

**Phytochemische, analytische und pharmakologische
in vitro Untersuchungen zu den phenolischen
Inhaltsstoffen eines standardisierten
Weidenrindenextraktes**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
– Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne Freischmidt
aus Günzburg

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Mai 2007 bis Oktober 2011 unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07.11.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2012

Prüfungsausschuss: Prof. em. Dr. G. Franz (Vorsitzender)

Prof. Dr. J. Heilmann (Erstgutachter)

Prof. em. Dr. A. Nahrstedt (Zweitgutachter)

Prof. Dr. S. Elz (dritter Prüfer)

Danksagung

Prof. Dr. Jörg Heilmann danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die umfassende wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Anregungen und hilfreichen Diskussionen sowie für das stets sehr angenehme Arbeitsklima.

Bei der Firma Steigerwald, namentlich bei Dr. Kelber, Dr. Weiser und Dr. Okpanyi, möchte ich mich für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung bedanken. Insbesondere danke ich meinem Ansprechpartner Herrn Dr. Kelber für die konstruktive und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Dr. Birgit Kraus und Dr. Guido Jürgenliemk danke ich für die anregenden Diskussionen und ihre Unterstützung bei zellbiologischen sowie analytischen Fragestellungen. Vielen Dank an Gabi Brunner und Anne Grashuber für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung im Arbeitsalltag. Weiterhin danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre. Dr. Matej Barbič danke ich für die Zusammenarbeit bezüglich der ICAM-Assays und der kapillarelektrophoretischen Zuckerbestimmungen. Mein Dank gilt auch Rosmarie Scherübl, insbesondere für die Durchführung der HPTLC-Analytik. Susanne Knuth danke ich für die Bestimmung der ICAM-Expression des Phelligrins A und die Durchführung der HPLC-Analytik im Rahmen der alternativen Gehaltsbestimmungsmethode. Allen Auszubildenden und Wahlpflichtstudenten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt ebenfalls ein großes Dankeschön.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der zentralen Analytik für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren, insbesondere Dr. Burgemeister und Herrn Kastner, sowie Herrn Kiermayer und Herrn Söllner.

Prof. Dr. Armin Buschauer danke ich für Möglichkeit der Nutzung des Durchflusscytometers. Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Günther Bernhardt und Martin Rothenhöfer für die freundliche Hilfe im Rahmen der kapillarelektrophoretischen Bestimmung und die Aufnahme der Elektropherogramme.

Ein weiteres Dankschön gilt dem Lehrstuhl für Chemo- und Biosensorik, besonders PD Dr. habil. Axel Dürkopp, für die Möglichkeit, CD-Spektren aufzunehmen.

Vielen Dank an Dr. Thomas A. Newton (Professor Emeritus, Chemistry Department, University of Southern Maine) für die rasche und konstruktive Durchsicht der englischen Zusammenfassung.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. Susann Haase, die mir seit Beginn dieser Arbeit freundschaftlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bedanke ich mich bei ihr für die kritische Durchsicht der Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Magdalena Motyl, Katharina Zenger und Rosmarie Scherübl ebenso herzlich für die stetige Unterstützung, die heitere Atmosphäre, die ausgiebigen fachlichen und privaten Diskussionen und die lustigen Mädelsabende bedanken. Danke auch an alle „Steiglehner“, insbesondere an meinen ehemaligen Mitbewohner Ingmar Kreher, für die schöne Zeit und die geselligen Feierabende.

Mein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an Sebastian Kutz für sein Verständnis und seine Unterstützung – vor allem in der Schlussphase dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei ihm für seine Bereitschaft bedanken, jahrelang viel Freizeit auf Bayerns Autobahnen für mich zu opfern.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt natürlich auch meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Motivation ich nicht so weit gekommen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich allen Personen danken, die, ohne namentlich erwähnt zu sein, den ein oder anderen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit geleistet haben.

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Freischmidt, A., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S.N., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., Heilmann, J., 2011. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardized Willow bark extract. *Phytomedicine*: *in press*: doi: 10.1016/j.phymed.2011.08.064.

Ulrich-Merzenich, G., Koptina, A., Kelber, O., Freischmidt, A., Heilmann, J., Müller, J., Sadeghlar, F., Zeitler, H., Wagner, H., 2011. Prediction of adverse events by *in vivo* gene expression profiling exemplified for phytopharmaceuticals containing salicylates and the antidepressant imipramine. *Phytomedicine*: *in press*: doi:10.1016/j.phymed.2011.09.078.

Ulrich-Merzenich, G., Kelber, O., Koptina, A., Freischmidt, A., Heilmann, J., Müller, J., Zeitler, H., Seidel, M., Ludwig, M., Heinrich, E., Winterhoff, H. 2011. Standardized willow bark preparation shows antidepressant like effects. *Phytomedicine*: *submitted*.

Poster und Vorträge

Freischmidt, A., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S.N., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., Heilmann, J., 2010. Phenolic compounds in the ethyl acetate fraction of a standardized willow bark extract.

Poster, 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, 29.08.-02.09.2010.

Freischmidt, A., Jürgenliemk, G., Kraus, B., Okpanyi, S.N., Müller, J., Kelber, O., Weiser, D., Heilmann, J., 2009. Entzündungshemmende Wirkung von Fraktionen eines standardisierten Weidenrindenextraktes in Endothelzellen.

Poster, 7. Berliner Kongress Phytotherapie 2009, Berlin, 10.09.-12.09.2009.

Koptina, A., Kelber, O., Müller, J., Freischmidt, A., Heilmann, J., Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2011. The group of peripheral glutamate receptors are targeted by salicylates of willow bark and the antidepressant imipramine in a rat model of depression.

Poster, 5. International Congress Phytopharm 2011, Nürnberg, 25.07.-27.07.2011 (1. Posterpreis).

Kelber, O., Okpanyi, S.N., Freischmidt, A., Heinrich, E.U., Müller, J., Heilmann, J., Ulrich-Merzenich, G., Weiser, D., 2011. Role of different fractions of willow bark extract STW 33-I in its antidepressant-like effect.

Poster, 5. International Congress Phytopharm 2011, Nürnberg, 25.07.-27.07.2011.

Ulrich-Merzenich, G., Kelber, O., Freischmidt, A., Heilmann, J., Müller, J., Zeitler, H., Panek, D., Winterhoff, H. 2010. Willow bark- more than an antiinflammatory drug? Evidence for an antidepressant effect.

Poster, 5. International Congress on Complementary Medicine Research, Tromsø, Norway, 19.05.-21.05.2010.

Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Heilmann, J., Freischmidt, A., Kelber, O., Müller, J., Winterhoff, H. 2009. Neueste Ergebnisse aus der Weidenrindenforschung mittels „Omic“-Technologien.

Vortrag, 7. Berliner Kongress Phytotherapie 2009, Berlin, 10.09.-12.09.2009.

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Weide.....	1
1.1.1	Verbreitung von <i>Salix sp.</i>	1
1.2	Die Weidenrinde.....	2
1.2.1	Droge	3
1.2.2	Inhaltsstoffe	3
1.2.2.1	Phenolglucoside.....	4
1.2.2.2	Flavonoide und Chalkone	6
1.2.2.3	Weitere Inhaltsstoffe	7
1.2.3	Anwendung	7
1.2.4	Wirkung von Weidenrindenextrakten	9
1.2.4.1	Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.....	9
1.2.4.2	Wirksamkeit von Weidenrindenextrakten.....	10
1.2.4.3	Wirkmechanismen	11
1.3	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Ausgangsmaterial	18
2.2	Phytochemische Methoden.....	18
2.2.1	Fraktionierung und Isolierungen	18
2.2.1.1	Fraktionierung des Rohextrakts	18
2.2.1.2	Isolierungen	19
2.2.1.3	Dünnschichtchromatographie und HPTLC	21
2.2.2	Strukturaufklärung	22
2.2.2.1	NMR-Spektroskopie.....	22
2.2.2.2	Massenspektrometrie.....	22
2.2.2.3	UV/Vis-Spektroskopie	23
2.2.2.4	Polarimetrie.....	23
2.2.2.5	CD-Spektroskopie	23
2.2.2.6	Bestimmung der Konfiguration der 1,2-Cyclohexandiolderivate	24
2.2.2.7	Kapillarelektrophoretische Ermittlung der Glucosekonfiguration.....	24
2.2.3	Gruppenbestimmungen	25
2.2.3.1	Gehaltsbestimmung von Salicylalkoholderivaten und Salicin	25

2.2.3.2	Gehaltsbestimmung von Gerbstoffen und freien Phenolen	26
2.2.3.3	Flavonoidbestimmung	27
2.3	Methoden zur Gehaltsbestimmung von Naringeninderivaten	28
2.3.1	Probenvorbereitung	28
2.3.2	Puffer und Lösungen	29
2.3.3	HPLC-Methoden.....	29
2.4	Zellbiologische Methoden	31
2.4.1	Zellmaterial, Kultivierung, Zellzahlbestimmung	31
2.4.2	Kulturmedien, Puffer, sonstige Reagenzien	31
2.4.3	ICAM-1-Assay	33
2.4.3.1	Probenaufgabe	33
2.4.3.2	Durchflusscytometrische Bestimmung	34
2.4.4	MTT-Assay	34
2.4.5	Caco-2-Resorptionsversuch.....	35
2.4.5.1	Kultivierung der Zellen auf Transwell-Einsätzen	35
2.4.5.2	Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes	35
2.4.5.3	Durchführung des Transportversuchs.....	36
2.4.5.4	HPLC-Analytik.....	36
2.4.5.5	Fluorimetrie	38
2.4.5.6	Berechnungen.....	38
2.4.6	Statistische Auswertung.....	39
2.5	Chemikalien.....	39
2.6	Geräte	41
3	Ergebnisse und Diskussion.....	43
3.1	Phytochemische Untersuchungen	43
3.1.1	Masseverteilung der Fraktionen	43
3.1.2	Aufarbeitung der Ethylacetatfraktion und Isolierung.....	43
3.1.3	Strukturaufklärung	46
3.1.3.1	Übersicht der isolierten Substanzen	46
3.1.3.2	Flavanonglucoside	48
3.1.3.3	Flavanonolglucoside	58
3.1.3.4	Chalkonoglucoside.....	59
3.1.3.5	Flavanon-Aglyca	62

3.1.3.6	Flavanonol-Aglyca	63
3.1.3.7	Salicylalkoholderivate	64
3.1.3.8	Einfache Phenole.....	67
3.1.3.9	Spezielle Phenole	69
3.1.3.10	Kapillarelektrophoretische Ermittlung der Glucosekonfiguration.....	76
3.1.3.11	Zusammenfassung und Diskussion	77
3.1.4	Charakterisierung des Trockenextraktes bzw. der Fraktionen	80
3.1.4.1	DC-Fingerprint	80
3.1.4.2	Catechol.....	81
3.1.4.3	Gerbstoffe	81
3.1.4.4	Gesamtsalicylalkoholderivate bzw. Salicin	81
3.1.4.5	Zusammenfassung der Gehaltsbestimmungen	81
3.2	Quantifizierung von Naringeninderivaten in STW 33-I.....	83
3.2.1	Problemstellung	83
3.2.2	Hydrolysierbarkeit von Flavanonglucosiden	83
3.2.3	Methodenentwicklung.....	84
3.2.3.1	Probenvorbereitung	84
3.2.3.2	HPLC-Methodenentwicklung	85
3.2.3.3	Hydrolysedauer.....	88
3.2.3.4	Ermittlung der Einwaage.....	88
3.2.3.5	Interner Standard	89
3.2.3.6	Verhalten weiterer Naringeninderivate.....	90
3.2.3.7	Kalibriergerade.....	91
3.2.4	Validierungsparameter.....	91
3.2.4.1	Präzision	92
3.2.4.2	Stabilität der Probe	92
3.2.4.3	Spezifität	93
3.2.4.4	Linearität	93
3.2.4.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	93
3.2.4.6	Robustheit.....	94
3.2.4.7	Richtigkeit	94
3.2.5	Gehalt von Fraktionen und Gesamtextrakt	97
3.2.5.1	Alternative Methode 1: HPLC Einzelbestimmung	97
3.2.5.2	Alternative Methode 2: Konventionsmethode (Ph. Eur.).....	98
3.2.5.3	Alternative Methode 3: Restphenolbestimmung	98
3.2.5.4	Vergleich der Ergebnisse	98

3.2.6	Zusammenfassung und Diskussion	101
3.3	Zellbiologische Untersuchungen	103
3.3.1	Entzündungen und die Bedeutung von ICAM-1 auf Endothelzellen.....	103
3.3.1.1	ICAM-1- und MTT-Assay	104
3.3.1.2	Extrakt und Fraktionen.....	107
3.3.1.3	Einzelsubstanzen.....	107
3.3.1.4	Diskussion.....	111
3.3.2	Resorptionsvorgänge und die Rolle des Darmepithels	114
3.3.2.1	Caco-2 Resorptionsmodell.....	116
3.3.2.2	Versuchsaufbau	117
3.3.2.3	Vorversuche	118
3.3.2.4	Kontrollsubstanzen	118
3.3.2.5	Kalibriergeraden.....	119
3.3.2.6	Ergebnisse und Diskussion der Caco-2-Transportversuche.....	119
4	Zusammenfassung	126
5	Summary.....	128
6	Abkürzungsverzeichnis.....	130
7	Literatur	132

1 Einleitung

1.1 Die Weide

1.1.1 Verbreitung von *Salix sp.*

Die Familie der Weidengewächse (Salicaceae) umfasst heute 55 Gattungen mit insgesamt ca. 1010 Arten. Damit wurde die frühere Untergliederung der Familie in die vier Gattungen *Salix*, *Populus*, *Chosenia* und *Toisusu* aufgelöst [Gebhardt 2010]. Die Gattung *Salix* ist überwiegend in der nördlichen Hemisphäre vertreten und umfasst weltweit je nach Autor etwa 350 bis über 500 Arten. Davon sind ca. 270 in China, ca. 120 in der ehemaligen Sowjetunion, ca. 103 in Nordamerika und ca. 65 Arten in Europa zu finden, weitere in Japan, Afrika, dem mittleren Osten, Indien, Mittel- und Südamerika [Argus 1997]. Ihre Standorte erstrecken sich von der Meeresküste bis in hochalpine Lagen und von arktischer Tundra zu tropischen Gebieten. Es handelt sich um meist diözische sommergrüne Laubgehölze mit wechselständigen ungeteilten Blättern. Jedoch ist die Formenvielfalt für Holzgewächse einzigartig und reicht von 25 m hohen Bäumen (*S. alba*) bis zu unter 10 cm kleinen Gewächsen (*S. reticulata*). Entsprechend der Wuchsform wird die Gattung in baumartige, strauchartige und kriechende Artengruppen unterteilt [Gebhardt 2010].



Salix purpurea L.
Purple Willow.

Abb. 1.1 Zeichnung von *Salix purpurea* L. aus Walter Hood Fitch: Illustrations of the British Flora, 1924. (Quelle: www.biolib.de; Permission granted to use under GFDL by Kurt Stueber)

Hybridisierungen (die Bastarde sind fruchtbar) und innerartliche Variabilität gestalten jedoch die Abgrenzung einzelner *Salix*-Arten oft schwierig [Shao 1991, Zander 2000]. In Deutschland sind etwa 40 Arten heimisch, wobei hier Uferläufe und Auwälder bevorzugte Standorte darstellen. Ihr rascher Wuchs, ihre Frostresistenz und Toleranz gegenüber Überschwemmungen bieten Konkurrenzvorteile im Vergleich zu anderen Baum- und Straucharten [Gebhardt 2010]. Mehr als die Hälfte aller mitteleuropäischen Weidenarten sind jedoch in den harten klimatischen Bedingungen der Alpen zu finden [Shao 1991].

1.2 Die Weidenrinde

Bereits seit Jahrhunderten werden Zubereitungen aus Weidenrinde als pflanzliche Arzneimittel gegen Fieber und Schmerzen verwendet. Die ersten klinischen Experimente wurden von dem englischen Geistlichen Edward Stone 1763 in einem Brief an die Royal Society dokumentiert. Er beschrieb 50 Fälle, in denen getrocknete und pulverisierte Weidenrinde die Wechselfieberschübe seiner Patienten linderte. Versuche zur Isolierung der aktiven Wirksubstanzen wurden etwa ein halbes Jahrhundert später von Wilkinson (1803) durchgeführt. Sowohl den Italienern Fontana und Brugnatelli (1826-1829), als auch dem Münchner Pharmazeuten Buchner (1828) gelang die Isolierung des Phenolglucosids Salicin. Ein Jahr später isolierte der Franzose Leroux Salicin in kristalliner Form und zeigte seine antirheumatische Wirksamkeit. Auch Buchner konnte 1831 die Wirkung von Salicin bei Fieber beschreiben. MacLagan berichtete 1976 über eine erfolgreiche Behandlung von rheumatischem Fieber durch die Gabe von Salicin. Der italienische Chemiker Piria hydrolysierte 1838 Salicin zu D-Glucose und Salicylalkohol, durch nachfolgende Oxidation des Alkohols zu Salicylsäure konnte er die Struktur aufklären. 1860 synthetisierten Kolbe und Lautemann Salicylsäure im Großmaßstab. Durch die damit mögliche breite Anwendungsmöglichkeit verlor die Weidenrinde zunehmend an Bedeutung. Aufgrund der magenreizenden Nebenwirkungen der Salicylsäure wurde nach chemischen Abwandlungen ihrer Struktur gesucht. Mit der Synthese von Acetylsalicylsäure durch den Apotheker und Chemiker Hoffmann 1897 erlosch das Interesse an der Weidenrinde als pflanzliches Analgetikum und Antirheumatikum zunächst gänzlich. [Hedner und Everts 1998, Mahdi et al. 2006, Jones 2001]

Im Rahmen der modernen Phytotherapie erfuhren Zubereitungen aus Weidenrinde erst innerhalb der letzten zehn Jahre wieder gesteigertes wissenschaftliches Interesse. Neuere pharmakologische Studien belegen die Wirksamkeit von *Salix*-Extrakten gegen

rheumatische Beschwerden, Fieber und Schmerzen, und führten zu intensiven Untersuchungen möglicher Wirkmechanismen, die bis heute in ihrer Vielfalt noch nicht geklärt sind [Vlachojannis et al. 2009].

1.2.1 Droge

Die Droge Salicis cortex besteht laut Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur.) aus der ganzen oder zerkleinerten, getrockneten Rinde junger Zweige oder aus ganzen, getrockneten Stücken junger Zweige des laufenden Jahres. Der Gesamtgehalt an Salicylalkoholderivaten stellt das qualitätsbestimmende Merkmal dar. Er wird mit mindestens 1,5% angegeben und ist unabhängig von der Stammpflanze. Somit kann jede *Salix*-Art zur Gewinnung der Droge herangezogen werden, soweit diese der Anforderung des Arzneibuchs entspricht. Beispielhaft werden einige Weidenarten mit bekannt hohem Gehalt an Salicylalkoholderivaten explizit benannt (*S. purpurea* L.- Purpurweide, *S. daphnoides* VILL.- Reifweide, *S. fragilis* L.- Bruchweide).

2009 wurde auch eine eigene Monographie „Weidenrindentrockenextrakt“ (Salicis corticis extractum siccum) in das Ph. Eur. aufgenommen. Die Anforderungen an das Ausgangsdrogenmaterial entspricht dem der Monographie Salicis cortex. Zur Extraktion sind die Verwendung von Wasser oder wässrig-alkoholischer Lösungsmittel vorgesehen, wobei jedoch deren Konzentration 80%igen Ethanol (V/V) nicht übersteigen darf. Geeignete Verfahren sind zur Extraktion anzuwenden. Der Gehalt an Salicylalkoholderivaten muss mindestens 5,0% betragen.

1.2.2 Inhaltsstoffe

Zahlreiche Untersuchungen wurden hinsichtlich der Inhaltsstoffe von Weiden durchgeführt. Hierbei standen zumeist die Salicylalkoholderivate im Fokus des Interesses. Aufgrund von Bastardisierungen kann sich die Abgrenzung des Inhaltsstoffspektrums bezüglich einzelner Arten schwierig gestalten. In vielen Arbeiten wurden die Blätter der Weiden untersucht, jedoch unterscheidet sich das Spektrum von dem der pharmazeutisch verwendeten Rinden [Shao 1991]. Da es sich bei dem Ausgangsdrogenmaterial des in dieser Arbeit verwendeten Trockenextraktes um die Rinde von *S. purpurea* L. handelt, soll insbesondere auf die Inhaltsstoffe dieser Art eingegangen werden.

1.2.2.1 Phenolglucoside

Salicylalkoholderivate

Den wohl bekanntesten Inhaltsstoff der Weidenrinde stellt zweifelsohne das Salicin dar. Der Gehalt an freiem Salicin in der Trockenmasse liegt jedoch unter 1%, hauptsächlich liegt es in veresterter Form vor. Eine Vielzahl von Untersuchungen wurde zu Salicylalkoholderivaten in Weiden durchgeführt. Shao [1991] screente die Inhaltsstoffe verschiedenster Weidenarten, die Übersicht von Boeckler und Mitarbeitern [2011] ordnet bisher isolierte Salicylalkoholderivate den einzelnen Weidenarten zu. In *Salix purpurea* L. sind u. a. die in Abb. 1.2 dargestellten Salicylalkoholderivate vorzufinden.

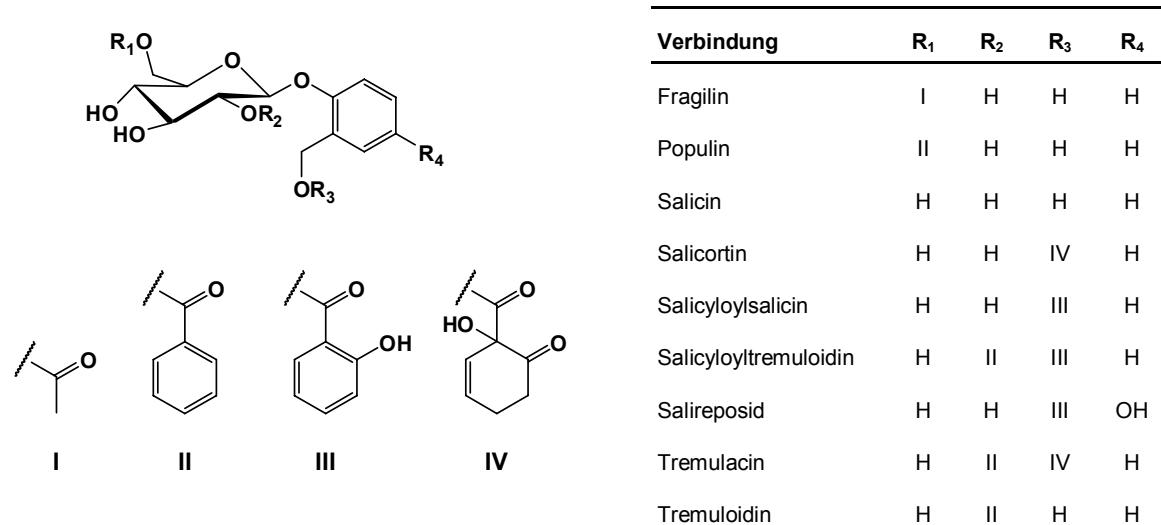


Abb. 1.2 Salicylalkoholderivate in *S. purpurea* L.

S. purpurea L. besitzt generell einen sehr hohen Salicylalkoholgehalt, jedoch kann dieser auch innerhalb der Art stark schwanken. Gründe hierfür sind z. B. unterschiedliche Wuchsigkeit, das physiologische Alter der Pflanze, die Tageszeit der Beprobung, der Nährstoffgehalt des Bodens, das Klima, das Geschlecht der Pflanze oder saisonale Schwankungen [Förster et al. 2010 und darin zitierte Literatur].

