Máñez, S.; Alcaraz, M. J.; Payá, M.; Ríos, J. L.; Hancke, J. L.

Selected Extracts from Medicinal Plants as Anti-Inflammatory Agents.

Planta Medica **56**: 656; 1990.

- Marchesan, M.; Paper, D.H.; Hose, S.; Franz, G.
Investigation of the Antiinflammatory Activity of Liquid Extracts of *Plantago lanceolata* L.
Phytotherapy Research **12**: S33-S34; 1998
- McLeod, D. W.; Revell, P.; Robinson, B. V.
Investigations of *Harpagophytum procumbens* (Devil's claw) in the treatment of experimental inflammation and arthritis in the rat.
British Journal of Pharmacology **66**: 140P-141P; 1979.
- Meier, B.; Sticher, O.
High-Performance liquid chromatography of iridoid and secoiridoid glucosides.
Journal of Chromatography **138**: 453-457; 1977.
- Melzig, M. F.; Löser, B.; Lobitz, G. O.; Tamayo-Castillo, G.; Merfort, I.
Inhibition of granulocyte elastase activity by caffeic acid derivatives.
Pharmazie **54**: 712; 1999.
- Melzig, M. F.; Löser, B.; Bader, G.; Papsdorf, G.
Echtes Goldrutenkraut als entzündungshemmende Droge.
Zeitschrift für Phytotherapie **21**: 67-70; 2000.
- Melzig, M. F.; Löser, B.; Ciesielski, S.
Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants.
Pharmazie **56**: 967-970; 2001.
- Menninger, H.; Burkhardt, H.; Lambusch, M.; Rissotto, R.
Proteolytische Abläufe im Knorpelstoffwechsel und ihre Beeinflussung durch Antirheumatika.
Arzneimittel-Forschung **32**: 1376-1381; 1982.
- Metz, W. A.; Peet, N. P.
Inhibitors of human neutrophil elastase as a potential treatment for inflammatory diseases.
Exp. Opin. Ther. Patents **9** (7): 851-868; 1999.
- Miyase, T.; Koizumi, A.; Ueno, A.; Noro, T.; Kuroyanagi, S.; Fukushima, Y.; Akiyama, Y.; Takemoto, T.
Studies on the acyl glycosides from *Leucoscepttrum japonicum* (Miq) Kitamura et Murata.
Chem. Pharm. Bull. **30**: 2732; 1982.
- Moussard, C.; Alber, D.; Toubin, M. M.; Thevenon, N.; Henry, J. C.
A Drug used in traditional Medicine, *Harpagophytum procumbens*: No evidence for NSAID-like effect on whole blood eicosanoid production in human.
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **46**: 283-286; 1992.
- Murai, F.; Tagawa, M.; Inouye, H.; Ishida, T.; Inoue, M.
A New Iridoid Glucoside, Nepetariaside, from *Nepeta cataria*
Chem. Pharm. Bull. **35**: 2533-2537; 1987
- Murai, M.; Tamayama, Y.; Nishibe, S.
Phenylethanoids in the Herb of *Plantago lanceolata* and Inhibitory Effect on Arachidonic Acid -Induced Mouse Ear Edema.
Planta Medica **61**: 479-480; 1995.
- Mutschler, E.
Arzneimittelwirkungen.
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2001.
- N**
- Nakajima, K.; Powers, J. C.; Ashe, B. M.; Zimmermann, M.
Mapping the Extended Substrate Binding Site of Cathepsin G and Human Leukocyte Elastase.
The Journal of Biological Chemistry **254**: 4027-4032; 1997.

Nishimura, H.; Yamaguchi, T.; Sasaki, H.; Morota, T.; Yanagisawa, T.; Sato, T.; Chin, M.; Mitsuhashi, H.
Enzyme Inhibitory Activities of Phenethyl Alcohol Glykosides from *Rehmannia glutinosa*.
Planta Medica **56**: 684; 1990.

Noe, C. R.; Freissmuth, J.
Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: separation after derivatization with S-(-)-1-phenylethylamine.
Journal of Chromatography A **704**: 503-512; 1995.

O

Occhiuto, F.; Circosta, C.; Ragusa, S.; Ficarra, P.; Costa de Pasquale, R.
A Drug used in traditional Medicine: *Harpagophytum procumbens* DC. IV. Effects on some isolated Muscle Preparations.
Journal of Ethnopharmacology **13**: 201-208; 1985.