Einige Salicylalkoholderivate sind sehr labile Komponenten. Schon in den 1980er Jahren wurde festgestellt, dass der Gehalt spezifischer Derivate nach Gefrier- oder Hitzetrocknung des Drogenmaterials im Gegesatz zu frischem Pflanzenmaterial stark vermindert war. Auch lange Extraktionszeiten wirkten sich negativ aus [Lindroth und Pajutee 1987, Julkunen-Tiitto 1985]. Betroffen sind hauptsächlich Verbindungen mit

1-Hydroxy-6-oxocyclohex-2-en-1-carbonsäureester-Teilstrukturen, wie z. B. Salicortin und Tremulacin (Abb. 1.2), wobei für Salicortin ein Abbau zu Salicin, Catechol und 6-Hydroxycyclohex-2-en-1-on (6-HCH) nachgewiesen werden konnte (Abb. 1.3). Die Zersetzung kann enzymatisch oder nicht-enzymatisch erfolgen [Mattes et al. 1987, Julkunen-Tiitto und Meier 1992, Ruuhola et al. 2003]. Den ersten Schritt stellt die Bildung freier 1-Hydroxy-6-oxocyclohex-2-en-1-carbonsäure bzw. dessen Anions dar, diese wird unter CO_2 -Freisetzung zum 2-Hydroxycyclohex-3-en-1-on (6-HCH) decarboxyliert. Das Keton kann einerseits über die Enolform zum 6-Hydroxycyclohex-2-en-1-on (6-HCH) tautomerisieren oder aber in Gegenwart von Luftsauerstoff zum Catechol oxidiert werden [Pearl und Darling 1971, Mattes et al. 1987, Julkunen-Tiitto und Meier 1992, Clausen et al. 1990, Haruta et al. 2001, Ruuhola et al. 2003]. Unabhängig von einer enzymatischen Umsetzung konnten Knuth und Mitarbeiter [2011] die Entstehung von Catechol ebenso anhand der Reinsubstanz Salicortin unter Zellkulturbedingungen (wässriges Milieu, 37°C) nachweisen, wobei Salicortin innerhalb von 36 Stunden vollständig abgebaut wurde.

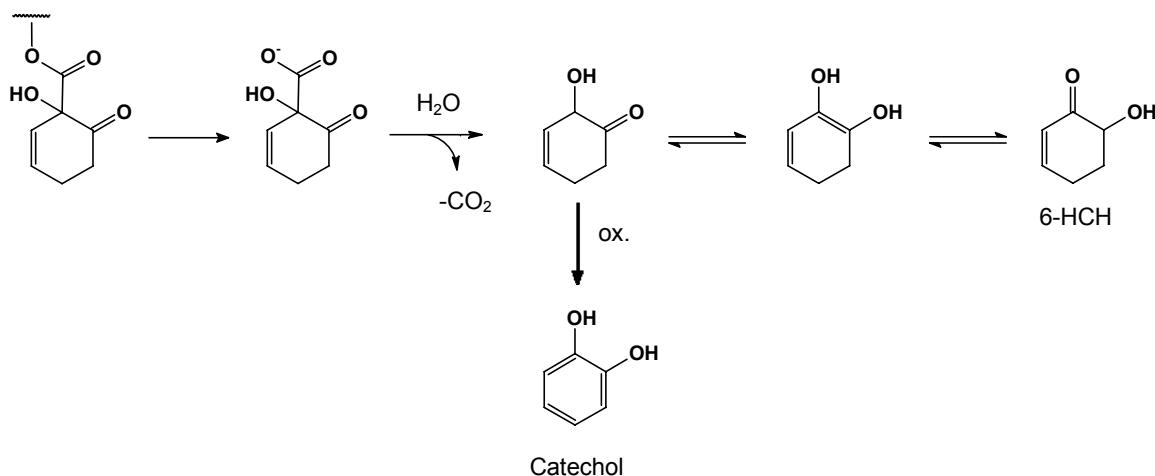


Abb. 1.3 Abbau der 1-Hydroxy-6-oxocyclohex-2-en-1-carbonsäureester-Teilstruktur von Salicylalkoholderivaten zu Catechol und 6-HCH. Modifiziert nach Ruuhola et al. [2003].

Der Pflanze selbst dienen Phenolglucoside als Fraßschutz. Hierbei spielt die Zersetzung zu reaktivem 6-HCH und Catechol, welches z. B. durch Polyphenoloxidinasen zu *o*-Chinon oxidiert werden kann, eine tragende Rolle. Ob der Abbau der aufgenommenen Salicylalkoholderivate im Schadorganismus durch inkorporierte Pflanzenenzyme oder Enzyme des Schädlings selbst erfolgt, bleibt bislang unklar. Auch die Möglichkeit der nicht-enzymatischen Dekomposition im Magen von Insekten wird diskutiert. Es wird

angenommen, dass die entstandenen Moleküle Insekten direkt schädigen oder aber lebensnotwendige Enzyme hemmen. [Review: Boeckler et al. 2011]

weitere Phenolglucoside

Neben den Salicylalkoholderivaten sind weitere phenolische Verbindungen wie z. B. Syringin [Shao 1991], und die stereoisomeren 1,2-Cyclohexandiolderivate Grandidentatin und Purpurein (*cis*-2-Hydroxycyclohexyl-2'-O-*trans*-*p*-cumaroyl- β -D-glucopyranosid) enthalten [Pearl und Darling 1962 und 1970b].

1.2.2.2 Flavonoide und Chalkone

Quercetin-, Luteolin-, Eriodictyol- und Naringeninglycoside (Abb. 3.2, S.46 bzw. Abb. 3.42, S.110), das Flavanonol Ampelopsin und das Chalcon Isosalipurposid (Abb. 3.2, S.46) stellen typische Weidenflavonoide dar [Wichtl 2008]. Auch Isoquercitrin wurde identifiziert [Pearl und Darling 1970a]. Luteolin-7-O- β -glucosid konnte von Shao [1991] nur in den Blättern einiger Weidenarten detektiert werden, Jarrett und Williams [1967] fanden das Flavonglucosid in Blättern und geringe Mengen in sehr junger Rinde. Dagegen ist das Chalkonglucosid Isosalipurposid hauptsächlich in Rinden vorzufinden. Bemerkenswert ist, dass Isosalipurposid in nur sehr wenigen der von Shao untersuchten Arten nachzuweisen war (*S. purpurea* L., *S. daphnoides* VILL., *S. hastata* L.). Auch Jarrett und Williams [1967] fanden unter 30 analysierten *Salix*-Arten größere Mengen Isosalipurposid lediglich in den Rinden dreier Arten, die nicht *S. purpurea* L., *S. daphnoides* VILL. oder deren Hybriden angehörten. Zapesochnaya und Mitarbeiter isolierten die Verbindung aus *S. acutifolia* WILLD. [2002]. Das Isomer des Isosalipurposids, Naringenin-5-O- β -glucosid, wurde von Shao in Rinden derselben Arten wie das Isosalipurposid gefunden, in den Rinden und Blättern aller anderer Arten war Naringenin-5-O- β -glucosid nicht oder möglicherweise nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Da Jarrett und Williams im Gegensatz zu jüngeren Rinden in älteren mehr Naringenin-5-O- β -glucosid als korrespondierenes Chalkon-glucosid detektierten, vermuteten sie eine chemische Natur der Isomerisierung. Auch das Flavanon Eriodictyol-7-O- β -glucosid wurde von Shao lediglich in *S. purpurea* L. und *S. daphnoides* VILL. detektiert. Diesen beiden Arten wird generell ein sehr hoher Flavonoidgehalt zugeschrieben [Jarrett und Williams 1967]. Sie sind auch diejenigen, die am häufigsten als Drogenausgangsmaterial für *Salicis cortex* dienen. Somit sind die Flavanon- und Chalkonglucoside höchstwahrscheinlich in vielen Drogenzubereitungen enthalten. Aufgrund der Monographie des Europäischen Arzneibuches ist die Verwendung anderer Stammpflanzen (unter Einhaltung des Gesamtsalicingehaltes)

durchaus legitim und somit ein völlig unterschiedliches Flavonoidspektrum verschiedener Weidenrindenpräparate denkbar. Der Gehalt an Flavonoiden dürfte jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen den Präparaten stark variieren.

1.2.2.3 Weitere Inhaltsstoffe

Des Weiteren sind Flavan-3-ole, wie Catechin, Epicatechin und Gallocatechin in Weidenrinde enthalten. Interessanterweise wurden auch Catechine mit 1-Hydroxy-6-oxocyclohex-2-en-1-carbonsäureester-Teilstruktur in *S. purpurea L.* identifiziert, außerdem sind dimere (B1, B3) und auch trimere Procyanidine isoliert worden. [Jürgenliemk et al. 2007].

1.2.3 Anwendung

Monographien

Die Weidenrinde wurde schon 1984 durch die Kommission E [1984] des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes positiv bewertet und gegen „fieberhaften Erkrankungen, rheumatischen Beschwerden und Kopfschmerzen“ empfohlen. Allerdings wird die angegebene Dosis von 60-120 mg Gesamtsalicinen heute als zu niedrig angesehen. Die European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) bestätigte die Kommission E und veröffentlichte 1997 die Europäische Monographie Willow Bark. Die Tagesdosis wurde auf 120-240 mg Gesamtsalicinderivate verdoppelt. Anwendungsgebiete sind Rückenschmerzen und die symptomatische Behandlung leichter osteoarthritischer sowie rheumatischer Beschwerden [ESCOP 2003].

Auch die WHO erstellt seit 1999 Monographien zu Arzneidrogen. Diese sollen den Gebrauch von pflanzlichen Arzneidrogen bezüglich Sicherheit, Wirksamkeit und Qualitätskontrolle harmonisieren [WHO 1999]. Die Monographie Cortex salicis der WHO [WHO 2009] erschien 2009 und empfiehlt aufgrund der klinischen Datenlage Zubereitungen (die ganze Droge, wässrige oder wässrig-ethanolisch ausgezogene Trockenextrakte, Tinkturen und Fluidextrakte) zur oralen Anwendung für die symptomatische Behandlung von Fieber, Schmerzen und leichten rheumatischen Beschwerden. Auch werden weitere, in verschiedenen Arzneibüchern beschriebene oder durch Erfahrungswerte belegte Anwendungsgebiete (Erkältung) sowie traditionelle Anwendungen (Obstipation, Harninkontinenz, äußerliche Anwendung bei Warzen) genannt. Eine Tagesdosis von 120-240 mg Gesamtsalicyalkoholderivaten wird empfohlen. Weitaus strenger hingegen fällt die Monographie des Herbal Medicinal Product Committees (HMPC), einem Ausschuss der European Medicines Agency

(EMEA), aus. Sie beurteilt eigenverantwortlich die Zulassung pflanzlicher Arzneimittel auf europäischer Ebene und teilt diese in die Kategorien „well-established use“ (anerkannte Wirkung und akzeptierte Unbedenklichkeit) und „traditional use“ (traditionelles Arzneimittel) ein. Die Monographie zu Salicis cortex wurde 2009 veröffentlicht [HMPC 2009a]. Unter „well-established use“ fallen einzig arzneibuchkonforme wässrig-ethanolisch (70% V/V) ausgezogene Trockenextrakte mit einem DEV 8-14:1 und einem Salicingehalt von ~15%. Als quantifizierte feste orale Arzneiformen werden sie zur kurzzeitigen Behandlung von akuten Rückenschmerzen befürwortet, dabei sollte eine Behandlungsdauer von vier Wochen nicht überschritten werden. Personen unter 18 Jahren sollten den Trockenextrakt nur auf ärztlichen Rat hin einnehmen. Grundlage hierfür sind Daten klinischer Studien, die mit einem entsprechenden Extrakt die Indikation und den Anwendungszeitraum abdeckten und zu positiven Ergebnissen führten, für Kinder und Jugendliche liegen keine gesicherten Daten vor [HMPC 2009b]. Wässrig ausgezogene Trockenextrakte (DEV 16-20:1, 8-16:1 oder 16-23:1), Flüssigextrakte (DEV 1:1, Auszugsmittel 25%iger Ethanol (V/V)), Tinkturen (DEV 1:5, Auszugsmittel 25%iger Ethanol (V/V)), zerkleinerte oder gemahlene Droge fallen unter die traditionelle Anwendung. Die Applikation kann fest, flüssig oder als Tee erfolgen. Als Indikationen werden leichte Gelenkschmerzen, fieberhafte Erkältung und Kopfschmerz genannt. Bei Personen unter 18 Jahren ist die Anwendung aufgrund mangelhafter klinischer Datenlage und eines möglich auftretenden Reye-Syndroms kontraindiziert. Für beide Kategorien bestehen weitere Kontraindikationen, die denen der Acetylsalicylsäure entsprechen: Überempfindlichkeit gegenüber dem aktiven Inhaltsstoff, gegen Salicylate oder anderer NSAID, Magen-Darm-Geschwüre, Asthma, letztes Schwangerschaftstrimenon und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel. Als Nebenwirkungen werden allergische Reaktionen und gastrointestinale Störungen genannt. Überdosierungen sind nicht bekannt.

Verträglichkeit

Aus den klinischen Studien ergibt sich allgemein eine gute Verträglichkeit von Weidenrindenextrakten. Es existieren Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für allergische Hautreaktionen. Das Risiko für gastrointestinale Störungen ist äußerst gering [Biegert 2003].

Anwendung in der Praxis

Das Anwendungsgebiet „Kopfschmerz“ spielt für Weidenrindenpräparate eine untergeordnete Rolle, da die benötigte rasch eintretende Linderung häufig nicht erreicht

werden kann. Ebenfalls nicht durchsetzen konnte sich eine Anwendung bei Fieber. Im Rahmen von Erkältungskrankheiten werden Tees bevorzugt, allerdings weisen die Salicylalkoholderivate einen extrem bitteren Geschmack auf [Meier 2001]. Die Anwendung als Tee birgt weitere Probleme, da der Gehalt an Salicylalkoholderivaten in der Teedroge selten explizit angegeben ist. Dieser kann 1,5 bis über 11% [Wichtl 2008] betragen, jedoch enthalten die meisten im Handel erhältlichen Lieferungen mit der Bezeichnung *Salicis cortex* nur sehr wenig Gesamtsalicin [Meier 2001]. Bei der Teebereitung hängt die extrahierte Menge an Salicylalkoholderivaten vom Zerkleinerungsgrad der Droge und der Extraktionstemperatur ab und beträgt etwa 55-100% [Meier und Liebi 1990]. Eine gesicherte therapeutische Dosierung gestaltet sich demnach schwierig. Deshalb sollte besser auf standardisierte hochdosierte Präparate zurückgegriffen werden.

1.2.4 Wirkung von Weidenrindenextrakten

1.2.4.1 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Der Begriff „rheumatische Erkrankungen“ umfasst eine Vielzahl schmerzhafter, entzündlicher und degenerativer Struktur- und Funktionsstörungen des muskuloskelettalen Systems [Brune und Manger 2010].

Die rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritis) stellt eine entzündliche systemische Autoimmunerkrankung der Gelenke dar, die etwa 1% der Bevölkerung betrifft. Sie basiert auf einer chronischen Entzündung der Synovialmembran. Der klinische Verlauf zeigt sich äußerst variabel und erstreckt sich von einer leichten und selbstlimitierenden Arthritis bis hin zu schweren Gelenkdestruktionen und entzündlichem Multiorganbefall. Die Therapie ist komplex und oft lebenslang erforderlich [Brune 2002].

Bei der Arthrose handelt es sich um eine degenerative, primär nicht-entzündliche Veränderung von Knorpel- und Knochenstrukturen der Gelenke. Sie kann als Volkskrankheit bezeichnet werden. 25% der über 50-jährigen und mehr als 80% der über 80-jährigen sind betroffen. Über Jahre hinweg kann sie zu Gelenkesdeformierungen führen, die mit gravierenden Funktionsstörungen einhergehen können. Hauptsächlich sind gewichtstragende Gelenke der unteren Extremitäten betroffen, wie z. B. das Hüft- oder Kniegelenk (Cox- bzw. Gonarthrose). Sporadisch können Synovitiden (Entzündungen der Gelenkschleimhaut) z. B. durch Knorpelabrieb entstehen. Im Zuge dessen treten auch die klassischen Entzündungszeichen auf. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf der Arthrose stellt sich infolge zunehmender funktioneller Störungen und Gelenkdestruktion Dauerschmerz ein. [Brune 2002]

1.2.4.2 Wirksamkeit von Weidenrindenextrakten

Präparate aus Weidenrinden wurden innerhalb der letzten zehn Jahre in mehreren klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht. Das Design der durchgeföhrten Studien war unterschiedlich, hier soll hauptsächlich auf randomisierte kontrollierte Studien eingegangen werden.

Die Wirksamkeit von ethanolisch ausgezogenem Weidenrindenextrakt gegen akute Rückenschmerzen wurde von Chrubasik und Mitarbeitern [2000 und 2001a] in zwei randomisierten kontrollierten Studien über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Es konnte eine signifikante Verbesserung von Schmerzsymptomen bei Anwendung des Weidenrindenpräparates im Gegensatz zu Placebo gezeigt werden. Auch war die Wirkung einer Tagesdosis von 240 mg Gesamtsalicin der einer Tagesdosis von 120 mg bei akuten Phasen chronisch-unspezifischer Rückenschmerzen überlegen [Chrubasik et al. 2000]. Weiterhin war eine tägliche Dosis von 240 mg Salicylalkoholderivaten der von 12,5 mg Rofecoxib äquivalent [Chrubasik et al. 2001a]. In einem systematischen Cochrane Review [Gagnier et al. 2006] wurden diese beiden Studien bezüglich der Wirksamkeit von ethanolisch ausgezogenen Weidenrindenrindenextrakt gegen akute Rückenschmerzen analysiert. Die Wirkung gegen kurzzeitige Schmerzzustände wurde insgesamt positiv beurteilt, wenn auch die Beweiskraft moderat eingeschätzt wurde.

Zur Wirksamkeit bei Cox- und Gonarthrosen existieren mehrere Studien, die allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. In zwei randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien wurden die Wirkungen von ethanolisch ausgezogenen Extraktten untersucht (Tagesdosis 240 mg Gesamtsalicin) [Schmid et al. 2000 und 2001a, Biegert et al. 2004], in einer weiteren randomisierten Doppelblindstudie die eines wässrigen Extraktes [Lardos et al. 2004]. Während Schmid und Mitarbeiter [2000] signifikante Verbesserungen des Schmerzzustandes nach zweiwöchiger Behandlung feststellen konnten, fiel die Studie über einen Zeitraum von sechs Wochen von Biegert und Mitarbeitern [2004] negativ bezüglich Verbesserungen im WOMAC-Arthrose-Index aus. Lardos und Mitarbeiter [2004] konnten nach drei Wochen Behandlungszeit Verbesserungen in allen untersuchten Parametern nachweisen, wobei sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Behandlung mit 90 und 180 mg Gesamtsalicin bzw. 150 mg Diclofenac) feststellen ließ. Es handelte sich um eine Pilotstudie mit sehr geringer Probandenzahl.

Wagner [2003, bzw. Biegert et al. 2004] untersuchte den schmerzlindernden Effekt von Weidenrinde bezüglich der Indikation rheumatoide Arthritis ebenfalls in einer Pilotstudie. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zu Placebo festgestellt werden, jedoch besteht die Möglichkeit, dass dies auf einem statistischen Fehler aufgrund zu geringer

Probandenanzahl (26 Patienten zu Beginn, 18 bei Abschluss der Studie) beruht [Cameron et al. 2011].

Auf Basis der genannten Studien (ohne die Studie von Lardos und Mitarbeitern [2004]) und unter Einschluss einer offenen Kohortenstudie von Chrubasik und Mitarbeitern [2001b] analysierten Vlachojannis und Mitarbeiter [2009] die Wirksamkeit von Weidenrinde gegen Schmerzen des Bewegungsapparates. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass ethanolisch ausgezogener Weidenrindenextrakt ein vielversprechendes und nebenwirkungsarmes Analgetikum zur Behandlung akuter Rückenschmerzen darstellt. Die Datenlage zum antiinflammatorischen Potential der Weidenrinde ließe grundsätzlich eine positive Einschätzung des Wirkung von Weidenrinde bei Arthrose oder rheumatoider Arthritis zu, möglicherweise seien jedoch die untersuchten Tagesdosen von 240 mg Gesamtsalicingehalt für diese Indikationen schlicht zu niedrig. Weitere Studien zur Wirksamkeit von Weidenrindenextrakten bei degenerativen rheumatischen Erkrankungen als auch bei rheumatoider Arthritis sowie zur chronischen Toxizität der Präparate werden benötigt.

Krivoy und Mitarbeiter [2001] untersuchten in einer klinischen Studie den Einfluss von Weidenrindenextrakten auf die Thrombozytenaggregation. Eine Hemmung war erkennbar, jedoch deutlich geringer als unter der Behandlung mit einer Tagesdosis von 100 mg Acetylsalicylsäure. Als „pflanzlicher Thrombozytenaggregationshemmer“ ist Weidenrinde somit nicht geeignet, ein Einfluss der geringen Aggregationshemmung bezüglich Neben- oder Wechselwirkungen (insbesondere mit Antikoagulantien) ist jedoch nicht auszuschließen [Biegert 2003].

1.2.4.3 Wirkmechanismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass der Wirkmechanismus der Weidenringe durch die Salicylalkoholderivate, welche Prodrugs für Salicylsäure darstellen, vollständig geklärt ist. Bei oraler Aufnahme wird das Phenolglucosid Salicin im Körper deglucosidiert und zum Hauptmetaboliten Salicylsäure oxidiert. Diese wirkt über unspezifische COX-Hemmung in Analogie zur Acetylsalicylsäure, jedoch ohne ihr Acetylierungspotential und die sich hieraus ergebenden Wirkungen, wie z. B. eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Dass die Sachverhalte viel komplexerer Natur sind als zunächst angenommen, belegen Studien der letzten Dekade. Durch die Ergebnisse von Schmid und Mitarbeitern [2001b] wurde eine Vielzahl von Untersuchungen bezüglich der Wirkmechanismen von Weidenrinde eingeleitet. In der genannten Studie wurde zehn Probanden ein

Weidenrindenextrakt in Tablettenform (Gesamtdosis 240 mg Salicylalkoholderivate) verabreicht und die Salicylsäure-Blutspiegel bestimmt. Die Daten wurden mit Literaturdaten zur Bioverfügbarkeit von Acetylsalicylsäure verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die applizierte Menge an Salicylsäurealkoholderivaten der von 87 mg Acetylsalicylsäure äquivalent war. Buß [2005] verabreichte vier Probanden einen standardisierten Weidenrindenrindenextrakt sowie die Einzelsubstanzen Salicin und Salicortin. Die Salicylsäure-Blutspiegel, verursacht durch die Einnahme von Weidenrindenextrakt und Salicin, waren vergleichbar, wohingegen der Blutspiegel nach Einnahme von Salicortin deutlich unter der erwarteten Konzentration lag. Interessanterweise wurde durch Extraktanalyse gezeigt, dass bei einem Gehalt von 16,4% Gesamtsalicylalkoholderivaten der Gehalt an freiem Salicin ca. 15% betrug. Dies rückt widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Salicin [Schmid et al. 2001b] in ein neues Licht. Bei einer guten Bioverfügbarkeit von Salicin, jedoch einer relativ schlechten der Salicinester, würde der Salicylsäure-Blutspiegel hauptsächlich vom Gehalt an freiem Salicin in Weidenrindenextrakten abhängen, dieser wird allerdings im Rahmen der Qualitätskontrolle von Extraktzubereitungen normalerweise nicht bestimmt. Hinsichtlich dieses Parameters wären verschiedene Weidenrindenextrakte trotz eingestelltem Gesamtsalicylalkoholgehalts nicht direkt miteinander vergleichbar. Ob die relativ schlechte Bioverfügbarkeit alle Salicinester betrifft, muss noch geklärt werden [Buß 2005]. Hier sollte jedoch beachtet werden, dass bei der Biotransformation des Salicins wahrscheinlich Unterschiede zwischen Mensch und Tier bestehen [Wagner et al. 2003]. Es ist außerdem zu erwähnen, dass der von Schmid und Mitarbeitern [2001a] in der klinischen Studie verwendete Extrakt einen fast doppelt so hohen freien Salicingehalt aufwies, wie der in den Studien von Wagner [2003] und Biegert [2003] verwendete. (Schmid und Mitarbeiter [2001a] gelangten zu einem positiven Ergebnis bezüglich der Wirksamkeit, während die beiden anderen Studien negativ ausfielen.) Aus den Literaturdaten [Schmid et al. 2000, 2001a und 2001b] kann jedoch geschlossen werden, dass Schmid und Mitarbeiter sowohl für die klinische Studie als auch für die Bioverfügbarkeitsstudie denselben Extrakt mit hohem freiem Salicingehalt verwendeten. Dies bedeutet, dass ein Plasmaspiegel entsprechend 87 mg Acetylsalicylsäure einen relativ hohen Wert darstellt, der für andere Zubereitungen eher niedriger als höher liegen dürfte. Selbst ein reiner Salicingehalt von 240 mg könnte maximal einem Plasmaspiegel nach Einnahme von 160 mg Acetylsalicylsäure entsprechen. Dies liegt im Bereich der Tagesdosis einer kardioprotektiven Behandlung, wohingegen zur Analgesie wesentlich höhere Dosen (400-500 mg) notwendig sind [Buß 2005]. Somit kann die analgetische Wirkung von Weidenrindenpräparaten nicht ausschließlich durch den Metabolismus von

Salicylalkoholderivaten zu Salicilsäure und den daraus resultierenden pharmakologischen Effekten erklärt werden. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden in den letzten Jahren zahlreiche pharmakologische Studien durchgeführt. Diese beschäftigten sich mit dem analgetischen Wirkmechanismus von Weidenrindenextrakten und der Suche nach weiteren Wirkungen.

in vitro und in vivo Studien

Khayyal und Mitarbeiter [2005] untersuchten den wässrig ausgezogenen Weidenrinden-trockenextrakt (STW 33-I), der auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, in zwei verschiedenen Rattenmodellen auf seine antiinflammatorische Aktivität. Zum einen wurde der Extrakt im 6-Tage-Air-Pouch-Modell (Modell für akute Entzündungen) untersucht, zum anderen erfolgten Untersuchungen im Adjuvans-induzierten Arthritismodell an der Rattenpfote (Modell für chronische Entzündungen). Es wurde sowohl der Extrakt in zwei Dosierungen (50 und 150 mg/kg KG), als auch Acetylsalicilsäure und Celecoxib in äquivalenter Dosierung im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollen untersucht. STW 33-I zeigte in allen untersuchten Parametern (z. B. Volumen des Exsudats, Leukozyteneinwanderung, TNF- α -Serumspiegel, Interleukinspiegel, Thromboxan B₂-Blutspiegel, COX-2-Aktivität) eine vergleichbare Aktivität zu den NSAID. Insgesamt betrug der Salicylalkoholgehalt in der Dosis des Extraktes weniger als ein Sechstel des Salicylatgehaltes der Dosis der untersuchten Acetylsalicilsäure.

Im Bierhefe-Entzündungsschmerz-Test an der Ratte zeigte Weidenrinde in einer Dosierung von 150 mg/kg KG ebenfalls eine vergleichbare Aktivität wie Acetylsalicilsäure (150 mg/kg KG) [dargestellt in Nahrstedt et al. 2007].

Durch eine Studie an primären humanen Monozyten konnten Fiebich und Chrusbasik [2004] zeigen, dass ein ethanolisch ausgezogener Weidenrindenextrakt die LPS-induzierte COX-2-vermittelte Freisetzung von Prostaglandin E₂ sowie die Freisetzung der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β , und IL-6 hemmte, während sowohl Salicin als auch Salicylat keinen Einfluss auf diese Parameter besaßen. Dabei konnte kein Einfluss auf die Aktivität der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 festgestellt werden. Es wurde diskutiert, dass die Ursache der Aktivität auf Interaktionen des Extraktes in übergeordneten Bereichen der Arachidonsäure-Signalkaskade zu suchen ist.

In humanen Vollblutassays konnte *in vitro* eine Hemmung von COX-1 und -2, sowie in höheren eingesetzten Konzentrationen eine Hemmung von TNF- α und IL-1 β durch

Weidenrindenextrakt gezeigt werden. Allerdings konnten diese Ergebnisse *ex vivo* durch Untersuchung des Vollblutes von Probanden, denen peroral Weidenrindenextrakt verabreicht wurde, nicht reproduziert werden. Bei keinem der Parameter war eine signifikante Hemmung der Freisetzung zu beobachten [Wagner 2003].

Bonaterra und Mitarbeiter [2010a] beobachteten pro-apoptotische Effekte des Gesamtextraktes STW 33-I, dessen Fraktionen und den Kontrollsubstanzen Acetylsalicylsäure und Diclofenac an IFNy/LPS-stimulierten humanen Monocyten. In unstimulierten Monozyten wurde Apoptose hingegen nur durch die polyphenol- und flavonoidhaltige, jedoch Salicin-freie Fraktion E von STW 33-I induziert. Weiterhin konnten sie die Hemmung der TNF- α Proteinexpression und der NO-Freisetzung durch STW 33-I und seinen Fraktionen sowie durch die Kontrollsubstanzen in LPS-aktivierten Monocyten zeigen. Die mRNA Expression von TNF- α und COX-2 wurde durch STW 33-I, Fraktion E und den Kontrollen in IFNy/LPS aktivierten Monocyten gehemmt. An LPS-stimulierten Macrophagen konnte ebenfalls eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch STW 33-I und den Kontrollsubstanzen gefunden werden.

Eine Reihe von Studien erbrachten Hinweise auf eine antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung von niedrigdosierter Acetylsalicylsäure. Verschiedene Krebsarten verursachen eine Überproduktion von Prostaglandinen, wogegen die inhibitorische Wirkung von Acetylsalicylsäure und anderer NSAIDs gegenüber COX-2 zum Tragen kommt. Jedoch übt Acetylsalicylsäure zusätzlich eine Reihe anderer Effekte auf zellregulatorische Moleküle aus (z. B. Inhibierung der NF- κ B-Signalkaskade) [Mahdi et al. 2006]. In diesem Zusammenhang wurden auch Weidenrindenextrakte untersucht. Hostanka und Mitarbeiter [2007] untersuchten die Aktivität eines ethanolisch ausgezogenen Weidenrindenextraktes und dessen verschiedenen Fraktionen auf anitproliferatives und pro-apoptotisches Potential in verschiedenen Kolon- und Lungenkarzinomzelllinien. Der Extrakt als auch die Fraktionen inhibierten dosisabhängig das Zellwachstum und wirkten pro-apoptotisch. Die Sensitivität für Wachstumshemmung und Apoptose durch den Extrakt und der salicylatreichen Fraktion war bei Zelllinien höher, die Defizite in der COX-2-Exprimierung aufwiesen. Dies stützt die Annahme, dass die beobachtete Aktivität nicht von Cyclooxygenasen abhängt. Der antiproliferative Effekt des Extraktes schien dem von Acetylsalicylsäure sogar überlegen.

Diese antiproliferativen und pro-apoptotischen Effekte in Kolonkarzinomzellen wurden ebenfalls bei STW 33-I beobachtet [Bonaterra et al. 2010b], wobei der Extrakt und seine wässrige Fraktion eine Expressionssteigerung der COX-1, aber nicht der COX-2

bewirkten. Die Kontrollsubstanzen Diclofenac und Acetylsalicylsäure hingegen verminderten die Expression beider Enzyme. Durch eine gesteigerte COX-1 Expression könnte die gastroprotektive Wirkung von STW 33-I erklärt werden. Auch diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass die antiproliferativen Effekte von den Cyclooxygenasen unabhängig zu sein scheinen. Ob sich Weidenrindenexakte *in vivo* zur Krebsprävention eignen ist allerdings noch eingehend zu klären.

Anxiolytische und antidepressive Wirkungen von Weidenrindenextrakten konnten an Nagern nachgewiesen werden [erwähnt in Buß 2005]. Eine neuere Untersuchung im Porsolt-Schwimmtest an Ratten zeigte jeweils eine signifikant kürzere Immobilisierungsphase nach Behandlung mit STW 33-I, einer salicylalkoholderivatreichen Fraktion von STW 33-I oder Imipramin. Dabei wurde eine Herunterregulierung bestimmter peripherer Glutamatrezeptoren in allen drei Gruppen beobachtet [Koptina et al. 2011, Ulrich-Merzenich et al. 2010a]. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Seit längerer Zeit wird eine maßgebliche Beteiligung von Polyphenolen, wie z. B. Flavonoiden, an der Gesamtwirkung vermutet [Khayyal et al. 2005, Nahrstedt et al. 2007]. Leider sind Weidenrindenextrakte hinsichtlich dieser Inhaltsstoffe meistens unzureichend charakterisiert. Die antiinflammatorische Aktivität von Flavonoiden wurde in zahlreichen Studien untersucht [Übersicht: Prasad et al. 2010]. Sie kann zumindest teilweise durch das antioxidative Potential erklärt werden [Nahrstedt et al. 2007 und darin zitierte Literatur]. Zum Beispiel wurde für den Weidenrindeninhaltsstoff Eriodictyol eine antiinflammatorische Wirkung im Carrageen-induzierten Rattenpfotenödem als Modell für akute Entzündung sowie im Modell der fremdkörperinduzierten Granulombildung als Modell für chronische Entzündung festgestellt [Pelzer et al. 1998]. Auch hemmt das Weidenrindenflavanon Naringenin die NO-Produktion und die Expression von induzierbarer NO-Synthase in LPS-stimulierten murinen Macrophagen durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF-κB *in vitro* [Hämäläinen et al. 2007]. In verschiedenen Testsystemen konnten die antioxidative und radikalfangende Eigenschaften von Weidenrindenextrakten gezeigt werden, dabei wiesen insbesondere polyphenolreiche Fraktionen hohe Aktivitäten auf [Milde 2004, Germann 2005].

Insgesamt konnte durch verschiedene Ansätze gezeigt werden, dass Weidenrindenextrakte vielfältige Aktivitäten aufweisen. Besonders deutlich wird dies am Extrakt STW 33-I, der als Gesamtextrakt und in Einzelfraktionen in verschiedensten Testsystemen untersucht wurde [Übersicht: Nahrstedt et al. 2007]. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich,

dass nicht eine einzige Fraktion für die erzielten Effekte verantwortlich ist. Je nach Testmodell konnten Aktivitäten in verschiedenen Fraktionen beobachtet werden, wobei sich die Fraktion mit dem höchsten Gesamtsalicingehalt nicht positiv von den anderen Fraktionen abhob. Jedoch wurden die Fraktionen nicht anteilig ihrer Masseverteilung im Extrakt eingesetzt, was zu einer unverhältnismäßigen Gewichtung der Effekte durch einzelne Inhaltsstoffklassen führen könnte. Nichtsdestotrotz wird aus der Datenlage ersichtlich, dass offenbar eine Vielzahl möglicher Wirkmechanismen existiert. Dies steht im Einklang mit der aktuellen wissenschaftlichen Meinung, dass Phytopharmaka oft nicht nur einen einzigen pharmakologischen Angriffspunkt besitzen, sondern über ein Zusammenspiel vieler Mechanismen ihr Potential entfalten (Multi-Target-Theorie) [Wagner und Ulrich-Merzenich 2009]. Um diese komplexen Zusammenhänge zu untersuchen, werden in letzter Zeit neue Ansätze verfolgt. Durch technische Fortschritte sind High-throughput-Verfahren auch im Bereich genomicscher oder proteomicscher Strategien möglich geworden. Nach oraler Applikation der Extrakte können z. B. Veränderungen im Transkriptionslevel von Genen oder die Änderung der Expression von Proteinen umfangreich bestimmt werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten zur Identifizierung von Effekten auf verschiedenste regulatorische Zielmoleküle, die durch die Einnahme von Vielkomponentengemischen auftreten. Auch die Auslösung bestimmter Signalkaskaden kann detektiert werden. Dabei wird sowohl der Aktivität von Minorkomponenten Rechnung getragen, die durch Auslösung von Kaskaden und einer damit verbundenen Signalverstärkung möglicherweise profunde Wirkungen auslösen können, als auch der Aktivität von Metaboliten [Ulrich-Merzenich 2010b]. Da jedoch die hochkomplexen Zusammenhänge der Signalsteuerung und deren Auswirkung im menschlichen Körper noch relativ undurchsichtig bleiben, sind der Aussagekraft solcher Methoden in Bezug auf klinisch relevante Wirkungen, Nebenwirkungen und Wirkmechanismen von Phytopharmaka allerdings enge Grenzen gesetzt.

1.3 Zielsetzung

Die positiven Effekte der Weidenrinde sind schon seit Jahrtausenden in der Schmerz- und Rheumatherapie bekannt. Dabei wurde lange Zeit das Phenolglucosid Salicin und sein *in vivo* entstehender Metabolit Salicylsäure als wirksamkeitsbestimmend angesehen. Neuere pharmakologische Studien belegen jedoch, dass eine Erklärung der Wirksamkeit von Weidenrindenpräparaten durch die Wirkung des Salicins alleine nicht ausreicht. Eine maßgebliche Beteiligung von Polyphenolen an der Wirkung wird vermutet [Khayyal et al. 2005, Nahrstedt et al. 2007]. Deshalb sollte der vorliegende Trockenextrakt STW 33-I zunächst mit Schwerpunkt auf die enthaltenen Polyphenole charakterisiert und in einem *in vitro* Testsystem mit Relevanz für die Auffindung antiinflammatorischer Mechanismen untersucht werden. Aktive Fraktionen sollten näher betrachtet, ihre Einzelsubstanzen isoliert und auf Aktivität getestet werden.

Weidenrindenextrakte können trotz Konformität mit dem Europäischen Arzneibuch und Einhaltung des geforderten Gehaltes an Salicylalkoholderivaten hinsichtlich ihrer weiteren Inhaltsstoffe große Heterogenität aufweisen. Um bei der Qualitätskontrolle der Zubereitungen auch die Flavonoide zu erfassen, sollte eine Gruppenbestimmung der wichtigsten Flavonoide erarbeitet und validiert werden. Hierbei sollte auf eine einfache und übertragbare Durchführung sowie eine breite Anwendbarkeit auf andere Weidenrindenextrakte Wert gelegt werden.

Die Resorption von Polyphenolen ist in der heutigen Zeit ebenfalls Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei rückte auch der Einfluss von Matrixeffekten durch Vielkomponentengemische wie Nahrungsmittel und Phytopharmaaka auf die Resorption der Hauptinhaltsstoffe in den Fokus der Wissenschaft. Deshalb sollten erste Versuche hinsichtlich der Resorption der Polyphenole in STW 33-I unternommen werden. Im Rahmen von *in vitro* Versuchen am Caco-2-Zellkulturmodell sollte auch der Einfluss der Extraktmatrix auf die Resorption berücksichtigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ausgangsmaterial

Bei dem verwendeten Extrakt (STW 33-I) handelte es sich um einen Trockenextrakt aus *S. purpurea* L. (Ph. Eur.) der Firma Steigerwald (Charge WB 06-01). Als Auszugsmittel wurde Wasser benutzt, das Drogen-Extrakt-Verhältnis (DEV_{nativ}) betrug 16-23:1. Der Gesamtsalizingehalt wurde mit 23-26% deklariert. Der Trockenextrakt war vom Hersteller mit 3,0% Siliciumdioxid (Ph. Eur.) und 1,2% Magnesiumstearat (Ph. Eur.) versetzt.

2.2 Phytochemische Methoden

2.2.1 Fraktionierung und Isolierungen

2.2.1.1 Fraktionierung des Rohextrakts

10,0 g STW 33-I wurde in demineralisiertem Wasser für 15 min im Ultraschallbad suspendiert und durch einen Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 9) unter Vakuum filtriert. Der Filterrückstand wurde abermals nach 15 min im Ultraschallbad auf gleiche Weise filtriert.

Eine Flüssig-Flüssig-Verteilung wurde nach einer Methode der Firma Steigerwald [beschrieben in Nahrstedt et al. 2007] in abgewandelter Weise durchgeführt (das erste Extraktionsmittel Toluol wurde durch Hexan ersetzt). Alle organischen Lösungsmittel wurden mit demineralisiertem Wasser vorgesättigt.

Zunächst wurde das Filtrat (~250 ml) zweimal mit je 100 ml n-Hexan entfettet. Die wässrige Phase wurde anschließend mit dreimal 100 ml Ethylacetat ausgeschüttelt (EA). Als Nächstes folgte die Verteilung mit dreimal 100 ml n-Butanol (BUT). Da sich die Phasentrennung hier langwierig gestaltete, wurde diese durch Zentrifugation beschleunigt. Nun wurde die wässrige Phase unter Vakuum auf ca. 100 ml eingeengt und 500 ml Ethanol zugegeben. Nach einstündigem Rühren bildete sich ein Niederschlag, der abzentrifugiert und bei 30°C getrocknet wurde (H_2O). Der wässrig-ethanolische Überstand wurde bei 40°C Wasserbadtemperatur zur Trockene eingeengt (EtOH). Die organischen Phasen der Flüssig-Flüssig-Verteilung wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert (40°C). Sie wurden jeweils wieder in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Lagerung aller Fraktionen erfolgte unter Argon bei -20°C. Die Prozedur wurde fünffach (mit je 10 g Extrakt) wiederholt. Die Überprüfung der

Auftrennung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Methode *D1*, Derivatisierung: Anisaldehyd-Reagenz und Naturstoffreagenz A/Macrogol).

2.2.1.2 Isolierungen

Offene Säulenchromatographie

Sx: Um die Ethylacetatfraktion weiter aufzutrennen, wurde eine Sephadex LH-20- Säule (Füllhöhe: 67 cm, Ø 4,0 cm, Partikelgröße 25-100 µm, Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Es wurde 75%iger Ethanol bei einem Fluss von 1 ml/min benutzt, um 3,5 g der Fraktion zu chromatographieren. Die Unterfraktionen wurden anhand von Dünnschichtchromatogrammen (Methode *D2*, Derivatisierung: jeweils Naturstoffreagenz A/Macrogol und Anisaldehyd) sinnvoll vereinigt. Die Trennung wurde einmal wiederholt.

S1: Für Fraktion EA4 wurde eine Silicagelsäule verwendet (Füllhöhe: 30 cm, Ø 3,0 cm Gelduran Si60, 63-200 µm, Merck), Fließmittel: EtOAc/MeOH-Gemische steigender Polarität (100/0 → 0/100). Die Vereinigung der Unterfraktionen erfolgte analog zu Sx.

Flash-Chromatographie

Tab. 2.1 Methoden für die Flash-Chromatographie. M: Methode, S: verwendete Säule, FM A bzw. B: Fließmittel A bzw. B, t: Zeit (min), FM A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), F: Fluss (ml/min).

M	S	FM A	FM B	t	FM A/B	F
F1	1	H ₂ O	MeOH	0-60 60-65	70/30 → 40/60 40/60 → 0/100	20
F2	1	H ₂ O mit 0,05% TFA	MeOH mit 0,05% TFA	0-90 90-95	70/30 → 40/60 40/60 → 0/100	15
F3	1	H ₂ O mit 0,05% TFA	MeOH mit 0,05% TFA	0-90 90-95	60/40 → 40/60 40/60 → 0/100	15
F4	2	EtOAc	MeOH	0-15 15-20 20-35 35-40 40-60	100/0 100/0 → 95/5 95/5 95/5 → 80/20 80/20	7
F5	1	H ₂ O	MeOH	0-10 10-80 80-85 85-90 90-95	80/20 → 60/40 60/40 → 30/70 30/70 30/70 → 0/100 0/100	20

Verwendete Säulen für die Flash-Chromatographie:

- 1 SVP D40 RP18, 25-40 µm, 90 g mit Vorsäule Lichroprep RP18, 25-40 µm, 10 g, (Merck)
- 2 SVF D26 Si60, 15-40 µm, 30 g, (Merck)

Die Proben wurden im Anfangsfließmittel gelöst und mit einem Teil der stationären Phase einrotiert. Die so hergestellte Probe wurde trocken in die Vorsäule gefüllt. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor.

Semipräparative HPLC

Tab. 2.2 Methoden für die semipräparative HPLC. M: Methode, S: verwendete Säule, FM A bzw. B: Fließmittel A bzw. B, t: Zeit (min), FM A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), F: Fluss (ml/min)

M	S	FM A	FM B	t	FM A/B	F
H1	2	H ₂ O	MeOH	0-15	55/45	4
H2	3	H ₂ O	MeOH	0-16	45/55 → 36/66	10
H3	1	H ₂ O	MeOH	0-15	65/35 → 58/42	3
H4	3	H ₂ O	MeOH	0-25 25-30	60/40 → 40/60 40/60	10
H5	2	H ₂ O	MeOH	0-11 11-12 12-16 16-20 20-24	70/30 70/30 → 60/40 60/40 60/40 → 10/90 10/90	4
H6	3	H ₂ O	MeOH	0-15 15-30	68/32 → 65/35 65/35	10
H7	3	H ₂ O	MeOH	0-10 10-13	50/50 → 40/60 40/60 → 10/90	10
H8	3	H ₂ O	MeOH	0-7 7-20	50/50 → 42/58 42/58 → 37/63	10
H9	1	H ₂ O	MeOH	0-15	30/70 → 22/78	3
H10	3	H ₂ O	MeOH	0-14	40/60 → 33/67	10
H11	1	H ₂ O	MeOH	0-18 18-20	55/45 → 52/48 52/48 → 5/95	3
H12	1	H ₂ O	MeCN	0-15	68/32 → 62/38	3,5
H13	1	H ₂ O	MeOH	0-15	55/45 → 65/35	3
H14	1	H ₂ O	MeOH	0-21	45/55 → 36/64	3
H15	1	H ₂ O	MeOH	0-5 5-20	32/68 → 30/70 30/70	3

Verwendete HPLC-Säulen (semipräparativ):

- 1 Pursuit XRs, C18, 5 µm, 250 x 10 mm (Varian)
- 2 Polaris C8-A, 5 µm, 250 x 10 mm (Varian)
- 3 Eurosphere-100, C18, 7 µm, 16 x 25 mm (Knauer)

Die Proben wurden im Anfangsfließmittel gelöst und manuell injiziert. Alle Trennungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mittels eines Diodenarray-Detektors.

2.2.1.3 Dünnschichtchromatographie und HPTLC

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Hilfe von DC-Aluminiumfolien, Kieselgel 60 F₂₅₄, (Merck) durchgeführt, die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC, high performance thin layer chromatography) mit Glasplatten (200 x 100 mm HPTLC Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck). Die DC-Platten wurden vor Gebrauch mit Methanol gewaschen, die HPTLC-Platten zusätzlich bei 120°C 30 min aktiviert. Die Substanzen wurden per Hand oder mittels eines Auftragegerätes appliziert, getrocknet und in einer gesättigten Kammeratmosphäre mithilfe des jeweiligen Fließmittelgemisches chromatographiert. Die Detektion erfolgte nach Derivatisierung bei Tageslicht und unter UV-Licht bei 254 und 366 nm.

Trennsysteme:

- D1** Ethylacetat/Methanol/H₂O 77+15+8 (aus Ph. Eur.: Identitätsprüfung Salicis cortex)
D2 Ethylacetat/Methanol/H₂O 200+30+15
D3 Hexan/Ethylacetat/Tetrahydrofuran/Methanol/Ameisensäure 12+10+10+3+3

Sprühreagenzien

Anisaldehyd-Reagenz	0,5% Anisaldehyd, 84,5% MeOH, 10%, Eisessig, 5% H ₂ SO ₄ konz. (alle V/V)	Detektion nach Erhitzen bei 120 °C; Auswertung bei Tageslicht
----------------------------	---	---

Naturstoffreagenz A/ Macrogol (NP/PEG):	NP: 1% in MeOH (m/V) PEG 400: 5% in MeOH (m/V)	Detektion nach Besprühen mit beiden Lösungen; Auswertung bei 366 nm
--	---	---

2.2.2 Strukturaufklärung

2.2.2.1 NMR-Spektroskopie

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels eindimensionaler (^1H -, ^{13}C -NMR) sowie zweidimensionaler Verfahren. Zur Ermittlung homonuklearer Kopplungen dienen $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experimente (*correlated spectroscopy*). Hier werden Spin-Spin-Kopplungen über zwei, drei oder vier Bindungen detektiert. $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY-und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Experimente (*rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy* bzw. *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*) verdeutlichen homonukleare Kernkopplungen aufgrund räumlicher Nähe. Zur Visualisierung heteronuklearer Kopplungen wurden $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC- und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektren (*heteronuclear single quantum coherence* bzw. *heteronuclear multiple bond correlation*) aufgenommen. Durch $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren werden direkt am jeweiligen Kohlenstoff gebundene Protonen detektiert, während bei $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experimenten 2J , 3J und evtl. 4J -Korrelationen zwischen ^{13}C -Kernen und Protonen genutzt werden können.

Zunächst wurde durch Integration der Signale im Protonenspektrum die Anzahl an entsprechenden Protonen pro Signal bestimmt und die Kopplungskonstanten ermittelt. Aus den ^{13}C - bzw. ^1H -Spektren wurden charakteristische Verschiebungsmuster entnommen. Darauffolgend wurden durch $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC Experimente direkt gebundene Protonen den jeweiligen Kohlenstoffkernen zugeordnet, um anschließend die Strukturaufklärung mittels weiterer zweidimensionaler Experimente fortzuführen.

Alle Spektren wurden in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg (Avance 300, Avance 600 und Avance III 600 Kryo, Bruker) aufgenommen. Hierfür wurden die Proben in deuteriertem Lösungsmittel (Methanol-d₄, 99,8%, Deutero) gelöst. Die Signale wurden auf den internen Standard Tetramethylsilan oder das undeuterierte Lösungsmittel bezogen. Zur Auswertung wurde die Software Bruker Top Spin 2.1 verwendet.