P

Pachaly, P.
Arbeitsvorschriften - Teufelskralle.
Deutsche Apotheker Zeitung **41**(122): 2059; 1982.

Pachaly, P.; Barion, J.; Sin, K. S.
Isolierung und Strukturaufklärung neuer Iridoidglykoside aus *Scrophularia koraiensis*.
Pharmazie **49**: 150-155; 1994.

Pade, V.; Stavchansky, S.
Estimation of the Relative Contribution of the Transcellular and Paracellular Pathway to the Transport of Passively Absorbed Drugs in the Caco-2 Cell Culture Model.
Pharmaceutical Research **14** (9): 1210-1215; 1997.

Pade, V.; Stavchansky, S.
Link between Drug Absorption Solubility and Permeability Measurements in Caco-2 Cells.
Journal of Pharmaceutical Sciences **87**: 1604-1607; 1998.

Pardo, F.; Perich, F.; Torres, R.; Delle Monache, F.
Phytotoxic Iridoid Glucosides from the roots of *Verbascum thapsus*.
Journal of Chemical Ecology **24** (4): 645-652; 1998.

Potterat, O.; Msonthi, J. D.; Hostettmann, K.
Four Iridoid Glucosides and a Phenylpropanoid Glycoside from *Sesamum angolense*.
Phytochemistry **27**(8): 2677-2679; 1988.

Potterat, O.; Saadou, M.; Hostettmann, K.
Iridoid Glucosides from *Rogeria adenophylla*.
Phytochemistry **30**: 889-892; 1991.

Poukens-Renwart, P.; Tits, M.; Angenot, L.
Quantitative Densitometric Evaluation of Harpagoside in the Secondary Roots of *Harpagophytum procumbens*
Journal of Planar Chromatography **9**: 199-202; 1996.

Pourrat, H.; Texier, O.; Vennat, B.; Pourrat, A.
Etude de la stabilité des iridoïdes d'*Harpagophytum procumbens* DC au cours de la préparation de poudres et d'atomisats.
Ann.pharm.franc. **43**: 601-606; 1985.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch
Berlin: de Gruyter Verlag; 1994.

R

Rajic, A.; Kweifio-Okai, G.; Macrides, T.; Sandemann, R. M.; Chandler, D. S.; Polya, G. M.
Inhibition of Serine Proteases by Anti-Inflammatory Triterpenoids.
Planta Medica **66**: 206-210; 2000.

Ravn, H.; Nishibe, S.; Sasahara, M.; Xuebo, L.
Phenolic compounds from *Plantago asiatica*.
Phytochemistry **29**: 3627-3631; 1990.

Reglin, F.
Die Teufelskralle-Eine wertvolle Hilfe in der Rheumatherapie.
Praxis-telegramm 16-17; 1995.

Reinhard, E.
Pharmazeutische Biologie Bd. 1.
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2001.

Richter, T.
Gut beraten mit Teufelskralle?
Zeitschrift für Phytotherapie **22**: 43; 2001.

Rimpler, H.
Biogene Arzneistoffe.
Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 1999.

Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G.
Instrumentelle pharmazeutische Analytik.
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1992.

S

Sachs, L.
Angewandte Statistik.
Berlin: Springer Verlag; 1999.

Sakurai, A.; Kato, T.
A new glykoside, kusagin, isolated from *Clerodendron trichotomum*.
Bulletin of the Chemical Society of Japan **56**: 1573-1574; 1983.

Sattler, S.
Isolierung, Pharmakokinetik, Löslichkeitsverbesserung und Absorptionsstudien am Caco-2 Zellkulturmodell.
Dissertation, Universität Marburg; 1997

Scarpati, M.; Delle Monache, F.
Isolamento dal *Verbascum sinuatum* di due nuovi glucosidii: il verbascoside e l'isoverbascoside.
Annali di Chimica **53**: 356-367; 1963.

Scharf, K.-H.; Weber, W.
Stoffwechselphysiologie
Hannover: Schroedel Schulbuchverlag; 1987

Schier, W.
Handelssorten von *Harpagophytum procumbens* DC.
Deutsche Apotheker Zeitung **45** (114): 1800-1801; 1974.