2.2.2.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Substanzen erfolgte in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg. LR-MS Spektren wurden mithilfe eines Finnigan MAT SSQ 710 A (EI-MS: 70 eV) und eines ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 (ESI-MS: 3 kV, Kapillare: 250°C) aufgenommen, HR ESI-MS Spektren mittels eines UHD accurate mass Q-TOF (Agilent Technologies).

2.2.2.3 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der isolierten Substanzen wurden diese in Methanol (Uvasol, Merck) gelöst und die Lösungen an einem Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer gemessen. Alternativ wurden die UV-Maxima direkt aus den 3D-HPLC-Chromatogrammen des DAD-Detektors ermittelt (Fließmittel: Methanol-Wasser-Gemische).

2.2.2.4 Polarimetrie

Die Messzelle ($l = 5 \text{ cm}$) wurde mit den jeweils in Methanol (Uvasol, Merck) gelösten Substanzen gefüllt. Die Messung der Drehwinkel erfolgte gegen das reine Lösungsmittel als Kompensationsflüssigkeit bei 589 nm (D-Linie des Natriumlichts). Die Berechnung der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^T$ erfolgte nach folgender Formel [Hesse et al. 2005]:

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

α : Drehwinkel [$^\circ$]

c : Konzentration [g/ml]

l : Schichtdicke [dm]

T : Temperatur [$^\circ\text{C}$]

2.2.2.5 CD-Spektroskopie

Zur Bestimmung des Circulardichroismus wurden die Substanzen in Methanol (Uvasol, Merck) gelöst, in die Messküvette (Quartz, 0,1 cm Schichtdicke) gefüllt und die Elliptizität bei Raumtemperatur gemessen. Die molare Elliptizität $[\theta]_M$ lässt sich nach folgender Formel berechnen [Hesse et al. 2005]:

$$[\theta]_M = \frac{\theta \cdot M}{100 \cdot c \cdot l}$$

$[\theta]_M$: molare Elliptizität [$^\circ \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$]

θ : Elliptizität [$^\circ$]

M : Molmasse [g/mol]

c : Konzentration [g/ml]

l : Schichtdicke [dm]

2.2.2.6 Bestimmung der Konfiguration der 1,2-Cyclohexandiolderivate

6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin und Isograndidentatin A wurden in Methanol gelöst (1 mg/ml). 1 ml wurde mit 1 ml 1M TFA (50 % MeOH) in ein Wheaton-V-Vial pipettiert und 15 min bei 120°C im Trockenschrank hydrolysiert. Anschließend wurden die Hydrolyseprodukte und *cis*- sowie *trans*-1,2-Cyclohexandiol als Referenzen mittels HPTLC (Methode D3) über eine Laufstrecke von 8 cm chromatographiert und mithilfe von Anisaldehyd-Sprühreagenz detektiert. Die Referenzen *cis*- bzw. *trans*-1,2-Cyclohexandiol besitzen einen R_f-Wert von 0,63 bzw. 0,59 und wiesen nach Derivatisierung eine rote bzw. blaue Färbung bei Tageslicht auf [vgl. Burlingham et al. 2008].

2.2.2.7 Kapillarelektrophoretische Ermittlung der Glucosekonfiguration

Hierbei wurde eine Methode von Noe und Freissmuth [1995] in abgewandelter Form angewandt. Für die Hydrolyse wurden jeweils 1 mg der Probe und 0,5 ml 23%ige TFA (in H₂O) in ein hitzebeständiges Probengläschen gegeben, dicht verschlossen und bei 120°C 60 min im Trockenschrank belassen. Die TFA wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Die hydrolysierte Probe wurde nun, genau wie je 1 mg der Vergleichssubstanzen L- und D-Glucose, mit 60 µl einer frisch hergestellten 0,1 M S-(-)-1-Phenylethylaminlösung zum jeweiligen Imin umgesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Zugabe von 22,5 µl einer 4,6 M Natriumcyanoborhydridlösung und 60-minütigem Erhitzen bei 90°C zum Amin reduziert. Die Vergleichsproben wurden mit H₂O 1:10 verdünnt und diese sowie die Substanzprobe der Kapillarelektrophorese unterzogen. Durch Verwendung von enantiomerenreinem S-(-)-1-Phenylethylamin wird neben einem neuen Stereozentrum auch ein Chromophor in die Moleküle eingeführt, somit sind die beiden Glucosederivate nun Diastereomere, welche mittels non-chiraler Trennmethoden separierbar und per UV-Licht detektierbar sind.

Elektrophoresebedingungen:

Kapillare:	70/75 cm, 50 µm, Quarz
Puffer:	50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ in 23%igem MeCN (pH 10,3)
Infektion:	3 psi sec
Spannung:	30 kV
Detektion:	200 nm
Temperatur:	27°C

2.2.3 Gruppenbestimmungen

Um die durch Flüssig-Flüssig-Verteilung gewonnenen Fraktionen phytochemisch zu charakterisieren, wurden Bestimmungen hinsichtlich einzelner Inhaltsstoffklassen in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch durchgeführt.

2.2.3.1 Gehaltsbestimmung von Salicylalkoholderivaten und Salicin

Die Salicylalkoholderivate wurden nach der Monographie „Weidenrinde“ (Ph. Eur. 5.8) basisch hydrolysiert und das entstandene Salicin mittels HPLC-DAD-Analyse quantifiziert.

Interner-Standard-Lösung: 50 mg Resorcin wurden in 10 ml Methanol gelöst.

Untersuchungslösung: Auf die im Arzneibuch angegebene Extraktion wurde verzichtet, da bereits ein Trockenextrakt vorlag. Jeweils ca. 100 mg des Extraktes bzw. der Fraktionen wurden in 5,0 ml MeOH aufgenommen und mit 0,5 ml 0,1 M NaOH Lösung versetzt. Die Mischung wurde 1 h lang unter Rühren im Wasserbad von etwa 60°C unter Rückflusskühlung erhitzt, nach dem Abkühlen mit 0,5 ml 1 M HCl versetzt und mit einer Methanol/ Wasser-Mischung (1:1) zu 20,0 ml verdünnt. 1,0 ml dieser Lösung wurden mit 1,0 ml Interner-Standard-Lösung versetzt. Anschließend erfolgte eine Filtration durch ein Membranfilter (0,2 µm Porenweite).

Referenzlösung a: 18,5 mg Salicin wurden in 10,0 ml einer Methanol/ Wasser-Mischung (8:2 V/V) gelöst. Die Lösung wurde mit 1,0 ml Interner-Standard-Lösung versetzt.

Referenzlösung b: 1,0 mg Picein wurde in 1,0 ml Referenzlösung a gelöst.

HPLC-Bedingungen:

Säule: Purospher STAR, RP 18e, 5 µm, 250 mm, ID 4 mm (Merck)

Fließmittel: Tetrahydrofuran : Wasser (1,8 + 98,2) + 0,5% o-H₃PO₄ (85 %)

Fluss: 1 ml/min

Wellenlänge: 270 nm

10 µl Referenzlösung b wurden injiziert. Die Bestimmung ist laut Arzneibuch nur durchführbar, wenn die Auflösung zwischen den Peaks von Salicin und Picein und jene zwischen den Peaks von Picein und Resorcin jeweils mindestens 1,5 beträgt. Dies war der Fall.

10 µl Referenzlösung wurden 5-mal injiziert. 10 µl Untersuchungslösung wurden dreifach vermessen. Die Chromatographie erfolgte über eine Dauer, die der vierfachen

Retentionszeit des Salicin-Peaks entspricht. Der Prozentgehalt an Gesamtsalicylalkoholderivaten GS wurde als Salicin nach folgender Formel berechnet:

$$GS [\%] = \frac{2 \cdot S_1 \cdot S_4 \cdot m_2 \cdot p}{S_2 \cdot S_3 \cdot m_1}$$

- S_1 : Peakfläche von Salicin im Chromatogramm der Untersuchungslösung
- S : Peakfläche von Resorcin im Chromatogramm der Untersuchungslösung
- S_3 : Peakfläche von Salicin im Chromatogramm der Referenzlösung a
- S_4 : Peakfläche von Resorcin im Chromatogramm der Referenzlösung a
- m_1 : Einwaage des Trockenextraktes bzw. der Fraktionen in der Untersuchungslösung [mg]
- m_2 : Einwaage des Salicins in der Referenzlösung a [mg]
- p : Prozentgehalt an Salicin in der Referenzsubstanz

Der Salicingehalt der Referenzsubstanz betrug 99%.

Zusätzlich zur Bestimmung der Gesamtsalicylalkoholderivate wurden die Proben auch unhydrolysiert vermessen [Meier et al. 1985]. Hierzu wurde ca. 100 mg Probe in 10,0 ml 75%igem Methanol zu 10,0 ml gelöst und 1,0 ml Interne-Standard-Lösung zugesetzt. Es wurden ebenfalls 10 µl injiziert.

2.2.3.2 Gehaltsbestimmung von Gerbstoffen und freien Phenolen

Die photometrische Bestimmung der Phenole erfolgte mit Folin-Ciocalteu Reagenz vor und nach Fällung der Gerbstoffe mit Hautpulver in Anlehnung an das Arzneibuch nach einer Methode von Glasl [1983]. Der Extrakt (150 mg) bzw. die Fraktionen (EA: 100 mg, BUT: 150 mg, EtOH: 300 mg, H₂O: 160 mg) wurden mit siedendem Wasser versetzt und im Wasserbad 30 min bei ca. 80-90°C gehalten. Es erfolgte die Einstellung der unter fließendem Wasser abgekühlten Mischung auf eine Konzentration von 100-300 mg eingewogene Droge pro 100,0 ml. Ein Teil der Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand (=Stammlösung) dunkel aufbewahrt.

Gesamtphenollösung (GPL): 1:5 Verdünnung der Stammlösung.

Restphenollösung (RPL): 10,0 ml Stammlösung wurden mit 100 mg Hautpulver versetzt und 60 min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung ebenfalls 1:5 verdünnt.

Je 2,0 ml GPL bzw. RPL wurden mit 1,0 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz sowie mit 10 ml Wasser versetzt und mit 10,6%iger Natriumcarbonatlösung auf 25,0 ml aufgefüllt. Nach 15 min wurden die Absorptionen der beiden Lösungen bei 691 nm photometrisch gemessen. Als Blindlösung diente Wasser. Anstatt der Simultanbestimmung der Referenzsubstanz Pyrogallol wurde mit einer der Literatur entnommenen, spezifischen Absorption gerechnet [Glasl 1983]. Da sich in der Weidenrinde hauptsächlich Catechingerbstoffe befinden, wurde der von Glasl empfohlene spezifische Absorptionskoeffizient der catechinreichen Droge *Ratanhiae radix* bei 691 nm ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1000$) verwendet. Der prozentuale Gerbstoff-Polyphenolgehalt GP berechnet sich demnach nach der Formel:

$$GP = \frac{15625 \cdot (A_{GPL} - A_{RPL})}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

A_{GPL} : Absorption Gesamtphenollösung

A_{RPL} : Absorption Restphenollösung

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: spezifischer Absorptionskoeffizient

m : Einwaage [g]

Zusätzlich wurde der Gehalt an Gesamtphenolen berechnet:

$$GPL = \frac{15625 \cdot A_{GPL}}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m}$$

GPL: Gehalt an Gesamphenolen

Der Gehalt an Restphenolen wurde analog bestimmt.

2.2.3.3 Flavonoidbestimmung

Eine photometrische Bestimmungsmethode nach Komplexierung der Flavonoide mit Borsäure-Oxalsäure-Reagenz nach der Monographie Weißdornblätter mit Blüten Trockenextrakt (Ph. Eur. 5.8) wurde angewendet.

Je nach Fraktion wurden 0,1-0,4 g Probe in Ethanol 60% (V/V) zu 100,0 ml gelöst (= Stammlösung).

Untersuchungslösung: 5,0 ml Stammlösung wurden zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde in 8 ml einer Mischung von 10 Volumenteilen Methanol und 100 Volumenteilen Essigsäure 99% gelöst und in einen 25 ml Messkolben überführt. Es wurde mit 3 ml derselben Lösung nachgewaschen und 10,0 ml einer Lösung von Borsäure (25%) und Oxalsäure (20%) in wasserfreier Ameisensäure zugesetzt. Der Kolben wurde mit wasserfreier Essigsäure ad 25,0 ml aufgefüllt.

Kompensationsflüssigkeit: siehe *Untersuchungslösung*; die Borsäure-Oxalsäure-Mischung wurde durch reine wasserfreie Ameisensäure ersetzt.

Nach 30 min erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption der Untersuchungslösung bei 410 nm gegen die Kompensationsflüssigkeit. Der Prozentgehalt an Gesamtflavonoiden F wurde als Hyperosid nach folgender Formel berechnet (Die spezifische Absorption von Hyperosid $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ wurde mit 405 angenommen):

$$F [\%] = \frac{1.235 \cdot A}{m}$$

A: Absorption bei 410 nm

m: Einwaage in Gramm

2.3 Methoden zur Gehaltsbestimmung von Naringeninderivaten

2.3.1 Probenvorbereitung

50 mg STW 33-I wurde ad 10,0 ml gelöst (LM 1, 15 min Ultraschallbad). Eine Mischung von 1,0 ml der Probenlösung und 1,0 ml *TFA-Lösung* wurde in einem Wheaton V-Vial (5 ml Fassungsvermögen, Schraubdeckel mit Loch und Septum aus Teflon/Silikon) für 30 min bei 120°C im Trockenschrank erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde die Probe mit 0,6 ml *NaOH-Lösung* versetzt, in einen 5,0 ml Meßkolben überführt, mit 1,0 ml *Phosphatpuffer* versetzt und mit Wasser aufgefüllt. Der pH Wert wurde überprüft (pH 6-7). 1,0 ml wurden entnommen und zusammen mit 0,6 ml *Glucosidaselösung* und 1,0 ml H₂O 30 min lang bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Das abgekühlte Gemisch wurde unter Zusatz von 1,0 ml *IS-Lösung* ad 5,0 ml mit Methanol aufgefüllt. 30 µl wurden in die HPLC-Anlage injiziert (Methode N2), die Auswertung erfolgte bei 289 nm, die Gehaltsbestimmung anhand einer Naringenin-Kalibriergerade.

Interner Standard

1,0 ml *IS-Lösung* wurden mit *LM 3* ad 5,0 ml aufgefüllt. Die Probe wurde zu Beginn der Bestimmung dreimal injiziert.

Berechnung

Der Mittelwert der Flächen aus der Dreifachbestimmung des internen Standards wurde mit dem Verhältnis der Peakflächen A (Naringenin)/A (Hesperetin) jeder Analyse multipliziert. Anhand einer Kalibriergeraden wurde die Konzentration an Naringenin der injizierten Lösung berechnet. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 25 und Division durch die Anfangskonzentration c_0 wurde der prozentuale Gehalt an Naringenin berechnet. Dieser wurde über die Molare Masse in den Gehalt an Naringeninglucosid umgerechnet (M_r (Naringenin): 282,3 g/mol, M_r (Naringeninmonoglucosid): 434,4 g/mol).

Kontrolle der Hydrolyse

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse wurden 30 µl der Probe mittels Methode *N1* chromatographiert. Die Auswertung erfolgte bei 289 nm. Um zu Vergleichszwecken die Lösung vor der Hydrolyse zu bestimmen, wurde diese 1:25 verdünnt und 20 Volumenprozent *IS-Lösung* zugegeben. Diese wurde auf dieselbe Weise analysiert.

2.3.2 Puffer und Lösungen

<i>LM 1</i>	Methanol-Wasser 7+3 (V/V), entgast
<i>LM 2</i>	Methanol-Wasser 3+7 (V/V), entgast
<i>LM 3</i>	Methanol-Wasser 1+1 (V/V), entgast
<i>TFA-Lösung</i>	11,5% TFA in <i>LM2</i>
<i>NaOH-Lösung</i>	2M NaOH in H ₂ O
<i>Phosphatbuffer</i>	1M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O / Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in H ₂ O, pH=6,4
<i>Glucosidaselösung</i>	2 mg/ml β-D-Glucosidase (≥ 1000 U/mg aus Mandeln, Roth) in H ₂ O
<i>IS-Lösung</i>	7,5 mg Hesperetin ad 10,0 ml MeOH und 1:1 Verdünnung mit <i>LM 3</i>

2.3.3 HPLC-Methoden

Zur Bestimmung der Naringeninderivate bzw. im Zuge der alternativen Methoden wurden verschiedene HPLC-Methoden verwendet (Tab. 2.3). Methode *N0* wurde zur Methodenentwicklung anhand der Standards Naringenin-5-O-β-glucosid, Naringenin-7-O-β-glucosid und Naringenin verwendet. Zur quantitativen Analyse des, durch die

Aufarbeitung entstandenen Naringenins, kam Methode *N1* zum Einsatz. Durch Methode *N2* werden alle relevanten Naringeninderivate aufgetrennt. Somit kann die Hydrolyse überprüft werden. Methode *N3* wurde als alternative Bestimmungsmethode angewendet.

Tab. 2.3 Methoden für die Naringenin- bzw. Flavonoidbestimmung (HPLC). M: Methode, FM A bzw. B: Fließmittel A bzw. B, t: Zeit (min), FM A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), F: Fluss (ml/min).

M	FM A	FM B	t	FM A/B	F
N0	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-7 7-9 9-14 14-16 16-19	75/25 75/25 → 30/70 30/70 30/70 → 75/25 75/25	0,75
N1	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-35 35-45 45-70 70-73 73-77 77-81 81-85	90/10 → 80/20 80/20 → 75/25 75/25 → 55/45 55/45 → 0/100 0/100 0/100 → 90/10 90/10	0,75
N2	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-21 21-24 24-26 26-29 29-34	67/33 67/33 → 90/10 90/10 90/10 → 67/33 67/33	1,0
N3	H ₂ O mit 1% THF (V/V)	MeOH	0-45 45-50 50-51 51-60	80/20 → 20/80 20/80 → 80/20 80/20 51-60	0,6

Weitere Einstellungen am Gerät:

M	Injektionsvolumen [µl]	Temperatur Säulenofen [°C]	Temperatur Autosampler [°C]	Detektions- wellenlänge [nm]
N0	30	30	20	289
N1	30	30	20	289
N2	30	30	20	289
N3	20	25	10	282

Verwendete Säule: Purospher STAR, RP 18e, 5 µm, 250 mm, ID 4 mm (Merck).

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellmaterial, Kultivierung, Zellzahlbestimmung

Die Ziellinien HMEC-1 (humane vaskuläre Endothelzellen von CDC) und Caco-2 (humane Kolonkarzinomzellen von ATCC) wurden im Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Beide Zelllinien bestehen aus adhärenten Zellen. Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, 3 ml Trypsin/EDTA aufgegeben und für 5 min inkubiert. Die vollständig abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium (im Falle der HMEC-Zellen in Abstopfmedium) suspendiert, zur Entfernung des Trypsins zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in frischem Medium gelöst. Ein Aliquot wurde in eine sterile Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf ca. 15-20 ml aufgefüllt.

Zur Zellzahlbestimmung wurde das oben beschriebene Zellpellet in einem definierten Volumen Kulturmedium resuspendiert. Ein Aliquot wurde 1:1 mit Trypanblaulösung verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und mikroskopiert. Die vitalen, nicht angefärbten Zellen wurden in allen vier Feldern gezählt, der Mittelwert gebildet und die Zellzahl berechnet.

2.4.2 Kulturmedien, Puffer, sonstige Reagenzien

Caco-2-Zellen

Kulturmedium (DMEM)

500 ml	DMEM Gibco (Dulbecco's Modified Eagles Medium (4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 25 mM HEPES)), Life Technologies, Carlsbad, USA
50 ml	FCS, Biochrom, Berlin
5 ml	NEA 100 x (nicht-essentielle Aminosäuren), Biochrom, Berlin

Versuchsmedium (DMEM-PEST)

Wie Kulturmedium, jedoch Zusatz von 5 ml PEST (Penicillin, 10000 U/ml, Streptomycin 10000 µg/ml, Biochrom, Berlin).

HBSS

HBSS (Hank's Balanced Salt solution w/o phenol red), Biochrom + 25 mM HEPES, Biochrom, mit 10M NaOH eingestellt auf pH 7,4, sterilfiltriert.

HMEC-Zellen*Kulturmedium (Provitro, Berlin)*

500 ml	Endothelial Cell Growth Medium
50 ml	FCS, Biochrom
23,5 ml	Supplements
3,5 ml	Antibiotika-Mix

Abstoppmedium

500 ml	Medium 199, PAN GmbH, Aidenbach
50 ml	FCS, Biochrom

Sonstige Reagenzien für die Zellkultur

FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum), Biochrom, Berlin hitzeinaktiviert (30 min bei 56°C im Wasserbad)
FITC-markierter ICAM-1 Antikörper	MAK mouse anti human CD54:FITC, Biozol, Eching
Kollagen	Collagen G (4 mg/ml), Biochrom, Berlin
Kollagen-Lösung	0,25% (V/V) Kollagen in PBS
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MTT-Reagenz	4 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert
PBS	Dulbecco (w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺), Biochrom, Berlin
SDS	Natriumdodecylsulfat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS-Lösung	10% (m/V) SDS in Reinstwasser, sterilfiltriert
TNF-α	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung	0,4% Trypanblau (m/V) in PBS, sterilfiltriert
Trypsin/EDTA	10 x Trypsin 1:250/EDTA-Lösung (0,5%/0,2%), Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin/EDTA-Lösung 10% (V/V) in PBS

Verbrauchsmaterial

12-well-Transwell-Einsätze (PC, 0,4 µm)	Corning Life Science, Corning, USA
und 12-well-Zellkulturplatten	
Kryoröhrchen	Cryovial T310-2A, Simport, Québec, CAN
Membranfilter (0,20 µm)	Minisart 16534, Sartorius, Göttingen
Serologische Pipetten	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturtestplatten (24- und 96-well)	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, CH

2.4.3 ICAM-1-Assay

Zunächst wurden 18×10^4 HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) pro well in 24-well Platten angesät. Die Kultivierung erfolgte über ca. 2 Tage, bis ein konfluenter Monolayer unter dem Mikroskop festzustellen war.

2.4.3.1 Probenaufgabe

Die Testsubstanzen bzw. -fraktionen wurden in gewünschter Konzentration gelöst (max. Endkonzentration des Lösungsmittels im Medium: 0,1% EtOH bzw. 0,1% DMSO). Nach Entfernung des Kulturmediums erfolgte die Aufgabe von je 500 µl Testlösung pro well (Doppelbestimmung jeder Substanz), in vier wells wurde reines Medium pipettiert. Als Kontrolle diente Parthenolid (5 µM bzw. 10 µM Aufgabekonzentration). Nach 30 min Inkubation wurde in alle wells (mit Testlösung) TNF-α zugegeben (Endkonzentration im well: 10 ng/ml). Zur Kontrolle des ICAM-1-Basalwertes der HMEC-1-Zellen und zur Ermittlung der maximal möglichen ICAM-1-Expression im Testsystem enthielten zwei Paare von wells ausschließlich Zellen und Medium, wobei zur Ermittlung der maximalen Expression in ein Paar TNF-α zugegeben wurde, die Kontrolle blieb unbehandelt. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂). Um Lösungsmittel-einflüsse auszuschließen, wurden diese in den maximalen Endkonzentrationen im Medium ebenfalls untersucht. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche mit jeweils unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt.

2.4.3.2 Durchflusscytometrische Bestimmung

Vorbereitung der Proben

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Sie wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit Formalin fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Nun erfolgte eine Zugabe von lichtempfindlichen FITC-markierten Mausantikörpern gegen ICAM-1 (Biozol) unter Lichtausschluss. Nach erneutem Waschen wurden die Proben gemessen.

Einstellungen am Gerät

Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 519 nm

Spannung: 500 V, Fluss: 60 µl/min, Software: BD Cellquest Pro

Ein Analysenfenster wurde auf die unbehandelten Zellen ausgelegt und 5000 Zellen der zu analysierenden Probe innerhalb dieses Bereiches zur Auswertung herangezogen.

Auswertung

Zur Auswertung der Dateien wurde das Programm WinMDI 2.9 benutzt und das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität ermittelt. Der Wert der maximalen Expression (Zellen in Medium unter Zusatz von TNF-α) wurde durch Mittelwertbildung der beiden Proben ermittelt und die anderen Messwerte prozentual darauf bezogen.

2.4.4 MTT-Assay

HMEC-1-Zellen wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte ausgesät (9×10^4 Zellen pro well) und 24 h kultiviert (37°C, 5% CO₂). Die zu testenden Substanzen wurden analog zur Bestimmung im ICAM-1-Assay gelöst und jeweils 100 µl aufgegeben. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank und einem Waschschritt mit PBS wurde MTT-Reagenz (1:10-Verdünnung mit Medium) zugegeben. So wurde eine mögliche Interaktion der Testsubstanzen mit dem MTT-Reagenz ausgeschlossen. Nach weiterer Inkubation für 3 h im Brutschrank wurde der Überstand entfernt und SDS-Lösung aufgegeben. Zum Lösen der Formazankristalle wurde der Ansatz weitere 24 h unter Lichtausschluss aufbewahrt und die Absorption anschließend photometrisch bei 560 nm gemessen. Als Kontrolle (maximale Viabilität, Bezugswert 100%) wurden unbehandelte Zellen eingesetzt und die Absorptionen der Testsubstanzen prozentual auf diese bezogen. Die Bestimmung erfolgte in sechs Parallelen in mindestens drei unabhängigen Versuchen. Um auch hier Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können, erfolgte eine Kontrolle nach derselben Methode.

2.4.5 Caco-2-Resorptionsversuch

Der Versuch wurde nach der Methode von Hubatsch und Mitarbeitern [2007] durchgeführt. Die Berechnung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten erfolgte nach Artursson [1990].

2.4.5.1 Kultivierung der Zellen auf Transwell-Einsätzen

Caco-2-Zellen einer ca. 90% konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, im Versuchsmedium aufgenommen, vereinzelt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in Medium gelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Transwell-Einsätze wurden unter sterilen Bedingungen in die Platte eingesetzt und jedes Filter mit 100 µl des Versuchsmediums benetzt. Die aufgegebene Zellzahl betrug 3×10^5 Zellen in je 0,5 ml Versuchsmedium pro well. Die Platten wurden 6-16 h lang inkubiert (37°C , 5% CO_2), daraufhin folgte der erste Mediumwechsel (die nicht-adhärenen Zellen wurden entfernt, um einer Multilayerbildung entgegenzuwirken). Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Dazu wurde das Medium der basolateralen Seite mithilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, während das der apikalen Seite vorsichtig durch Dekantieren entfernt wurde. Frisches Medium wurde aufgegeben (0,5 ml apikal, A und 1,5 ml basolateral, BL) und die Zellen wurden bis zum nächsten Mediumswechsel inkubiert (37°C , 5% CO_2). Auf diese Weise folgte die Kultivierung der Zellen über 21-29 Tage.

2.4.5.2 Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Der transepitheliale elektrische Widerstand wurde mithilfe eines Voltohmmeters bestimmt. Zunächst wurde das Medium im Transwell-Einsatz gegen HBSS ausgetauscht und 15 min bei 37°C inkubiert. Der Behälter der Ringelektrode wurde mit 70%igem Ethanol 15 min unter der Sterilbank desinfiziert und danach mehrmals mit sterilem HBSS-Puffer (37°C) gewaschen. Anschließend wurde das Transwell-Insert aus dem Inkubator entnommen und sofort eingesetzt. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde am Gerät abgelesen. In regelmäßigen Abständen wurde die Funktionstüchtigkeit des Gerätes mithilfe einer Kalibrierzelle nach Anleitung des Herstellers überprüft.

2.4.5.3 Durchführung des Transportversuchs

Die Transportversuche wurden mit den Passagen 34 bis 37 durchgeführt. Der letzte Mediumwechsel erfolgte 12-24 h vor dem Experiment. Die Einsätze wurden vor dem Versuch zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit Puffer (0,5 ml A und 1,5 ml BL) 15 min im Orbitalschüttler (37°C , 55 rpm) inkubiert. Daraufhin wurde der TEER Wert jeder Polycarbonatmembran bestimmt. Zum Versuch zugelassen wurden Monolayer mit einem Widerstand $\geq 350 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Alle zu testenden Substanzen wurden zur besseren Vergleichbarkeit in DMSO gelöst und so verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO im HBSS-Puffer 0,5% nicht überstieg. Der in den Transwell-Einsätzen enthaltene Puffer wurde vorsichtig dekantiert und die Inserts in eine neue 12-well-Zellkulturplatte eingesetzt, in der sich 1,5 ml 37°C warmer HBSS-Puffer pro well befand. 700 μl der Testsubstanz wurde aufgegeben und sofort 200 μl wieder entfernt ($t=0$), hierdurch wurde die Verdünnung der Aufgabelösung durch noch enthaltenen Puffer im oberen Kompartiment berücksichtigt. Zusätzlich zu den Testsubstanzen wurden bei jedem Experiment zwei Kontrollen mitgeführt (Propranolol 100 μM und FITC-Dextran 1 mM, jeweils in HBSS). Nun wurde die Platte im Orbitalschüttler inkubiert, nach $t=20$, 40, 60 und 90 min wurden je 1 ml (FITC-Dextran: 500 μl) aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und sofort gegen frischen, 37°C warmen HBSS-Puffer ausgetauscht. Zum Zeitpunkt $t=90$ min wurde zusätzlich eine Probe aus dem apikalen Kompartiment entnommen. Danach wurden die Monolayer je zweimal mit HBSS gewaschen und erneut 20 min inkubiert, um darauffolgend den TEER erneut zu messen. Dies diente der Überprüfung der Integrität des Monolayers während des Versuchs. Um den Einfluss der Polycarbonatmembran auf die Permeabilität zu ermitteln, wurde der Versuch ebenfalls ohne Zellmonolayer auf dieselbe Weise durchgeführt.

2.4.5.4 HPLC-Analytik

Die Analytik von Naringenin, Catechol, der Ethylacetatfraktion und Propranolol wurde mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (Tab. 2.4) durchgeführt. Anhand von Kalibriergeraden wurden die jeweiligen Konzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten ermittelt. Es wurde die Säule Purospher STAR, RP 18e, 5 μm , 250 mm, ID 4 mm (Merck) verwendet. Catechol und Naringenin wurden in der EA-Fraktion durch Methode C1 quantifiziert. Die Kalibrierung von Catechol zur Bestimmung des Gehaltes in der Fraktion und als Einzelsubstanz erfolgte mittels Methode C2 (verkürzte Version der Methode C1). Die Kalibrierung für Naringenin in der EA-Fraktion erfolgt mittels Methode C4 (verkürzte

Version von C1). Die Analyse und Kalibrierung von Naringenin als Einzelsubstanz erfolgte durch die Methode C3.

Tab. 2.4 Methoden für die HPLC. M: Methode, FM A bzw.B: Fließmittel A bzw. B, t: Zeit (min), FM A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), F: Fluss (ml/min).

M	Analyt	FM A	FM B	t	FM A/B	F
C1	Catechol und Naringenin in EA (Analyse)	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-10 10-20 20-35 35-45 45-70 70-73 73-77 77-81 81-85	90/10 → 87/13 87/13 87/13 → 80/20 80/20 → 75/25 75/25 → 55/45 45/55 → 0/100 0/100 0/100 → 90/10 90/10	0,75
C2	Catechol Einzelsubstanz (Analyse)/ Catechol in EA (Kalibrierung)	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-17 17-20 20-22 22-25 25-28	90/10 → 85/15 85/15 → 20/80 20/80 20/80 → 90/10 90/10	0,75
C3	Naringenin Einzelsubstanz (Analyse und Kalibrierung)	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-21 21-24 24-26 26-29 29-34	67/33 67/33 → 90/10 90/10 90/10 → 67/33 67/33	1,0
C4	Naringenin in EA (Kalibrierung)	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-10 10-14 14-17 17-20 20-25	63/37 → 55/45 55/45 → 10/90 10/90 10/90 → 63/37 63/37	0,75
C5	Propranolol (Analyse und Kalibrierung)	H ₂ O mit 0,1% HCOOH (V/V), pH 4	MeCN 95% (V/V)	0-8 8-10 10-13 13-15 15-19	70/30 70/30 → 20/80 20/80 20/80 → 70/30 70/30	1,0

weitere Einstellungen am Gerät:

M	Injektionsvolumen	Temperatur	Temperatur	Detektions-
	[µl]	Säulenofen [°C]	Autosampler [°C]	wellenlänge [nm]
C1	75	30	8	289 bzw. 276
C2	75	30	8	276
C3	75	30	8	289
C4	75	30	8	289
C5	75	30	8	290

2.4.5.5 Fluorimetrie

Die Gehaltsbestimmung von FITC-Dextran erfolgte fluorimetrisch mittels eines TECAN-Plattenlesegerätes. Dazu wurden die während des Experiments unter Lichtausschluss gelagerten Proben in eine für die Fluorimetrie geeignete 96-well-Platte pipettiert (je 150 µl, n=3, Probe t=0 und t=90: n=1) und sofort gemessen (Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 519 nm). Für jedes Experiment wurde mit einem Teil der noch verbliebenen und im Dunkeln gelagerten Aufgabelösung eine Kalibriergerade erstellt (n=6).

2.4.5.6 Berechnungen

Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient

Da die durch Kalibrierfunktionen ermittelten Konzentrationen im Akzeptorkompartiment zum Zeitpunkt der Entnahmen um diejenige Substanzmenge vermindert war, die der Bestimmung durch vorhergehende Probennahmen entzogen wurde, erfolgte zunächst eine Berechnung der theoretischen Konzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten. Dazu wurde die reale Konzentration im basolateralen Kompartiment zum Entnahmezeitpunkt bestimmt und die u. U. vorher entnommene absolute Menge addiert. Die so ermittelte theoretische Konzentration wurden gegen die Zeit in ein Diagramm eingetragen und die Steigung der Geraden durch lineare Regression bestimmt. Der Wert der Steigung entspricht dem Wert des zeitabhängigen Substanzflusses durch den Monolayer.

Anschließend wurden für jede Substanz bzw. Fraktion die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten der Substanzen (P_{app} : Koeffizient für die Permeabilität durch die Polycarbonatmembran mit Zelllayer) nach folgender Formel berechnet [Artursson 1990]:

$$P_{app} = \frac{V_{BL}}{A \cdot c_0} \cdot \frac{dc}{dt}$$

P_{app} : scheinbarer Permeabilitätskoeffizient [cm/s]

V_{BL} : Volumen des basolateralen Kompartiments [cm³]

A: Oberfläche des Transwell-Inserts [cm²]

c_0 : Anfangskonzentration [µg/cm³]

dc/dt: Substanzfluss A → BL [µg/(cm³·s)]

Resorption

Die Differenz der absoluten Aufgabemenge (ermittelt durch eine Probe des apikalen Kompartiments zum Zeitpunkt t=0) und der absoluten Restmenge (ermittelt durch eine Probe des apikalen Kompartiments zum Zeitpunkt t=90) wurde für jeden Einzelversuch gebildet und der Mittelwert bestimmt.

Wiederfindung

Die absolut wiedergefundene Stoffmenge im basolateralen Kompartiment (bestimmt durch die theoretische Konzentration im dem basolateralen Kompartiment zum Zeitpunkt t=90) wurde durch die resorbire Menge dividiert. Dies wurde wiederum für jeden Einzelversuch durchgeführt und der Mittelwert für jede Substanz bestimmt.

2.4.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Zelltests wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Hierfür wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient ermittelt. Mittels ungepaarten t-Tests wurden zwei unabhängige Mittelwerte verglichen. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen einzelner unabhängigen Mittelwerten und einem Kontrollwert wurde mit GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software) eine einfache Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett post-hoc Test durchgeführt. P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant angesehen.

2.5 Chemikalien

Lösungsmittel

Für alle HPLC-Methoden wurden Lösungsmittel von Merck (HPLC Qualität, LiChroSolv) und Reinstwasser (Millipore) verwendet. Die für die Fraktionierungen, Isolierungen, Dünnschichtchromatographie (inklusive HPTLC) und Hydrolysen benutzen Lösungsmittel entsprachen p. a. Qualität und stammten von Merck oder Acros. Zum Lösen der Testsubstanzen für Zellbiologische Assays wurde Dimethylsulfoxid (p. a.) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Ethanol (absolut, p. a.) von Baker (Griesheim) und Reinstwasser (Millipore) eingesetzt. Für die Durchflusscytometrie wurde FACSflow von BD verwendet. Weitere verwendete Lösungsmittel sind im Zuge der jeweiligen Methode beschrieben.

Referenzsubstanzen

Apigenin	≥ 99%	Extrasyntthese
cis-Cyclohexandiol	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
trans-Cyclohexandiol	≥ 98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Glucose	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eriodictyol	≥ 99%	Roth, Karlsruhe
Eriodictyol-7-O-β-glucosid	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Hesperetin	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Hesperetin	≥ 95%	Roth, Karlsruhe
Kaffeesäure	Rotichrom TLC	Roth, Karlsruhe
L-Glucose	≥ 99%	Roth, Karlsruhe
Luteolin	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Methylcaffeat	≥ 98,5%	Santa Cruz Biotechnology
Naringenin	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Naringenin	≥ 95%	Roth
Naringenin-7-O-β-glucosid	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Naringenin-7-O-β-glucosid	≥ 90%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
p-Cumarsäure	≥ 97,5%	Roth, Karlsruhe
Picein	≥ 90%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Propranolol-HCl	≥ 98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Quercetin	≥ 99%	Extrasyntthese, Genay Cedex, F
Resorcin	reinst	Merck, Darmstadt
Salicin	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taxifolin	≥ 85%	Sigma-Aldrich (Fluka), Taufkirchen

Sonstige Chemikalien

Ameisensäure 98-100% p. a.	Merck, Darmstadt
Anisaldehyd	Sigma-Aldrich (Fluka), Taufkirchen
Borsäure p. a.	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p. a.	Merck, Darmstadt
Eisessig 100% wasserfrei p. a.	Merck, Darmstadt
FITC-Dextran, M _r ≈4000 g/mol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Hautpulver („Freiberger Hautpulver“)	Filk, Freiberg
Natriumcarbonat p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumcyanoborhydrid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid p. a.	Merck, Darmstadt
o-Phosphorsäure 85% p. a.	Merck, Darmstadt
Oxalsäure p. a.	Merck, Darmstadt
S(-)-1-Phenylethyamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure rauchend 37% p. a.	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95-97% p. a.	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure 99% ReagentPlus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.6 Geräte

Autoklaven	Autoklav 23, Melag, Berlin, D Varioklav 500, H+P, Oberschleißheim
CD-Spektropolarimeter	Jasco J-815 Spektropolarimeter, Jasco, Groß-Umstadt
DC-Geräte	Auftragegerät Linomat 5, Dokumentation Reprostar 3, Software WinCATS 1.4.2, Doppeltrögkammern 10 cm x 10 cm und 20 cm x 10 cm, Camag, Muttenz, CH Auftragegerät AS 30, Heizplatte Thermoplate S, Dokumentation CabUVIS, Software ProViDok 4, Desaga, Wiesloch
Durchflusscytometer	FACSCalibur (Argonlaser, FL-1 Detektor), Becton Dickinson, Heidelberg
Flash-Chromatographie-Anlage	Spot Liquid Chromatography Flash, Software Armen Glider Flash V2.3, Armen, Saint Ave, F
Gefriertrocknungsanlage	P 10 mit Pumpe PK8D, Ilmvac, Ilmenau, Kühler für Isopropanolbad EK 30, Haake, Karlsruhe
HPLC-Anlage, analytisch	Elite LaChrom: Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Säulenofen L-2350, Dioden-Array-Detektor L-2455, Software EZChrom Elite 3.1.7, VWR, Darmstadt
HPLC-Anlage, semi-präparativ	ProStar: Autosampler 410, zwei Pumpen 210, Detektor 335, Fraktionskollektor 701, Software Galaxie Chromatography Data System, Varian, Darmstadt

Inkubator	400596, New Brunswick, Edison, NJ, USA
Kapillarelektrophorese-Anlage	Bio-Rad Biofocus 3000, Bio-Rad, Hercules CA, USA
Massenspektrometer	Finnigan MAT 95 und Finnigan MAT SSQ 710A (EI-MS), ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 (ESI-MS), Varian, Darmstadt
Mikroskop	CK X 41 SF, Olympus, Hamburg
NMR-Anlagen	Avance 600 Kryo, Avance 400, Avance 300, Software Topspin 2.1, Bruker, Ettlingen
Orbitalschüttler	Lab-Shaker Modell Kühner, B.Braun, Melsungen SM 25, Bühler, Tübingen, D
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Elektrode SenTix Mic, WTW, Weilheim
Plattenlesegerät	SpectraFluor Plus, Software Xfluor4 V 4.40, Tecan, Crailsheim
Polarimeter	Unipol L1000, Schmidt+Haensch, Berlin
Reinstwasseranlage	Milli-Q UF Plus, Millipore, Schwalbach Aufbereitungsmodul 193-0003, MembraPure, Bodenheim
Rotationsverdampfer	Laborota 4003 control, MR 3004 safety S, Rotavac vario control, Heidolph, Schwabach
Schmelzpunktmessgerät	Melting Point B-545, Büchi, Essen
Sicherheitswerkbänke	danLAF VFR 906, Claus Damm, Fredensborg, DK CBH 1800, Faster, Cornaredo, I Medicin AB, Assab, Stockholm, S
Trockenschrank	771 364, Memmert, Schwabach
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer, Software Cary WinUV, Varian, Darmstadt UV mini-1240 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Duisburg
Voltohmometer	Evohm ² mit Endohm-12 Ringelektrode und Calicell-12, WPI
Waagen	R 160 P, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	WB 22, Memmert, Schwabach
Zählkammer	Neubauer improved, Brand, Wertheim
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech, Osterode, D

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phytochemische Untersuchungen

3.1.1 Masseverteilung der Fraktionen

Die Ausbeute der Flüssig-Flüssig-Verteilung (siehe 2.2.1.1, S. 18) betrug bei Einsatz von 10 g STW 33-I (inkl. Hilfsstoffe) durchschnittlich: 1,3 g (EA), 2,5 g (BUT), 3,0 g (EtOH) und 0,5 g (H₂O). Die Hexan-Phase lieferte weniger als 50 mg Ausbeute und wurde aufgrund der geringen Substanzmenge nicht weiter berücksichtigt. Die Verteilung wurde fünfach durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass durchschnittlich 79,8% der Masse des Ausgangsmaterials nach Entfernung der Hilfsstoffe zur Flüssig-Füssig-Verteilung herangezogen werden konnten, betrugen die prozentualen Ausbeuten der Aufarbeitung: 16,4% (EA), 31,8% (BUT), 37,5% (EtOH) und 6,5% (H₂O).

3.1.2 Aufarbeitung der Ethylacetatfraktion und Isolierung

6,3 g der Ethylacetatfraktion wurden in zwei Portionen einer Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 unterworfen (Methode Sx; siehe auch Fraktionierungsschema Abb. 3.1, S. 45). Es wurden 1,74 g EA 1 (~ 0-800 ml), 0,15 g EA 2 (~ 800-850 ml), 2,29 g EA 3 (~ 850-1000 ml), 0,70 g EA 4 (~ 1000-1100 ml), 0,47 g EA 5 (~ 1100-1300 ml) und 0,50 g EA 6 (~ 1300-1800 ml) erhalten.

1,5 g der Fraktion EA 1 wurden per Flash-Chromatographie (Methode F1) weiter aufgetrennt. Aus Unterfraktion EA 1.5 ($R_t \sim 37-42$ min, 0,16 g) wurden mittels semi-präparativer HPLC (H1) 17 mg Isograndidentatin A ($R_t \sim 11$ min) und 3 mg 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin ($R_t \sim 13.5$ min) isoliert.

Aufgrund der geringen Substanzmenge wurden aus 0,14 g der Fraktion EA 2 15 mg Trichocarposid ($R_t \sim 9$ min) sowie 17 mg Populosid B ($R_t \sim 10,5$ min) direkt durch semi-präparative HPLC gewonnen (H2).

1,5 g der Fraktion EA 3 wurden mittels Flash-Chromatographie aufgetrennt (F2). Aus Unterfraktion EA 3.1 ($R_t \sim 0-20$ min, 0,11 g) konnten mittels semi-präparativer HPLC (H3) 13 mg Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid isoliert werden ($R_t \sim 10$ min). Bei Lagerung der Reagenzgläser der Fraktion EA 3.3 ($R_t \sim 40-52$ min, 0,39 g) im TFA-haltigen Fließmittel über Nacht im Kühlschrank präzipitierten 430 mg Naringenin-5-O- β -D-glucosid und 37 mg Naringenin-7-O- β -D-glucosid als weiße Nadeln bzw. weiße Kristalle in unterschiedlichen Reagenzgläsern. Die Niederschläge wurden abfiltriert und mit kühlem (8°C) Methanol mehrmals gewaschen.

Fraktion EA 4 wurde auf einer Kieselgelsäule weiter aufgetrennt (S1). Unterfraktion EA 4.1 (Fließmittel 100% Ethylacetat) bestand aus Catechol (24 mg). Aus Unterfraktion EA 4.2 (Fließmittelgradient 95/5 → 50/50, 0,04 g) wurden nach weiterer Auftrennung per semi-präparativer HPLC 11 mg der Fraktion EA 4.2.1 (*H4*, $R_t \sim 7$ min) gewonnen, aus welcher durch erneute semi-präparative HPLC (*H5*) 3 mg *trans-p-Cumarsäure* isoliert werden konnten ($R_t \sim 22$ min). Aus Unterfraktion EA 4.4 (Fließmittelgradient 30/70 → 20/80, 0,07 g) wurden durch semi-präparative HPLC (*H6*) reines (2*R*)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid ($R_t \sim 20$ min, 3 mg), (2*S*)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid ($R_t \sim 22$ min, 10 mg), sowie die Fraktion EA 4.4.2 ($R_t \sim 18$ min, 14 mg) gewonnen. EA 4.4.2 wurde mit derselben Methode (*H6*) erneut aufgereinigt und 8 mg Eriodictyol-7-O- β -D-glucosid isoliert.

420 mg der Fraktion EA 5 wurden mittels RP-18-Flash-Chromatographie (*F3*) in acht weitere Unterfraktionen getrennt. Aus EA 5.4 ($R_t \sim 35-50$ min, 0,17 g) wurden mittels SiO₂-Flash-Chromatographie erneut vier Fraktionen gebildet, wobei aus Fraktion EA 5.4.3 ($R_t \sim 41-54$ min) durch semi-präparative HPLC (*H7*) 20 mg Isosalipurposid ($R_t \sim 8$ min) isoliert wurden. Fraktion EA 5.6 ($R_t \sim 80-87$ min) wurde ebenfalls durch semi-präparative HPLC weiter aufgetrennt (*H8*, $R_t \sim 13-15$ min), durch erneute Chromatographie (*H9*) konnten aus 0,07 g der Fraktion EA 5.6.6 26 mg 6"-*trans-p-Cumaroyl-(2R)-naringenin-5-O-β-D-glucosid* ($R_t \sim 7$ min) isoliert werden. Beim Lagern über Nacht im Kühlschrank präzipitierten aus Fraktion EA 5.7 ($R_t \sim 80-95$ min) 50 mg 6"-*trans-p-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O-β-D-glucosid* (50 mg), dieses wurde mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt (*H10*, $R_t \sim 11$ min, 38 mg).

Auch Fraktion EA 6 wurde der RP-18 Flash-Chromatographie unterworfen und zu neun Unterfraktionen vereinigt. Fraktion EA 6.5 bestand aus reinem Naringenin ($R_t \sim 48-58$ min, 120 mg), Fraktion EA 6.9 aus reinem Phelligrin A ($R_t \sim 82-89$ min, 4 mg). Durch semi-präparative RP-18-HPLC wurde Fraktion EA 6.2 ($R_t \sim 22-29$ min, 0,05 g) weiter aufgetrennt (*H11*) und ergab 11 mg EA 6.2.1. ($R_t \sim 13$ min). Diese wurde erneut aufgereinigt (*H12*), so dass 4 mg Taxifolin ($R_t \sim 11$ min) isoliert werden konnten. Aus EA 6.3 ($R_t \sim 29-35$ min, 0,04 g) wurden mittels semi-präparativer HPLC (*H13*) 15 mg Dihydrokämpferol ($R_t \sim 11$ min) isoliert. 21 mg Eriodictyol konnten aus Fraktion EA 6.4 ($R_t \sim 36-48$ min, 0,05 g) durch semi-präparative RP-18-HPLC (*H14*) gewonnen werden. Fraktion EA 6.7 ($R_t \sim 70-75$ min, 0,03 g) wurde ebenfalls durch semi-präparative HPLC (*H15*) aufgereinigt und 11 mg 6"-*O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid* ($R_t \sim 12$ min) isoliert.