Schier, W.; Bauersfeld, H. J.
Handelssorten von *Harpagophytum procumbens* DC.
Deutsche Apotheker Zeitung **21**(113): 795-796; 1973.

Schilling, G., H. M.; Mayer, W.
Z. Naturforsch. **37**: 1633-1635; 1982.

- Schmelz, H.; Hämmerle, H. D.; Springorum, H. W.
Analgetische Wirkung eines Teufelskrallenwurzel-Extraktes bei verschiedenen chronisch-degenerativen Gelenkerkrankungen.
In: Chrubasik, S.; Wink, M., Rheumatherapie mit Phytopharmaka.;
Stuttgart: Hippokrates Verlag 1997: p. 86-89.
- Schmidt, M.; Eich, J.; Kreimeyer, J.; Betti, G.
Anbau der Teufelskralle.
Deutsche Apotheker Zeitung **47** (138): 4540-4549; 1998.
- Schmidt, S.
Phytotherapie beim rheumatischen Formenkreis .
Archiv für Arzneitherapie **3**: 266-271; 1978.
- Seifert, K.; Schöpp, E.; Johne, S.; Hesse, M.
163. Iridoide aus *Verbascum nigrum* L..
Helvetica chimica acta **65**: 1678-1684; 1982.
- Seifert, K.; Schmidt, J.; Lien, N. T.; Johne, S.
Iridoide aus *Verbascum*-Arten.
Planta Medica **51**: 409-411; 1985.
- Shinguh, Y.; Imai, K.; Yamazaki, A.; Inamura, N.; Shima, I.; Wakabayashi, A.; Higashi, Y.; Ono, T.
Biochemical and Pharmacological characterization of FK706, a novel elastase inhibitor.
European Journal of Pharmacology **337**: 63-71; 1997.
- Skrzypek, Z.; Wysokinska, H.; Swiatek, L.; Wroblewski, A. E.
Phenylpropanoid Glycosides from *Penstemon serrulatus*.
Journal of Natural Products **62**: 127-129; 1999.
- Soulimani, R.; Younos, C.; Mortier, F.; Derrieu, C.
The role of stomachal digestion on the pharmacological activity of plant extracts, using as an example extracts of *Harpagophytum procumbens*.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **72**: 1532-1536; 1994.
- Steinmeyer, J.
Zur Wirkung von Antirheumatika auf die Granulozytenenzyme Elastase und Kathepsin G.
Dissertation, Universität Bonn; 1987.
- Steinmeyer J.; Kalbhen, D. H.
Zur Wirkung von Antiphlogistika auf Granulozytenenzyme Elastase und Kathepsin G.
Arzneimittel-Forschung **39**: 1208-1211; 1989.
- Stellmach, B.
Elastase. In: Bestimmungsmethoden Enzyme. Darmstadt: Steinkopf; 1988: p. 107-112.
- Sticher, O.
Iridoide.
Pharm.Acta Helv. **44**: 453-463; 1969.
- Sticher, O.
Die aktuelle Droge: *Harpagophytum procumbens*.
Deutsche Apotheker Zeitung **32** (117): 1279-1284; 1977.
- Sticher, O.
Die Gehaltsbestimmung von Iridoiddrogen.
Pharm.Acta Helv. **52**: 20-32; 1977.
- Sticher, O.; Meier, B.
Quantitative Bestimmung von Harpagosid in Wurzeln von *Harpagophytum procumbens* mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).
Deutsche Apotheker Zeitung **34**: 1592-1594; 1980.

Stierstorfer, N. J.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Harpagophytum procumbens* DC.
Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1961.

Straßburger, E.

Lehrbuch der Botanik.

Stuttgart: G. Fischer-Verlag; 1998.

Stryer, L.

Biochemie.

Spektrum Akademischer Verlag; 1994

Sturm, S.; Pichler, D.; Stuppner, H.

Analyse der Iridoidglykoside aus *Harpagophytum procumbens* mittels Kapillarelektrophorese und HPLC-MS.
Kongreß, Innsbruck S42; 1999.

Sudo, H.; Ide, T.; Otsuka, H.; Hirata, E.

Premnethanosides A und B: phenylethanoids from leaves of *Premna subscandens*.

Phytochemistry **46**: 1147-1150; 1997.

Swiatek, L.; Lehmann, D.; Sticher, O.