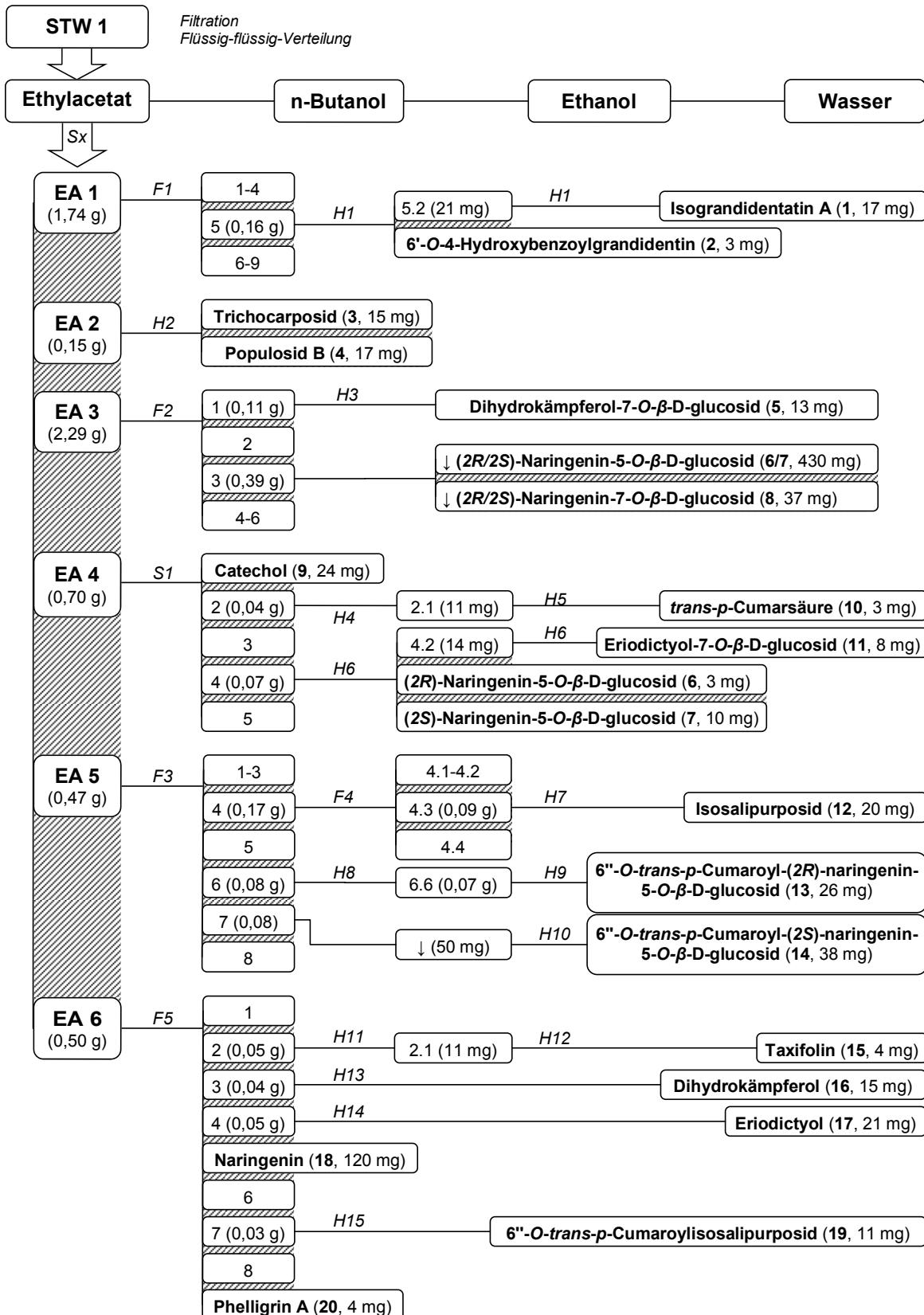


Abb. 3.1 Fraktionierungsschema: Auf trennung des Trockenextraktes STW 33-I und Isolierung von Einzelsubstanzen. Die angewendeten Methoden sind im Methodenteil beschrieben.

3.1.3 Strukturaufklärung

3.1.3.1 Übersicht der isolierten Substanzen

	1 R ₁ = <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl; R ₂ = H	Isograndidentatin A
	2 R ₁ =H, R ₂ = 4-Hydroxybenzoyl	6'-O-4-Hydroxybenzoyl-grandidentin
	3 R ₁ = <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl; R ₂ = H	Trichocarposid
	4 R ₁ = H; R ₂ = <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl	Populosid B
	8 R ₁ = R ₂ = H; R ₃ = beta-D-glc	Naringenin-7-O-beta-D-glucosid
	11 R ₁ = OH; R ₂ = H; R ₃ = beta-D-glc	Eriodictyol-7-O-beta-D-glucosid
	18 R ₁ = R ₂ = R ₃ = H	Naringenin
	17 R ₁ = OH; R ₂ = R ₃ = H;	Eriodictyol
	20 R ₁ = R ₃ = H; R ₂ =	Phelligrin A
	15 R ₁ = OH; R ₂ = H	Taxifolin
	16 R ₁ = H; R ₂ = H	Dihydrokaempferol
	5 R ₁ = H; R ₂ = beta-D-glc	Dihydrokaempferol-7-O-beta-D-glucosid
	6/7 R= H	(2R/2S)-Naringenin-5-O-beta-D-glucosid
	13/14 R= <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl	6"-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl-(2R/2S)-naringenin-5-O-beta-D-glucosid
	12 R= H	Isosalipurposid
	19 R= <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaryl	6"-O- <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumaroyl-isosalipurposid
	10 <i>trans</i> - <i>p</i> -Cumarsäure	
	9 Catechol	

Abb. 3.2 Strukturformeln der isolierten Einzelsubstanzen 1-20.

Die isolierten Substanzen (Abb. 3.2) wurden mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) analysiert (Abb. 3.3). Die Retentionsfaktoren (R_f), und die Farbentwicklung nach Derivatisierung mit Naturstoffreagenz A/Macrogol bei 366 nm bzw. mit Anisaldehyd bei Tageslicht sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Als Referenzen wurden Salicin, sowie der Gesamtextrakt bzw. die Ethylacetatfraktion mitgeführt. Alle Substanzen wurden in Methanol bzw. Methanol-Wasser-Gemischen gelöst (Konzentration 1 mg/ml, Auftragevolumen 10-25 µl). Alle underivatisierten Substanzen verursachten eine Fluoreszenzlösung bei 254 nm. Auffällig war, dass die Substanzen mit *cis*-1,2-Cyclohexandiolrest (**1**, **2**) nach Derivatisierung mit Anisaldehyd bei 366 nm eine intensiv rote Fluoreszenz hervorriefen.

Tab. 3.1 R_f -Werte und Farbentwicklung der Substanzen nach Derivatisierung (*Methode D3*).

Substanz	R_f	366 nm -	366 nm (NP/PEG)	Tageslicht (Anisaldehyd)
1	0,51	blau	dunkelblau	rosa
2	0,47	blau	dunkelblau	rosa
3	0,44	blau	dunkelblau	grau
4	0,43	blau	dunkelblau	grau
5	0,31	hell	grün	braun
6/7	ca. 0,28	blau	gelb	braun
8	0,39	hell	gelb	braun
9	0,78	dunkel	blau	rosa
10	0,75	blau	blau	rosa
11	0,34	hellorange	rot	braun
12	0,41	schwarz	orange	braun
13/14	ca. 0,43	blau	gelb	braun
15	0,67	hell	gelb	braun
16	0,71	hell	grün	orange
17	0,72	hellorange	rot	orange
18	0,77	hell	gelb	orange
19	0,53	schwarz	orange	braun
20	0,77	grau	schwarz	orange
Salicin	0,29	-	-	braun

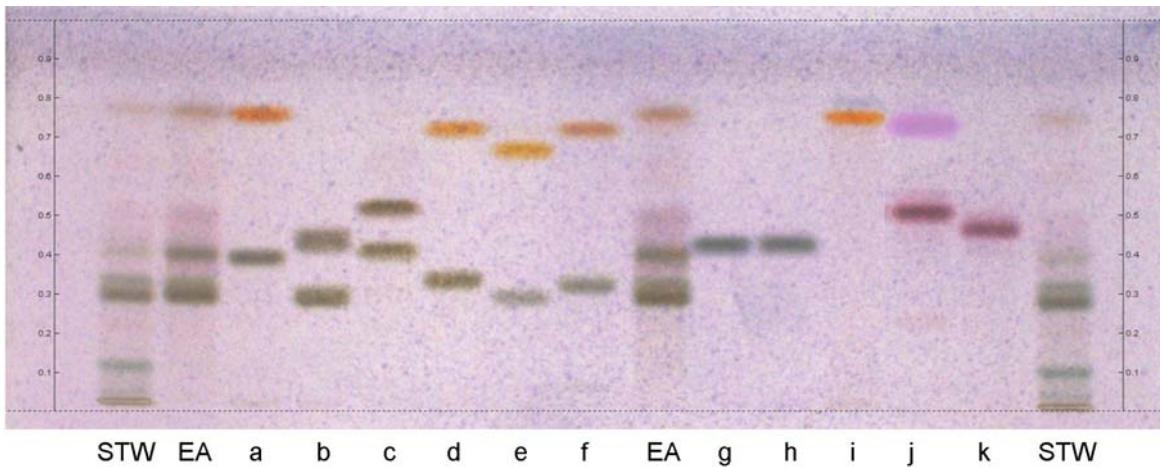


Abb. 3.3 Übersichts-HPTLC nach Methode D3, Detektion nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz bei Tageslicht. STW: Gesamtextrakt; EA: EtOAc-Fraktion; a: 8 (oben), 18 (unten); b: 13/14 (oben), 6/7 (unten); c: 19 (oben), 12 (unten); d: 17 (oben), 11 (unten); e: 15 (oben), Salicin (unten); f: 16 (oben), 5 (unten); g: 4; h: 3; i: 20, j: 10 (oben), 2 (unten); k: 2.

3.1.3.2 Flavanonglucoside

Flavanon-5-O-glucoside

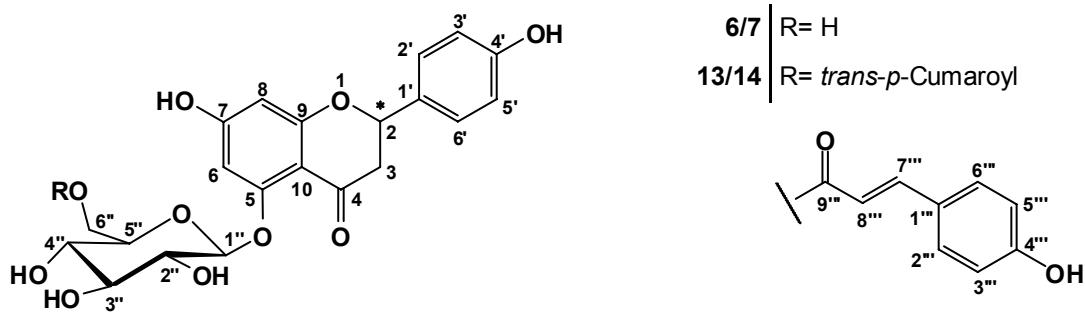


Abb. 3.4 Strukturformeln von (2R/2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (6/7) und 6''-O-*trans*-p-Cumaroyl-(2R/2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (13/14).

(2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (7) und (2R)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (6)

Aus Fraktion EA 4.4 wurden beide Diastereomere als Einzelsubstanzen isoliert, sowie aus Fraktion EA 3.3 ein Gemisch der beiden. Es handelt sich um feine weiße Nadeln mit einem Molekulargewicht von 434 g/mol (LRESI-MS (pos.) m/z 435 [$M+H^+$]), die UV-Absorptionsmaxima bei 225 und 282 nm vorweisen (Methanol).

Zunächst wurden die NMR-Daten von Substanz 7 betrachtet. Im Protonenspektrum waren einerseits die typischen Signale eines Flavanongrundgerüstes, andererseits die

eines Hexoserestes zu erkennen. Typisch für einen *para*-substituierten B-Ring eines Flavonoids zeigte sich ein AA'BB'-Spinsystem, bei dem die Signale von zwei gegenüberliegenden Protonen im tiefen Feld jeweils zusammenfallen und als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $^3J = 8,6$ Hz auftraten. Zwei weitere Doublets im tiefen Feld ($\delta = 6,10$ bzw. $\delta = 6,45$) mit einer Kopplungskonstante $^4J = 2,2$ Hz sprachen für zwei *meta*-ständige Protonen des A-Rings. Zusammen mit 3 Doublets von Doublets im hohen Feld, die dem Proton der Methingruppe an C-2 ($\delta = 5,31$, $J = 13,2, 2,9$ Hz) und denen der Methylengruppe an C-3 ($\delta = 2,98$, $J = 17,3, 13,1$ Hz bzw. $\delta = 2,69$, $J = 17,3, 3,0$) zugeordnet wurden, als auch die starke Tieffeldverschiebung des quartären Carbonyl-Kohlenstoffsignals C-4 im ^{13}C -Spektrum ($\delta = 193,0$) deuteten auf ein Naringenin-Grundgerüst hin. Dies wurde mit Hilfe von 2D-Experimenten und Vergleich mit Literaturdaten [Ibrahim et al. 2007] bestätigt.

Mithilfe des Protonenspektrums konnte weiterhin zunächst ein Hexopyranoserest zugeordnet werden. Typisch hierfür waren 7 Protonensignale, von denen ein Dublett eine Tieffeldverschiebung erfahren hatte (Proton des anomeren C-Atoms C-1", $\delta = 4,97$), zwei Protonensignale (H-6"^a und H-6"^b), die als Doublets von Doublets u. a. geminale Kopplungskonstanten aufwiesen ($^2J = 12,1$ Hz) und ein Protonensignal, welches durch die Nachbarschaft der geminalen Protonen an C-6", sowie die des Protons an C-4" in ein Dublett vom Dublett vom Dublett aufgespalten wurde. Zudem wiesen die Protonen H-2"-5" große vicinale Kopplungskonstante auf (ca. 8-9 Hz), was für eine axial/axiale Stellung der Protonen sprach [Hesse et al. 2005] und die Zuordnung einer Glucose erlaubte. Dies belegte auch der Vergleich der ^{13}C -Signale mit der Literatur [Markham et al. 1978a]. Die $^3J_{\alpha/\alpha}$ Kopplung von H-1" zu H-2" von 7,5 Hz ließ den Schluss zu, dass es sich entweder um ein β -D-Glucosid oder ein α -L-Glucosid handeln musste. Kapillarelektrophoretische Ermittlung der Glucosekonfiguration ergab das Vorliegen eines β -D-Glucosids. Abschließend war die Position der glucosidischen Bindung an das Naringenin-Grundgerüst zu ermitteln. Der Vergleich der ^{13}C -Signale mit den Literaturdaten von Naringenin [Markham et al. 1978a, Zhang et al. 2006b, eigene Daten] zeigte an C-5 eine Hochfeldverschiebung um ca. 3 ppm, was auf eine Substitution dieser Hydroxygruppe hinwies. Dies bestätigte ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC Experiment (siehe Abb. 3.5), in dem eine deutliche Korrelation von C-5 mit H-1" zu erkennen war, ebenso wie ein ROESY-Experiment. Hier konnte eine Korrelation von H-1" mit H-6 beobachtet werden, jedoch nicht mit H-8, was die Struktur zusätzlich bestätigte. Die Daten stehen im Einklang mit der Literatur [Ibrahim et al. 2007]. Somit konnte die Substanz **7** als Naringenin-5-O- β -D-glucosid identifiziert werden.

Die zweite Substanz dieser Fraktion (**6**) wies jedoch bei gleichen Messbedingungen ein annähernd identisches Set NMR-Daten auf (^1H : $\delta \pm 0,04$ ppm, ^{13}C : $\delta \pm 0,3$ ppm), bis auf H-3a ($\delta = 3,06$, 1H, dd, $J = 16,3, 12,5$), H-3b ($\delta = 2,64$, 1H, dd, $J = 16,3, 3,0$), H-6 ($\delta = 6,37$, 1H, d, $J = 2,2$) und C-5 ($\delta = 161,7$), C-7 ($\delta = 168,9$), C-9 ($\delta = 166,2$), C-10 ($\delta = 106,3$), C-1" ($\delta = 104,0$).

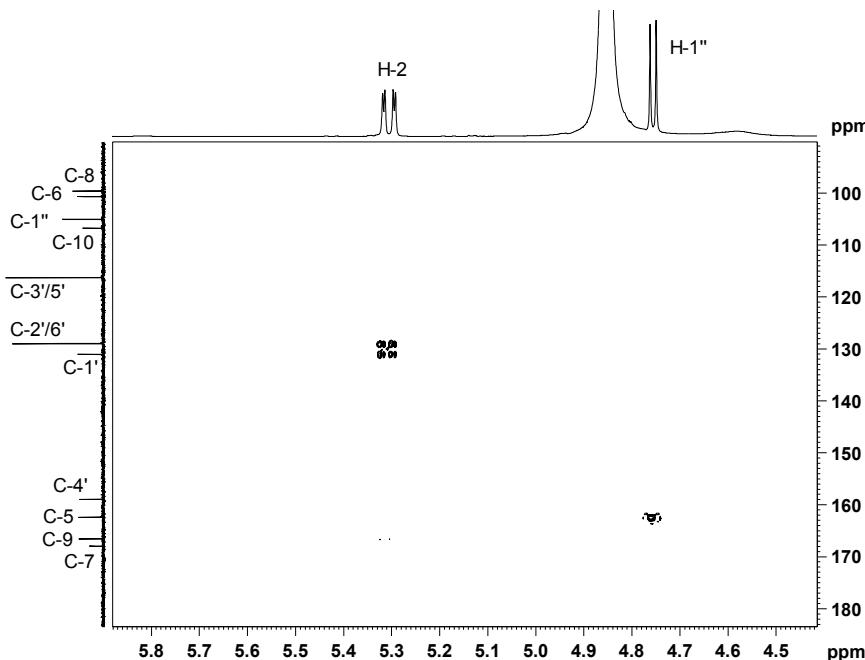


Abb. 3.5 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von (7): Identifizierung der glucosidischen Bindungsposition (H-1"/C-5); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

Da die Verbindungen per HPLC ohne Verwendung einer chirale Phase trennbar waren und sich die Kopplungskonstanten des Glucoseteils ähnlich groß gestalteten, wurden Stereoisomere des Naringeningrundgerüstes vermutet. Um dies zu untermauern, wurde ein CD-Spektrum aufgenommen (siehe Abb. 3.6) und mit Literaturdaten verglichen [Tyukavkina et al. 1989].

Das Spektrum entsprach dem der Literatur. Tyukavkina und Mitarbeiter [1989] hydrolysierten außerdem die beiden Glucoside und konnten feststellen, dass trotz HPLC-Reinheit des 2R-Glucosids, das Aglycon Naringenin nach Hydrolyse im Verhältnis 2R:2S = 2:1 vorlag. Dies spricht für die Bildung des stabileren 2S-Glucosids unter den Hydrolysebedingungen, konnte aber auch im Rahmen dieser Arbeit bei einfachem Lösen der Substanz in Methanol beobachtet werden.

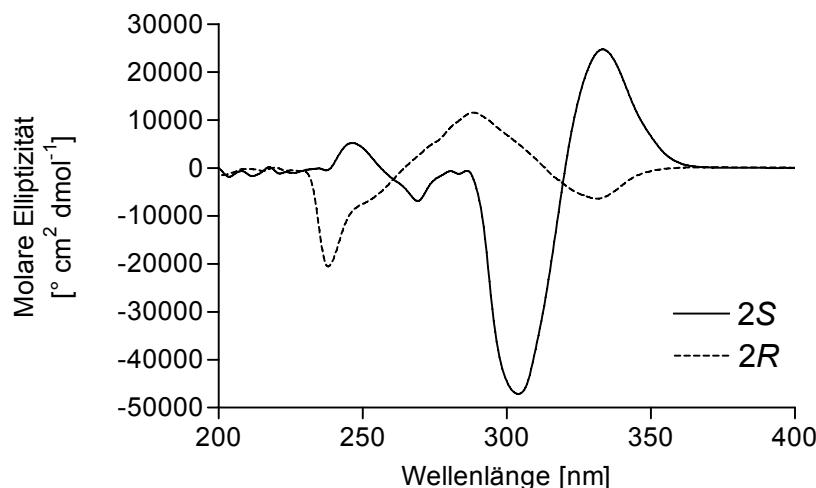


Abb. 3.6 CD-Spektrum von 2R bzw. 2S-Naringenin-5-O- β -D-glucosid, $c = 1,5 \text{ mg/ml}$ in Methanol, 20°C.

6"-O-p-trans-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (14) und
6"-O-p-trans-Cumaroyl-(2R)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (13)

Die aus Fraktion EA 5.7 isolierte weiße Substanz (**14**) besaß die UV-Absorptionsmaxima (MeOH) λ_{max} : 228, 287, 311 nm, eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = -69^\circ$ ($c = 0,001$, MeOH), und ein Molekulargewicht von 580 g/mol (LR ESI-MS (pos.) m/z 581 [$M+H]^+$).

Das Protonenspektrum von **14** ähnelte stark dem des Naringenin-5-O- β -D-glucosids (siehe Abb. 3.9), jedoch waren zusätzliche Signale erkennbar. Im tiefen Feld fielen vier zusätzliche Dubletts auf, wobei eines mit einem Protonensatz des B-Rings des Naringenins zusammenfiel. Zwei der Dubletts waren erneut typisch für ein AA'BB'-Spinsystems eines *para*-substituierten Phenolrests. Auffällig waren auch zwei weitere Dubletts mit einer 3J -Kopplungskonstante von 16,1 Hz (typisch für eine *trans*-substituierte Doppelbindung), welche im tiefen Feld relativ weit voneinander entfernt lagen (7,63 bzw. 6,37 ppm). Weiterhin war im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom bei 169,1 ppm zu finden. Dieses korrelierte im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC mit den beiden Protonen im tiefen Feld, deren zugehörige Kohlenstoffatome wiederum mit dem *p*-substituierten Phenylrest. So ließ sich ein *trans*-*p*-Cumarylrest zuordnen, was durch die Massendifferenz (146 g/mol) zu **7** bestätigt wurde. Da die H-6" Protonensignale des Glucoseteils stark ins Tieffeld verschoben waren (zusammen mit dem Signal von H-5"), konnte eine Veresterung der Cumarsäure mit der Hydroxygruppe von C-6" angenommen werden und durch ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC Experiment, in dem eine Korrelation des

Carbonylkohlenstoffs C-9" der Cumarsäure mit den Protonen des C-6" der Glucose deutlich zu erkennen ist, belegt werden (siehe Abb. 3.7).

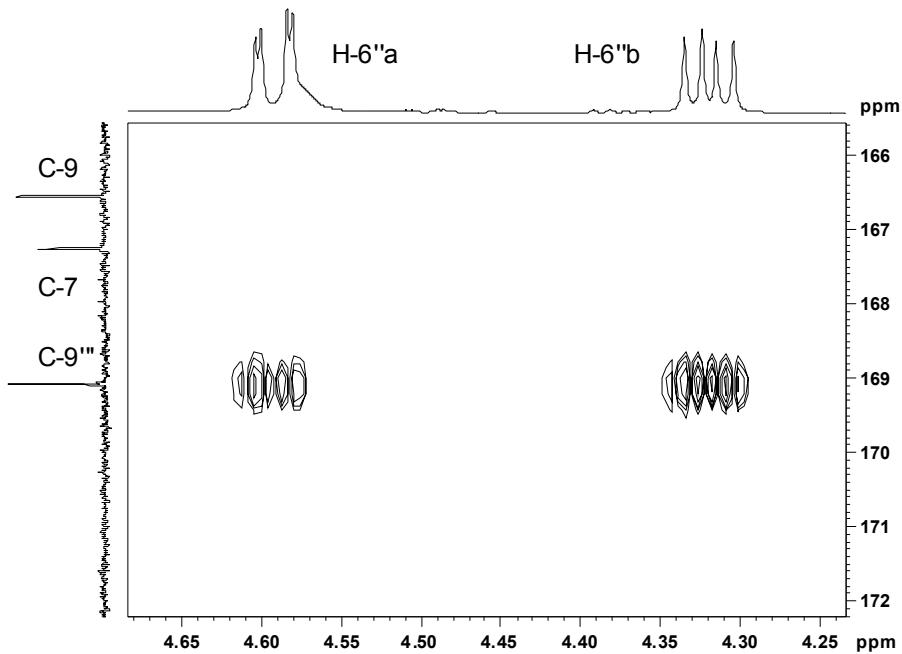


Abb. 3.7 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von (14): Identifizierung der Veresterungsposition (C-9'''/H-6a,b); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

Auch in diesem Fall wurde eine zweite Substanz isoliert (**13**), die sich problemlos über eine RP-18 Phase per HPLC von **14** trennen ließ und wiederum ein fast identisches Set an NMR Signalen lieferte (^1H : $\pm 0,05$ ppm, ^{13}C : $\delta \pm 0,3$ ppm), außer für H-6 ($\delta = 6,36$, d, $J = 2,2$ Hz), H-1'' ($\delta = 4,90$, d, $J = 7,5$ Hz), H-3a ($\delta = 3,04$, dd, $J = 12,9, 16,4$ Hz) und H-3b ($\delta = 2,61$, dd, $J = 3,0, 16,4$ Hz), C-5 ($\delta = 161,4$ ppm), C-10 ($\delta = 106,4$ ppm) und C-1'' ($\delta = 103,3$ ppm). Die weiteren Kenndaten waren identisch mit **14**, jedoch besaß die Substanz einen unterschiedlichen spezifischen Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ ($c = 0,001$, MeOH).