Iridoidglucoside von *Scrophularia lateriflora* Trautv. (Scrophulariaceae).

Pharm.Acta Helv. **56**: 3744; 1981.

T

Tanaka, Y.; Taki, Y.; Sakane, T.; Nadai, T.; Sezaki, H.; Yamashita, S.

Charakterization of Drug Transport through Tight-Junction Pathway in Caco-2 Monolayer: Comparison with Isolated Rat Jejunum and Colon.

Pharmaceutical Research **12**: 523-528; 1995.

Tannergren, C.; Langguth, P.; Hoffmann, K.-J.

Compound mixtures in Caco-2 cell permeability screens as a means to increase screening capacity.

Pharmazie **56**: 337-342; 2001.

The Enzyme Database Brenda, The Enzyme Database - ECNumber: '3.4.21.37'.

Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.

Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.

Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1999.

Tippler, P.; Syrovets, T.; Loew, D.; Simmet, T. H.

Harpagophytum procumbens: Wirkung von Extrakten auf die Eicosanoidbiosynthese in Ionophor A23187-stimuliertem menschlichen Vollblut.

In: Loew, D.; Ziegler, R., eds. Phytopharmaka II - Forschung und klinische Anwendung.; 1996: p. 95-100.

Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag

Tomita, M.; Hayashi, M.; Awazu, S.

Comparison of Absorption-Enhancing Effect between Sodium Caprate and Disodium Ethylenediaminetetraacetate in Caco-2 Cells.

Biol. Pharm. Bull. **17**: 753-755; 1994.

Tordera, M.; Ferrándiz, M. L.; Alcaraz, M. J.

Influence of Anti-Inflammatory Flavonoids on Degranulation and Arachidonic Acid Release in Rat Neutrophils.

Z. Naturforsch. **49 c**: 235-240; 1994.

Travis, J.; Giles, P. J.; Porcelli, L.; Reilly, C. F.; B. R.; Powers, J.

Human leucocyte elastase and cathepsin G: structural and functional characteristics.

Ciba Foundation Symposium **75**: 51-68; 1979.

Tunmann, P.; Hammer, H. E.

Konstitution des Procumbids.; Liebigs Ann. Chem. **712**: 138-145; 1968.

Tunmann, P.; Lux, R.

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Deutsche Apotheker Zeitung **102** (40): 1274-1275; 1962.

Tunmann, P.; Stierstorfer, N.

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC.
Deutsche Apotheker Zeitung **14** (103): 395-397; 1963.

Tunmann, P.; Stierstorfer, N.

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe aus der Wurzel von *Harpagophytum procumbens* DC - 3. Mitteilung: Über ein weiteres Glukosid.
Tetrahedron Letters **25**: 1697-1699; 1964.

V

Vanhaelen, M.

La biochimie et l'activité de *Harpagophytum procumbens* et de *Glycyrrhiza glabra*. Toxicité de Symphitum consolidida.
J.Pharm.Belg. **41**: 172-182; 1986.

Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastré, R.; Elchami, A. A.

Gas-liquid chromatographic determination of the iridoid content in *Harpagophytum procumbens* DC..
Journal of Chromatography **209**: 476-478; 1981.

Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastré, R.; Elchamie, A. A.; Fontaine, J.

Activité biologique d'*Harpagophytum procumbens* DC.
J.Pharm.Belg. **36**: 38-42; 1981.

Volk, O. H.

Zur Kenntnis von *Harpagophytum procumbens* DC.
Deutsche Apotheker Zeitung **18** (104): 573-576; 1964.

W

Walgren, R. A.; Karnaky, K. J.; Lindenmeyer, G. E.; Walle, T.

Efflux of Dietary Flavonoid Quercetin 4'- β -Glucoside across Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical Multidrug Resistance-Associated Protein-2.
Pharmacological and Experimental Therapeutics **294** (3): 830-836; 2000.

Warashina, T.; Miyase, T.; Ueno, A.

Iridoid Glykosides from *Verbascum thapsus* L..
Chem. Pharm. Bull. **39**: 3261-3264; 1991.

Wegener, T.; Winterhoff, H.

Zubereitungen aus der südafrikanischen Teufelskralle.
Deutsche Apotheker Zeitung **47**: 5613-5620; 2001.

Wegener, T.

Die Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens* DC.) in der Therapie rheumatischer Erkrankungen.
Zeitschrift für Phytotherapie **19**: 284-294; 1998.

Wenzel, P.; Wegener, T.

Teufelskralle-Ein pflanzliches Antirheumatikum.
Deutsche Apotheker Zeitung **13**: 1131-1144; 1995.

Whitehouse, L. W.; Znamirowska, M.; Paul, C. J.

Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*): no evidence for anti-inflammatory activity in the treatment of arthritic disease.
Can. Med. Assoc. J. **129**: 249-251; 1983.

Wichtl, M. (Hrsg)

Teedrogen und Phytopharmaka.; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 4. Auflage; 2002.

Willert, D.; Schneider, E.
Teufelskralle - Anbau und Wildsammlung.
Deutsche Apotheker Zeitung **6**: 683-688; 2001.

Wirth, M.; Bogner, E.; Gabor, F.
Parameters influencing the transport rate of marker compounds across Caco-2 monolayers.
Sci. Pharm. **69**: 91-104; 2001.

X

Xiong, Q.; Hase, K.; Tezuka, Y.; Tani, T.; Namba, T.; Kadota S.
Hepatoprotective Activity of Phenylethanoids from *Cistanche deserticola*.
Planta Medica **64**: 120-125; 1998.

Y

Yamamoto, A.; Nitta, S.; Miyase, T.; Ueno, A.; Wu, L. J.
Phenylethanoid and Lignan-Iridoid Complex Glycosides from Roots of *Buddleja davidii*.
Phytochemistry **32**: 421-425; 1993.

Yamashita, S.; Tanaka, Y.; Endoh, Y.; Taki, Y.; Sakane, T.; Nadai, T.; Sezaki, H.
Analysis of Drug Permeation across Caco-2 Monolayer: Implication for Predicting *in vivo* Drug Absorption.
Pharmaceutical Research **14** (4): 486-491; 1997.

Yazdanian, M.; Glynn, S. L.; Wright, J. L.; Hawi, A.
Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds.
Pharmaceutical Research **15** (9): 1490-1494; 1998.

Yee, S.
In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict *In Vivo* (Small Intestinal) Absorption in Man - Fact or Myth.
Pharmaceutical Research **14** (6): 763-766; 1997.

Yee, S.; Day, W. W.
Applications of Caco-2 Cells in Drug Discovery and Development.
In: Yee, S.; Day, W.W, eds. Handbook of Drug Metabolism.
Groton, Connecticut; USA: Pfizer Inc.; 1999: p. 507-522.

Yi-Ming, L.; Shan-Hao, J.; Wen-Yun, G.; Da-Yuan, Z.
Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*.
Phytochemistry **50**: 101-104; 1999.

Z

Ziller, K. H.; Franz, G.
Analysis of the Water Soluble Fraction from the roots of *Harpagophytum procumbens*.
Planta Medica **37**: 340-348; 1979.

Zimin, L.; Zhongjian, J.
Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from *Pedicularis striata*.
Phytochemistry **30** (4): 1341-1344; 1991.

Zorn, B.
Über die antiarthritische Wirkung der Harpagophytum-Wurzel.
Deutsche Rheumaforschung **17**: 134; 1958.

Lebenslauf

Name: Kerstin Boje
Geburtsdatum: 30. März 1973
Geburtsort: Herne
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Ernst-Wilhelm Boje
Erna Boje, geb. Waldhecker

Schulbildung: 1979-83 Grundschule am Berliner Platz, Herne
1983-92 Otto-Hahn-Gymnasium, Herne
05.06.1992 Abitur

Ausbildung 31.08.1992 - PtA-Schule, Dortmund
08.03.1993

Studium SS 1993 Studium der Pharmazie an der
Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
07.04.1995 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
15.05.1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09.06.1998 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Pharmaziepraktikum: 01.05.1997- Pinguin-Apotheke, Steinfurt-Borghorst
31.10.1997
01.11.1997- Apotheke des Städtischen Krankenhauses,
30.04.1998 Friedrichshafen

Approbation
als Apothekerin: 26.06.1998

Berufliche Tätigkeiten: 01.07.1998- Wissenschaftliche Hilfskraft
30.06.1999
seit 01.07.1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Dissertation: 01.07.1998 Beginn der Dissertation am Institut für
Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
unter der Leitung von Prof. Dr. A. Nahrstedt