Hier lag erneut die Vermutung nahe, dass sich **13** und **14** in der Teilstruktur des Naringenigrundgerüstes (S- bzw. R-Isomer) unterscheiden. Bei genauerer Betrachtung der ^1H -NMR-Spektren der beiden Naringenin-5-O- β -D-glucosid-Diastereomere **7** und **6** und der vorliegenden Substanzen konnten Gemeinsamkeiten erkannt werden. Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, wies jeweils ein Epimer des Naringenin-5-O-glucosids dasselbe charakteristische Verschiebungsmuster wie eines der *trans*-*p*-Cumaryl naringenin-5-O-glucoside auf. Durch die unterschiedliche Konfiguration an C-2 fällt die chemische

Umgebung der Protonen H-3, H-6 und H-8 der Diasteromere leicht unterschiedlich aus und ermöglicht im direkten Vergleich eine einfache Zuordnung.

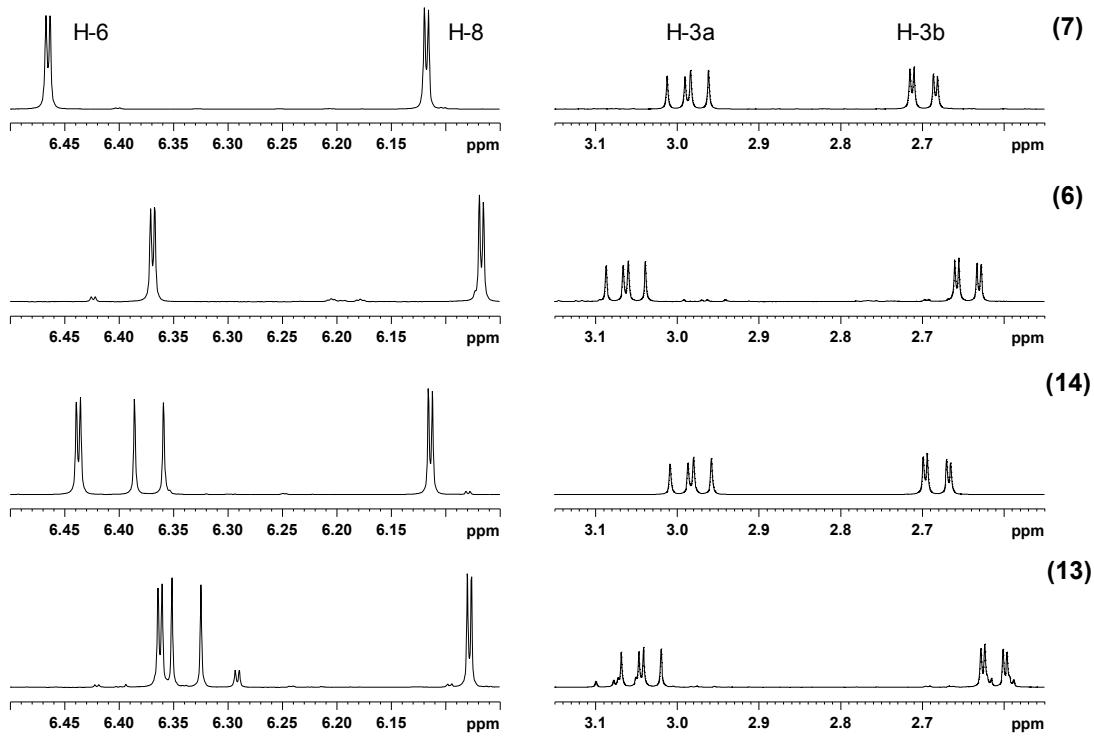


Abb. 3.8: Ausschnitte der ^1H -Spektren der Substanzen **6**, **7**, **13** und **14** im Bereich von H-6 und H-8 (links) bzw. von H-3a und H-3b (rechts); 600 MHz, CD_3OD , 298 K. Von oben nach unten: (2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (**7**), (2R)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (**6**), 6"-O-trans-p-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (**14**) und 6"-O-trans-p-Cumaroyl-(2R)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (**13**).

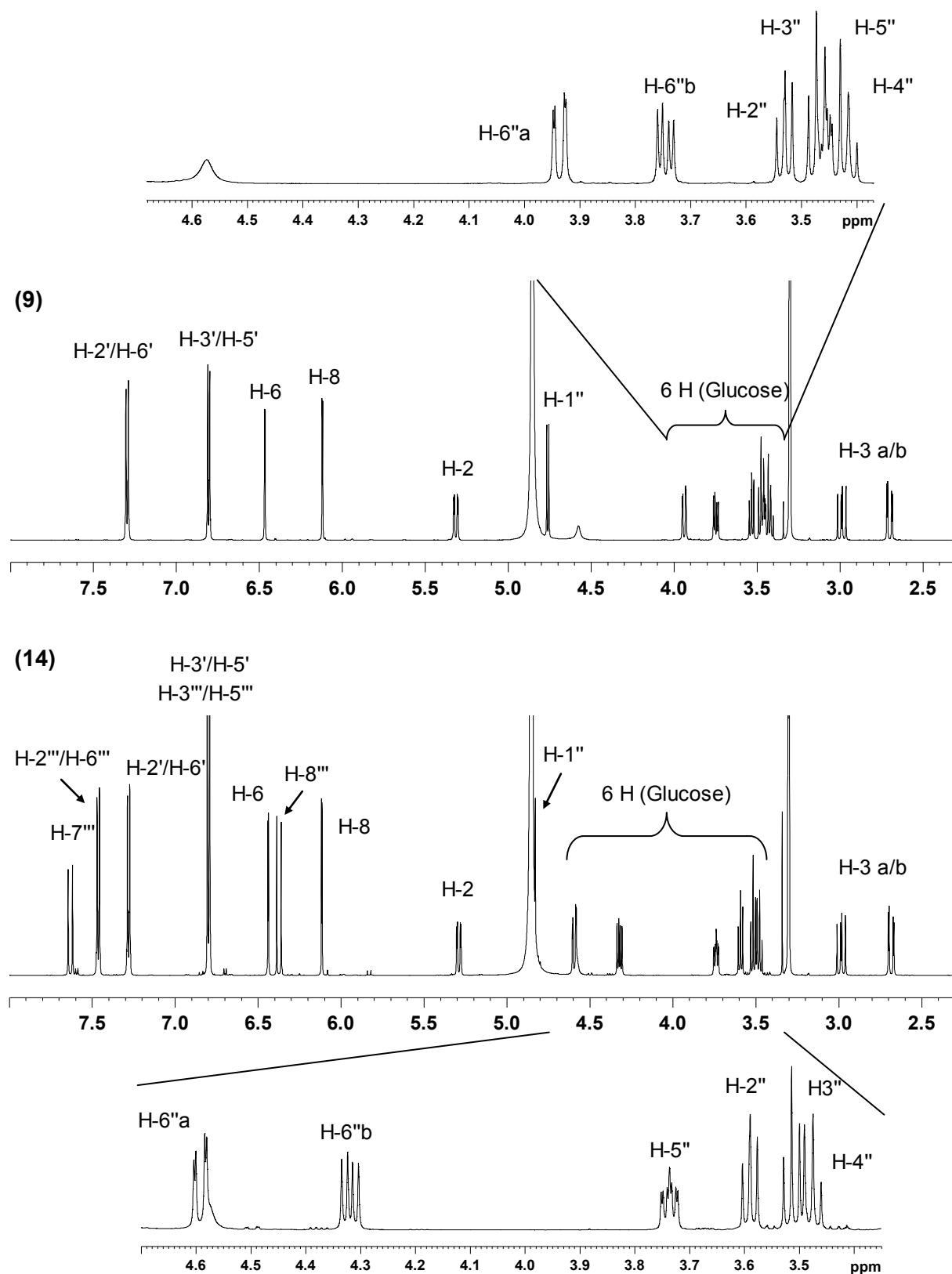


Abb. 3.9 ^1H -Spektren von Verbindung 9 (oben) und 14 (unten); 600 MHz, CD_3OD , 298 K.

Tab. 3.2: ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von (2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid (7) und 6"-O-*trans*-*p*-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid (14); 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	7		14	
	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	5,31 (1H, dd, J= 13,2, 2,9)	80,2	5,29 (1H, dd, J= 2,9, 13,2)	80,2
3a	2,98 (1H, dd, J= 17,3, 13,1)	46,3	2,98 (1H, dd, J= 17,3, 13,1)	46,3
3b	2,69 (1H, dd, J= 17,3, 3,0)		2,68 (1H, dd, J= 17,3, 3,0)	
4	-	193,0	-	193,0
5	-	162,4	-	162,1
6	6,45 (1H, d, J= 2,2)	100,7	6,43 (1H, d, J= 2,2)	100,5
7	-	168,0	-	167,3
8	6,10 (1H, d, J= 2,2)	99,6	6,11 (1H, d, J= 2,2)	99,4
9	-	166,6	-	166,5
10	-	106,8	-	107,0
1'	-	131,1	-	131,0
2'	7,30 (1H, d, J= 8,6)	129,0	7,28 (1H, d, J= 8,6)	129,0
3'	6,80 (1H, d, J= 8,6)	116,3	6,80 (1H, d, J= 8,5)	116,3
4'	-	159,0	-	159,0
5'	6,80 (1H, d, J= 8,6)	116,3	6,80 (1H, d, J= 8,5)	116,3
6'	7,30 (1H, d, J= 8,6)	129,0	7,28 (1H, d, J= 8,6)	129,0
1"	4,76 (1H, d, J= 7,5)	105,1	4,83 (1H, d, J= 7,7)	104,3
2"	3,53 (1H, dd, J= 9,2, 7,5)	74,7	3,59 (1H, dd, J= 8,6, 7,8)	74,7
3"	3,47 (1H, dd, J= 9,2, 8,4)	77,2	3,51 (1H, dd, J= 8,6, 8,6)	77,3
4"	3,42 (1H, dd, J= 9,5, 8,3)	71,2	3,48 (1H, dd, J= 9,3, 8,7)	71,7
5"	3,46 (1H, ddd, J= 9,5, 5,1, 2,0)	78,6	3,74 (1H, ddd, J= 9,3, 6,7, 2,2)	75,9
6" ^a	3,94 (1H, dd, J= 12,1, 2,0)	62,5	4,59 (1H, dd, J= 11,9, 2,3)	64,5
6" ^b	3,75 (1H, dd, J= 12,1, 5,3)		4,32 (1H, dd, J= 11,9, 6,6)	
1'''			-	127,2
2'''			7,46 (1H, d, J= 8,6)	131,3
3'''			6,80 (1H, d, J= 8,5)	116,8
4'''			-	161,3
5'''			6,80 (1H, d, J= 8,5)	-
6'''			7,46 (1H, d, J= 8,6)	-
7'''			7,63 (1H, d, J= 16,1)	146,9
8'''			6,37 (1H, d, J= 16,1)	114,9
9'''			-	169,1

Flavanon-7-O-glucoside

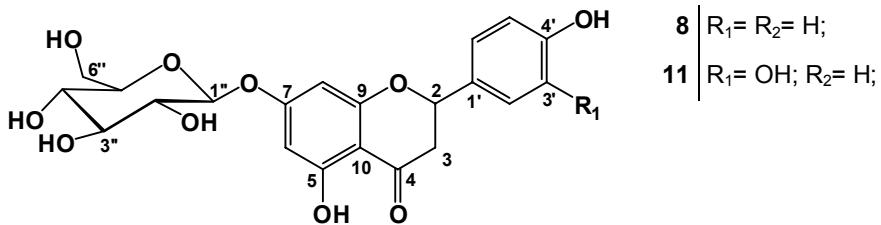


Abb. 3.10 Strukturformeln von (2R,2S)-Naringenin-7-O- β -D-glucosid (8) und (2R,2S)-Eriodictyol-7-O- β -D-glucosid (11).

Zwei weiße Substanzen konnten aus Fraktion EA 3.3 bzw. EA 4.4.2 in reiner Form gewonnen werden.

(2R,2S)-Naringenin-7-O- β -D-glucosid (8)

Bei Betrachtung des 1H -Spektrums fiel die Ähnlichkeit zum Spektrum des Naringenin-5-glucosids auf. Im Gegensatz zu diesem waren jedoch die Signale der Protonen an C-6 und C-8 weniger unterschiedlich stark verschoben ($\delta = 6,21$ bzw. $6,18$). Zusätzlich war im HSQC-Spektrum zu erkennen, dass zwei Sets von fast identischen Signalen vorlagen (maximale Abweichungen der Verschiebungen der Signale: 0,01 ppm (1H) und 0,2 ppm (^{13}C)). Ansonsten waren erneut ein Naringenigrundgerüst, sowie ein Glucoserest zu beobachten. Durch Vergleich der ^{13}C -Signalverschiebungen mit der Literatur zum Naringenin-Aglycon [Markham and Ternai 1976, Zhang et al. 2006b], sowie den eigenen Daten (siehe Naringenin, 3.1.3.5, S.61) wurde eine Glucosidierung an Position 7 vermutet, was durch ein HMBC Experiment verifiziert werden konnte. Hier war eine Korrelation des Kohlenstoffkerns in Position 7 mit beiden Protonen (H-6 und H-8) ersichtlich. Somit konnte die Struktur als Naringenin-7-O- β -D-glucosid identifiziert werden. Die unterschiedlichen Sets von Signalen ließen sich auf zwei unterschiedliche Konfigurationen am C-2 des Naringenins zurückführen. Die Identität der Substanz wurde durch Vergleich mit Referenzsubstanz (DC, HPLC, UV/VIS) zusätzlich verifiziert. Auf weitergehende Trennungsversuche der Diastereomere wurde verzichtet.

(2R,2S)-Eriodictyol-7-O- β -D-glucosid (11)

Im den NMR Spektren waren auch hier zwei Sets von Signalen vorzufinden (max. Abweichung: 0,01 ppm (1H) und 0,1 ppm (^{13}C)). Die Zuordnung der 1H - und ^{13}C -Signale erfolgte analog zum Naringenin-7-O-glucosid. Ein Unterschied befand sich jedoch im

B-Ring. Hier war kein AA'BB'-Spinsystem vorzufinden, sondern ein ABC-Spinsystem, das charakteristischerweise aus einem Singulett und zwei Dubletts ($^3J = 8,1$ Hz), welche jeweils ein Proton darstellen, bestand. Mithilfe der molekularen Masse (LR ESI-MS (pos.) m/z 451 [$M+H]^+$) ließ sich das Substanzgemisch als (2R,2S)-Eriodictyol-7-O-glucosid identifizieren. Die Identität der Substanz wurde durch Vergleich mit Referenzsubstanz (DC, HPLC, UV/VIS) zusätzlich verifiziert. Die Daten stimmen ebenfalls mit der Literatur überein [Pan et al. 2008].

Tab. 3.3: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von (2R,2S)-Naringenin-7-O- β -D-glucosid (8) und (2R,2S)-Eriodictyol-7-O- β -D-glucosid (11); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

#	8		11	
	^1H δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	5,38 (1H, dd, $J= 12,9, 3,0$)	80,7	5,32 (1H, dd, $J= 12,7, 3,3$)	80,7
3a	3,17 (1H, dd, $J= 17,2, 12,8$)	44,2	3,12 (1H, dd, $J= 17,2, 12,7$)	44,2
3b	2,75 (1H, dd, $J= 17,2, 3,0$)		2,75 (1H, dd, $J= 17,2, 3,1$)	
4	-	198,6	-	198,5
5	-	165,0	-	165,0
6	6,21 (1H, d, $J= 2,2$)	96,9	6,18 (1H, d, $J= 2,2$)	98,0
7	-	167,0	-	167,0
8	6,18 (1H, d, $J= 2,2$)	98,0	6,20 (1H, d, $J= 2,2$)	96,9
9	-	164,6	-	164,6
10	-	104,9	-	104,9
1'	-	130,9	-	131,5
2'	7,31 (1H, d, $J= 8,6$)	129,1	6,91 (1H, s)	114,8
3'	6,81 (1H, d, $J= 8,6$)	116,3	-	147,0
4'	-	159,1	-	146,5
5'	6,81 (1H, d, $J= 8,6$)	116,3	6,79 (1H, d, $J= 8,2$)	116,2
6'	7,31 (1H, d, $J= 8,6$)	129,1	6,77 (1H, d, $J= 8,1$)	119,3
1"	4,97 (1H, d, $J= 7,0$)	101,2	4,97 (1H, d, $J= 7,0$)	101,2
2"	3,35-3,47 (1H, m*)	74,6	3,35-3,47 (1H, m*)	74,6
3"	3,35-3,47 (1H, m*)	78,3	3,35-3,47 (1H, m*)	78,3
4"	3,35-3,47 (1H, m*)	71,1	3,35-3,47 (1H, m*)	71,1
5"	3,35-3,47 (1H, m*)	77,8	3,35-3,47 (1H, m*)	77,8
6" ^a	3,87 (1H, dd, $J= 11,5, 5,2$)	62,3	3,87 (1H, dd, $J= 12,1, 2,2$)	62,3
6" ^b	3,68 (1H, dd, $J= 12,1, 5,2$)		3,68 (1H, dd, $J= 12,1, 5,1$)	

* wegen Signalüberlagerungen nicht erkennbar.

3.1.3.3 Flavanonolglucoside

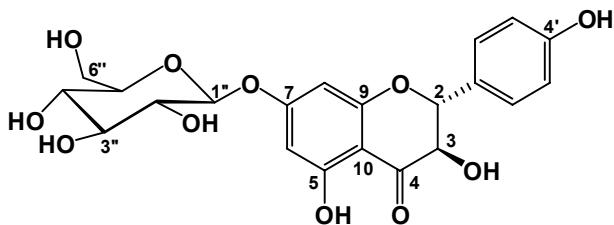


Abb. 3.11 Strukturformel von Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid (5).

Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid (5)

Eine Verbindung mit der Molekularmasse 450 g/mol (LR ESI-MS (pos.) $[M+H]^+$ = 451), und einer spezifischen Drehung ($[\alpha]_D^{20}$) von - 36° (c = 0,0005, MeOH) konnte aus Fraktion EA 3.1 isoliert werden.

Wie bei den anderen 7-O-Glucosiden, wurden im Protonenspektrum zwei Sets von Signalen beobachtet, hier war jedoch eines deutlich prominenter und wurde zur Auswertung herangezogen. Die 1- und 2D-Spektren waren mit denen des Naringenin-7-O- β -D-glucosids vergleichbar. Unterschiede machten sich im Protonenspektrum jedoch im hohen Feld bemerkbar, da die typischen Signale der geminalen Protonen an C-3 fehlten. Stattdessen war ein einzelnes Dublett bei δ = 4,59 zu erkennen. Die starke Tieffeldverschiebung des zugehörigen Kohlenstoffsignals um 30,4 ppm im Gegensatz zu Naringenin-7-O-glucosid wies auf eine Substitution mit einem entschirmenden Substituenten hin. Aufgrund der unterschiedlichen molaren Masse zu Naringenin-7-O-glucosid (LR ESI-MS (pos.) m/z 451 $[M+H]^+$) wurde eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-3 zugeordnet. Da die Kopplungskonstante zwischen H-2 und H-3 mit $J_{2/3} = 11,7$ in diesem Fall eine typische diaxiale Kopplung darstellte [Herz et al. 1972], konnte eine diäquatoriale Stellung des Phenylrestes bzw. der Hydroxygruppe bestätigt werden und das Diastereomerengemisch wurde als Dihydrokämpferol-7-O-glucosid [Foo und Karchesy 1989] identifiziert.

Tab. 3.4: ¹H-und ¹³C-NMR-Daten von Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid (**5**); 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	5	
	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	5,02 (1H, d, $J= 11,7$)	85,1
3	4,59 (1H, d, $J= 11,7$)	74,6
4	-	199,4
5	-	164,8
6	6,22 (1H, d, $J= 2,2$)	97,0
7	-	167,3
8	6,2 (1H, d, $J= 2,2$)	98,3
9	-	164,3
10	-	103,5
1'	-	129,1
2'	7,35 (1H, d, $J= 8,6$)	130,4
3'	6,83 (1H, d, $J= 8,6$)	116,1
4'	-	159,3
5'	6,83 (1H, d, $J= 8,6$)	116,1
6'	7,35 (1H, d, $J= 8,6$)	130,4
1"	4,96 (1H, d, $J= 7,3$)	101,3
2"	3,36-3,47 (1H, m*)	74,6
3"	3,36-3,47 (1H, m*)	78,3
4"	3,36-3,47 (1H, m*)	71,1
5"	3,36-3,47 (1H, m*)	77,8
6" ^a	3,86 (1H, dd, $J= 12,2, 2,0$)	62,3
6" ^b	3,67 (1H, dd, $J= 12,2, 5,5$)	

* wegen Signalüberlagerungen nicht erkennbar.

3.1.3.4 Chalkonglucoside

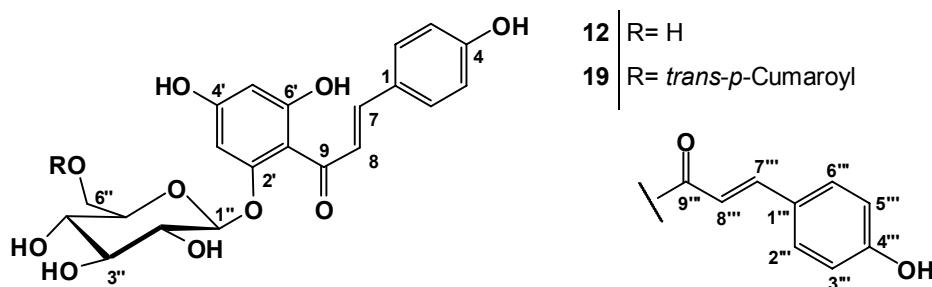


Abb. 3.12 Strukturformeln von Isosalipurposid (**12**) und 6"-O-*trans*-*p*-Cumaroyl-isosalipurposid (**19**).

Aus den Fraktionen EA 5.4.3 bzw. EA 6.7 konnten zwei intensiv gelbe, pulverförmige Substanzen mit einer spezifischen Drehung ($[\alpha]_D^{20}$) von -56° ($c= 0,0005$, MeOH) bzw. $+4^\circ$ ($c= 0,0005$, MeOH) isoliert werden.

Isosalipurposid (12)

Im Protonenspektrum (Abb. 3.13) von **12** war das typische Signalmuster eines para-substituierten Aromaten im tiefen Feld ($\delta = 7,64$ bzw. $6,86$) und das eines Glucosestrukturelements zu erkennen ($\delta = 3,47$ - $5,17$). Im Gegensatz zu den Naringenin-glucosiden, fehlten jedoch die Signale von Methin bzw. Methylengruppen. Stattdessen fanden sich zwei Doublets im Tieffeld ($\delta = 8,05$ bzw. $7,70$), die eine Kopplungskonstante von $15,5$ Hz aufwiesen. Durch ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experiment konnten sowohl Korrelationen zum Arylrest festgestellt werden, als auch eine Korrelation der beiden Protonen zum Carbonylkohlenstoffkern ($\delta = 194,5$). Durch die, den Naringeninglucosiden identische molare Masse (LR ESI-MS (pos.) m/z 435 [$\text{M}+\text{H}^+$]) wurde ein Naringeninchalcon vermutet. Zusammen mit dem charakteristischen UV-Maximum bei 368 nm (Ethanol) sowie im Vergleich mit den Literaturdaten [Zapesochnaya et al. 2002] wurde die Substanz als Naringeninchalcon- $2'$ -O- β -D-glucosid (Isosalipurposid, **12**) identifiziert.

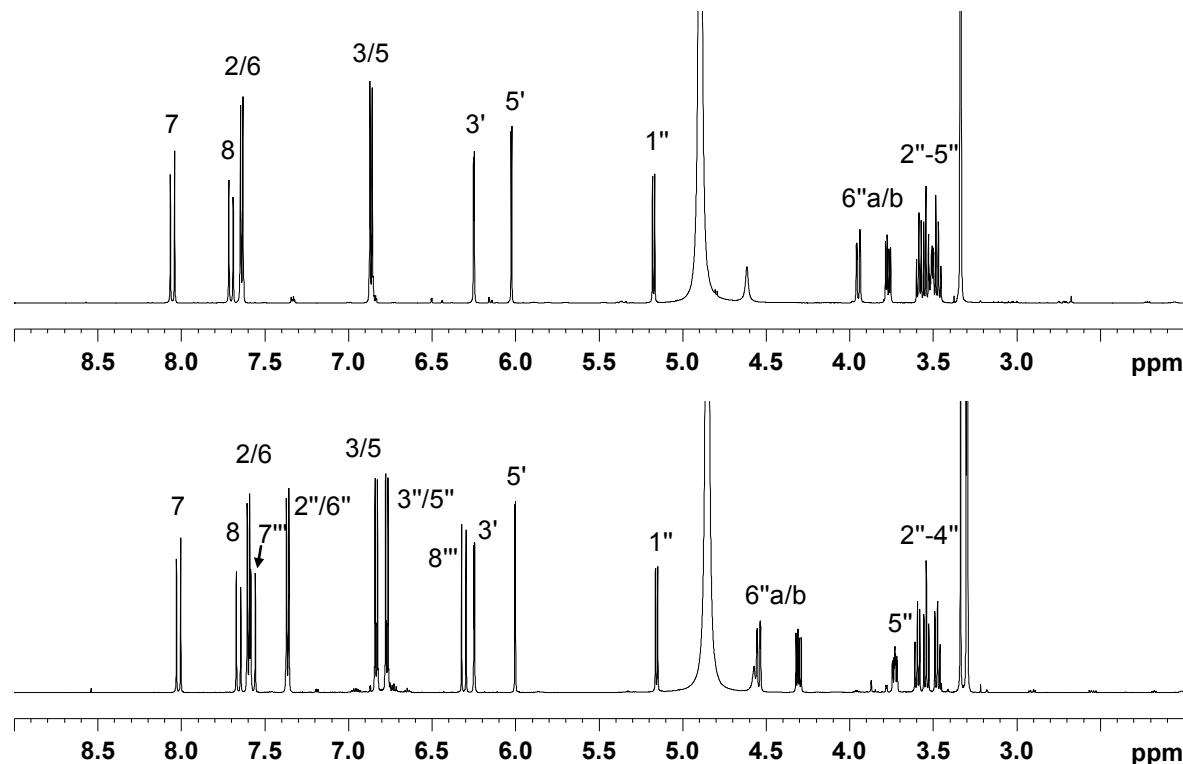


Abb. 3.13: ^1H -Spektrum von Verbindung **12** (oben) und **19** (unten); 600 MHz, CD_3OD , 298 K.

Tab. 3.5: ^1H -und ^{13}C -NMR-Daten von Isosalipurposid (12) und 6"-*trans-p-Cumaroyl-isosalipurposid* (19); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

#	12		19	
	^1H δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
1	-	128,5	-	128,5
2	7,64 (1H, d, J= 8,6)	131,8	7,60 (1H, d, J= 8,6)	131,8
3	6,86 (1H, d, J= 8,6)	116,9	6,83 (1H, d, J= 8,6)	116,9
4	-	161,1	-	161,1
5	6,86 (1H, d, J= 8,6)	116,9	6,83 (1H, d, J= 8,6)	116,9
6	7,64 (1H, d, J= 8,6)	131,8	7,60 (1H, d, J= 8,6)	131,8
7	8,05 (1H, d, J= 15,5)	125,9	8,02 (1H, d, J= 15,4)	125,9
8	7,70 (1H, d, J= 15,5)	144,1	7,65 (1H, d, J= 15,4)	144,1
9	-	194,5	-	194,4
1'	-	107,5	-	107,7
2'	-	161,8	-	161,8
3'	6,25 (1H, d, J= 2,0)	95,7	6,24 (1H, d, J= 2,2)	96,5
4'	-	166,0	-	166,1
5'	6,02 (1H, d, J= 2,1)	98,4	6,00 (1H, d, J= 2,2)	98,6
6'	-	167,8	-	167,8
1"	5,17 (1H, d, J= 7,7)	101,9	5,16 (1H, d, J= 7,7)	102,2
2"	3,59 (1H, dd, J= 9,1, 7,6)	75,0	3,59 (1H, dd, J= 8,9, 7,8)	75,1
3"	3,54 (1H, dd, J= 9,1, 8,5)	78,5	3,54 (1H, t, J= 8,9)	78,4
4"	3,47 (1H, dd, J= 9,7, 8,5)	71,1	3,48 (1H, dd, J= 9,5, 8,9)	71,5
5"	3,51 (1H, ddd, J= 9,6, 5,4, 2,1)	78,5	3,73 (1H, ddd, J= 9,6, 6,7, 2,3)	75,9
6" ^a	3,95 (1H, dd, J= 12,2, 2,2)	62,4	4,54 (1H, dd, J= 11,9, 2,2)	64,4
6" ^b	3,76 (1H, dd, J= 12,2, 5,4)		4,31 (1H, dd, J= 11,9, 6,6)	
1" ^c			-	127,2
2" ^c			7,36 (1H, d, J= 8,6)	131,3
3" ^c			6,77 (1H, d, J= 8,6)	116,8
4" ^c			-	161,2
5" ^c			6,77 (1H, d, J= 8,6)	116,8
6" ^c			7,36 (1H, d, J= 8,6)	131,3
7" ^c			7,57 (1H, d, J= 15,9)	146,9
8" ^c			6,31 (1H, d, J= 15,9)	114,9
9" ^c			-	169,1

6"-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid (19)

Zudem wurde aus Fraktion EA 6.7 eine Substanz mit teilweise identischem Protonen- bzw. ^{13}C -Spektrum isoliert (**19**). Auch hier fanden sich zusätzlich typische ^1H -Signale eines *trans-p-Cumaroyl*-Anteils (vgl. Erläuterung zu Substanz **14**), dessen Position der

Veresterung durch die deutlich ins Tieffeld verschobenen Protonensignale von H-6'a und H-6''b an der OH-Gruppe von C-6'' zugeordnet wurde (Abb. 3.13). Die Masse stimmt mit der des 6''-O-*trans*-*p*-Cumaroylnaringenin-5-O- β -D-glucosids überein (LR ESI-MS (pos.) *m/z* 581 [M+H]⁺). Es handelte sich demnach um 6''-O-*trans*-*p*-Cumaroylisosalipurposid (**19**). Die Daten stehen im Einklang mit der Literatur [Zapesochnaya et al. 2002].

3.1.3.5 Flavanon-Aglyca

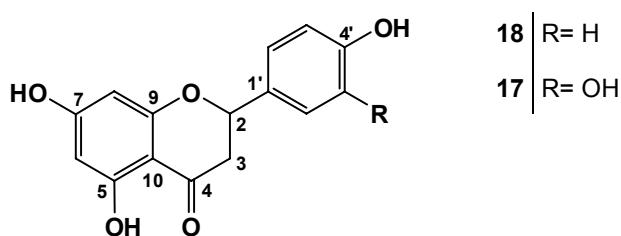


Abb. 3.14 Strukturformeln von Naringenin (**18**) und Eriodictyol (**17**).

Tab. 3.6: ¹H-und ¹³C-NMR-Daten von Naringenin (**18**) und Eriodictyol (**17**); 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	18		17	
	¹ H δ (ppm) , m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm) , m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	5,33 (1H, dd, <i>J</i> = 12,9, 3,0)	80,5	5,27 (1H, dd, <i>J</i> = 12,8, 2,9)	80,5
3a	3,10 (1H, d, <i>J</i> = 17,1, 12,9)	44,0	3,06 (1H, dd, <i>J</i> = 17,0, 12,8)	44,1
3b	2,69 (1H, d, <i>J</i> = 17,0, 3,0)		2,69 (1H, dd, <i>J</i> = 17,0, 2,9)	
4	-	197,6	-	197,7
5	-	165,5	-	165,5
6	5,86 (1H, d, <i>J</i> = 2,2)	97,2	5,87 (1H, d, <i>J</i> = 2,2)	97,0
7	-	169,1	-	168,5
8	5,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2)	96,4	5,89 (1H, d, <i>J</i> = 2,2)	96,2
9	-	164,9	-	164,9
10	-	103,2	-	103,3
1'	-	131,1	-	131,8
2'	7,31 (1H, d, <i>J</i> = 8,6)	129,0	6,91 (1H, s)	114,7
3'	6,81 (1H, d, <i>J</i> = 8,6)	116,3	-	146,9
4'	-	159,0	-	146,5
5'	6,81 (1H, d, <i>J</i> = 8,6)	116,3	6,78 (1H)	116,2
6'	7,31 (1H, d, <i>J</i> = 8,6)	129,0	6,78 (1H)	119,2

Naringenin und Eriodictyol

Aus Fraktion EA 6.4 wurde das Aglycon Eriodictyol (**17**, LR ESI-MS (pos.) m/z 289 [$M+H]^+$) und aus Fraktion EA 6.5 Naringenin (**18**) (LR ESI-MS (pos.) m/z 273 [$M+H]^+$) isoliert. Die Strukturen wurden analog zu den Substanzen **11**, bzw. **7** und **6** aufgeklärt und mit Literaturdaten verglichen [17: Pan et al. 2008, Zhang et al. 2006b, **18**: Markham und Ternai 1976, Zhang et al. 2006b]. Diese erwiesen sich als übereinstimmend.

3.1.3.6 Flavanonol-Aglyca

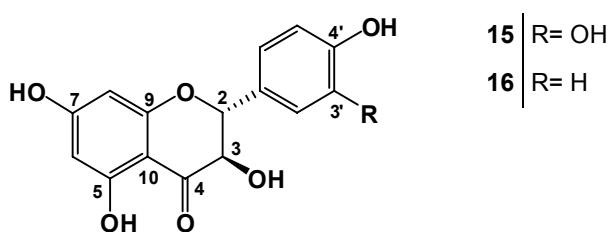


Abb. 3.15 Strukturformeln von Taxifolin (**15**) und Dihydrokämpferol (**16**).

Dihydrokämpferol (**16**)

Weiterhin wurden aus Fraktion EA 6.2 und EA 6.3 Taxifolin (**15**) bzw. Dihydrokämpferol (**16**) gewonnen. Die Strukturaufklärung von **16** erfolgte analog zu **5** und wurde anhand von Literaturwerten belegt [Foo and Karchesy 1989, Han et al. 2007]. Weitere Kenndaten von **16** sind die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = + 41^\circ$ (c=0.001, MeOH), und die molare Masse von 288 g/mol (LR ESI-MS (neg.) m/z 287 [$M-H]$ $^-$).

Taxifolin (**15**)

Das Protonenspektrum von **15** war mit dem von **16** vergleichbar, jedoch fanden sich Unterschiede im Signalspektrum des B-Rings. Hier lag ein ABC-Spinsystem vor, welches durch ein Singulett und zwei Dubletts, die jeweils ein Proton darstellten, deutlich wurde. Die Kopplungskonstante $J_{2/3}$ beider Substanzen lagen mit $J = 11,4$ bzw. $11,7$ Hz sehr hoch, was für eine diäquatoriale Stellung des B-Rings bezüglich der Hydroxygruppe sprach [Herz et al. 1972]. In Anbetracht der weiteren Kenndaten ($[\alpha]_D^{20} = + 47^\circ$ (c=0,0005), LR EI-MS (pos.) m/z 304 [$M]^+$) wurde Substanz **15** als Taxifolin identifiziert [Markham und Ternai 1976, Han et al. 2007].

Tab. 3.7: ¹H-und ¹³C-NMR-Daten von Taxifolin (15) und Dihydrokämpferol (16); 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	15		16	
	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
2	4,91 (1H, d, $J= 11,4$)	85,1	4,97 (1H, d, $J= 11,7$)	85,0
3	4,50 (1H, d, $J= 11,4$)	73,7	4,53 (1H, d, $J= 11,7$)	73,6
4	-	198,3	-	198,5
5	-	165,3	-	165,3
6	5,91 (1H, d, $J= 2,2$)	97,4	5,88 (1H, d, $J= 2,2$)	97,3
7	-	169,0	-	168,8
8	5,87 (1H, d, $J= 2,2$)	96,4	5,92 (1H, d, $J= 2,2$)	116,1
9	-	164,5	-	164,6
10	-	101,8	-	101,8
1'	-	129,9	-	129,3
2'	6,96 (1H, d, $J= 2,0$)	115,9	7,35 (1H, d, $J= 8,6$)	130,4
3'	-	146,3	6,83 (1H, d, $J= 8,6$)	116,1
4'	-	147,1	-	159,2
5'	6,80 (1H, d, $J= 8,2$)	116,1	6,83 (1H, d, $J= 8,6$)	116,1
6'	6,84 (1H, dd, $J= 8,1, 2,0$)	120,9	7,35 (1H, d, $J= 8,6$)	130,4

3.1.3.7 Salicylalkoholderivate

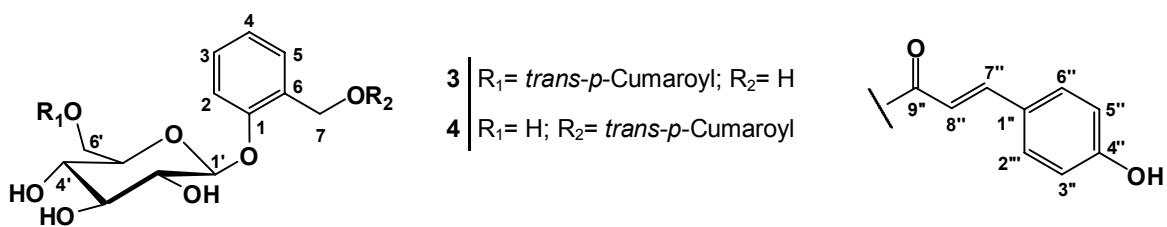


Abb. 3.16 Strukturformeln von Trichocarposid (3) und Populosid B (4).

Trichocarposid und Populosid B

Aus Fraktion EA 2 wurden zwei Substanzen mit identischem Molekulargewicht (LR ESI-MS (pos.) m/z 433 [M+H]⁺) isoliert. Ihre UV-Absorptionsmaxima lagen jeweils bei 289 und 312 nm (MeOH). Aufgrund der Ähnlichkeit der NMR-Spektren, wurde das Vorliegen von Strukturisomeren vermutet. Zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit der NMR-Daten, wurde die Nummerierung der Teilstrukturen aneinander angeglichen.

Zunächst waren in beiden Protonenspektren die Grundstrukturen eines *trans-p*-Cumarsäureanteils, sowie die einer β -konfigurierten Glucose zu erkennen. Weiterhin waren zusätzliche Signale eines weiteren Aromaten sichtbar. Es handelte sich um vier Protonensignale (zwei Dubletts, $\delta = 7,32$ bzw. $7,16$ (**3**), $\delta = 7,38$ bzw. $7,24$ (**4**) und zwei Dubletts von Dubletts, $\delta = 7,14$ bzw. $6,98$ (**3**), $\delta = 7,32$ bzw. $7,01$ (**4**)), denen durch Integration jeweils ein Proton zugewiesen werden konnte. Dies stellt das typische Aufspaltungsmuster eines ABCD-Spinsystems dar und sprach für zwei unterschiedliche Substituenten in *ortho*-Stellung des Aromaten, was durch die Kopplungskonstanten belegt werden konnte. Auch waren zwei zusätzliche geminale Protonendoubletts im höheren Feld vorhanden ($\delta = 4,78$ bzw. $4,57$ (**3**), $\delta = 5,43$ bzw. $5,32$ (**4**)), die, wie aus einem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experiment hervorging, mit den Protonen des Phenylrings korrelierten. Mithilfe von Berechnungen bezüglich des Molekulargewichts wurde beiden Substanzen eine Salicylalkohol-Teilstruktur zugeschrieben. Die Tieffeldverschiebung der geminalen Protonen von (**4**) deuteten auf eine Substitution mit einem entschirmenden Substituenten hin. Bei genauerer Betrachtung der Spektren stellte sich heraus, dass der Unterschied der beiden Strukturen allein in der Veresterungsposition der *trans-p*-Cumarsäure zu finden ist, denn in beiden Fällen lag eine Acetalbindung der aromatischen Hydroxygruppe des Salicylalkohols mit der Hydroxygruppe des anomeren Kohlenstoffs des Zuckers vor. Dies wurde durch $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektren belegt, wobei im Fall beider Substanzen eine Korrelation des C-1 ($\delta = 103,2$ (**3**), $\delta = 102,9$ (**4**)) des Salicylalkohols zum Proton ($\delta = 4,88$ (**3**), $\delta = 4,99$ (**4**)) des anomeren Kohlenstoffs vorzufinden war (siehe Abb. 3.17 bzw. Abb. 3.18).

Im Protonenspektrum von Substanz **3** war eine deutliche Tieffeldverschiebung von H-6'a und H-6'b (sowie H-5') im Gegensatz zum Glucoseteil von Substanz **4** zu erkennen, was die Veresterungsposition der Cumarsäure an C-6' bei Substanz **3** definierte. Ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC Experiment belegte dies, hier war eine deutliche Korrelation des quartären Kohlenstoffkerns C-9" mit den beiden Protonen an C-6' zu erkennen (siehe Abb. 3.17).

Im Fall von Substanz **4** war eine deutliche Tieffeldverschiebung der geminalen Protonen H-7a und H-7b des aliphatischen Teils des Salicylalkohols vorzufinden. Eine Korrelation von C-9" des Cumarsäurerestes zu diesen beiden Protonen konnte im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum beobachtet werden (siehe Abb. 3.18), somit konnte die Position der Veresterung zugeordnet werden. Substanz **3** wurde als Trichocarposid [Fernandes et al. 2009] und Substanz **4** als Populosid B [Zhang et al. 2006a] identifiziert.

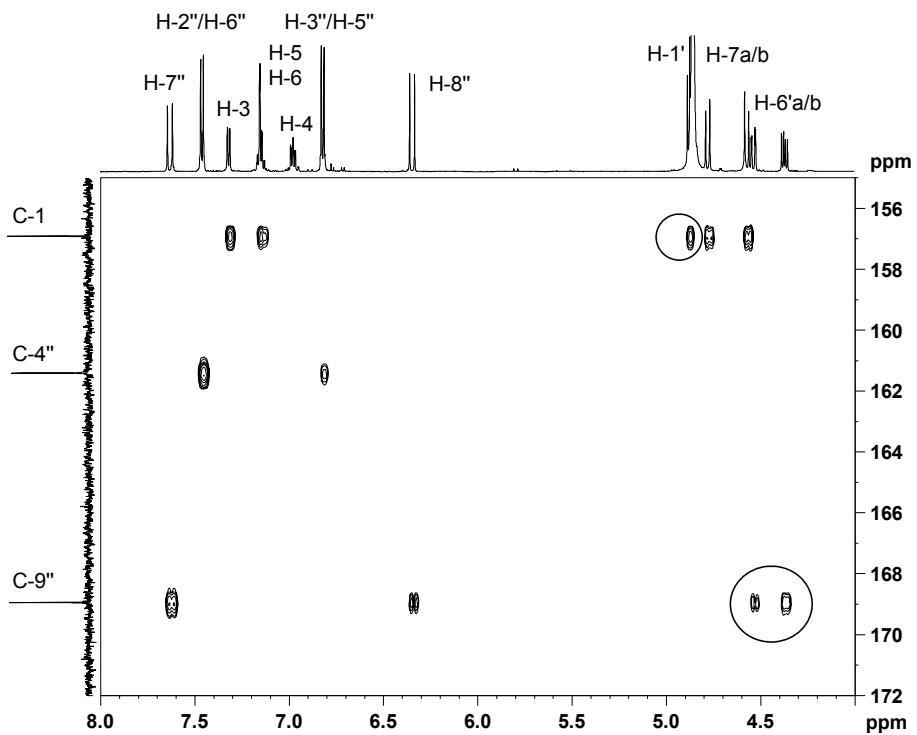


Abb. 3.17 Ausschnitt aus dem ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum von (3): Identifizierung der Position der Cumarylierung ($\text{C-9}''/\text{H-6 a/b}$) und der Glucosidierungsposition ($\text{C-1}/\text{H-1}'$); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

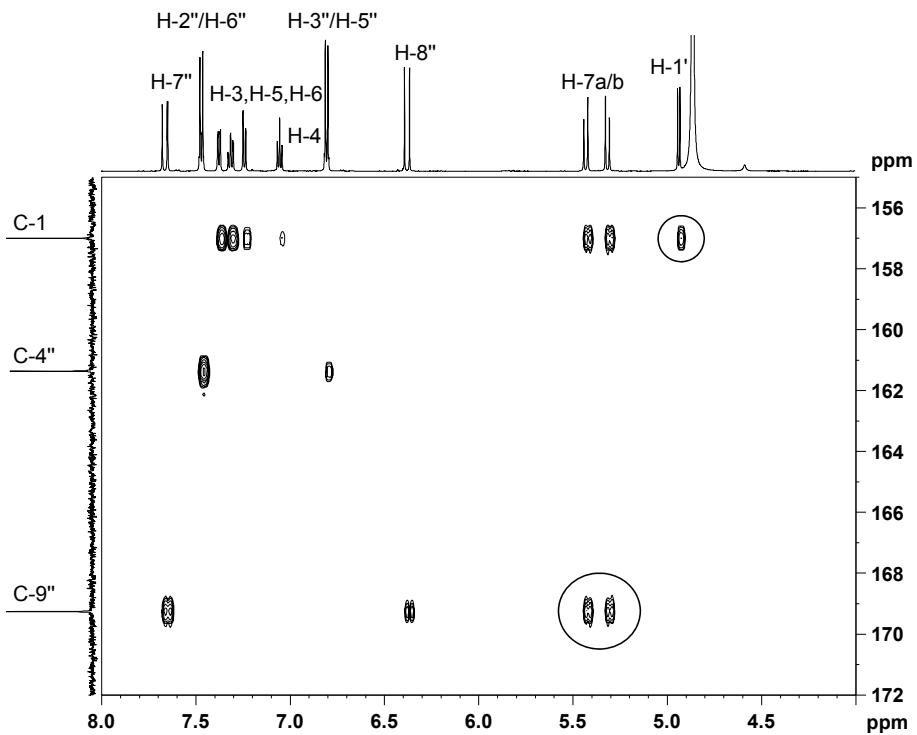


Abb. 3.18 Ausschnitt aus dem ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum von (4): Identifizierung der Position der Cumarylierung ($\text{C-9}''/\text{H-7 a/b}$) und der Glucosidierungsposition ($\text{C-1}/\text{H-1}'$); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

Tab. 3.8: ¹H-und ¹³C-NMR-Daten von Trichocarposid (3) und Populosid B (4); 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	3		4	
	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	-	156,9	-	157,0
2	7,32 (1H, d, J= 7,5)	132,3	7,38 (1H, d, J= 7,4)	127,2
3	6,98 (1H, dd, J= 8,5, 7,5)	129,8	7,01 (1H, dd, J= 7,5, 7,4)	130,4
4	7,14 (1H, dd, J= 8,5, 8,5)	123,8	7,32 (1H, dd, J= 8,1, 7,5)	123,5
5	7,16 (1H, d, J= 8,5)	129,9	7,24 (1H, d, J= 8,2)	130,6
6	-	117,2	-	116,7
7a	4,78 (1H, d, J= 13,0)	61,0	5,43 (1H, d, J= 12,7)	62,6
7b	4,57 (1H, d, J= 13,0)		5,32 (1H, d, J= 12,7)	
1'	4,88 (1H, d, J= 7,7)	103,2	4,93 (1H, d, J= 7,5)	102,9
2'	3,54 (1H, dd, J= 9,0, 7,7)	75,0	3,51 (1H, dd, J= 9,0, 7,6)	75,0
3'	3,49 (1H, dd, J= 8,9, 8,9)	77,9	3,48 (1H, dd, J= 9,0, 8,5)	78,0
4'	3,42 (1H, dd, J= 9,4, 8,9)	71,8	3,40 (1H, dd, J= 9,5, 8,5)	71,3
5'	3,70 (1H, ddd, J= 9,4, 6,8, 2,4)	75,7	3,45 (1H, ddd, J= 9,5, 8,5, 2,2)	78,2
6'a	4,54 (1H, dd, J= 12,0, 2,3)	64,6	3,90 (1H, dd, J= 12,0, 2,2)	62,5
6'b	4,37 (1H, dd, J= 11,9, 6,8)		3,71 (1H, dd, J= 12,1, 5,5)	
1"	-	127,1	-	127,2
2"	7,46 (1H, d, J= 8,6)	131,2	7,47 (1H, d, J= 8,6)	131,2
3"	6,82 (1H, d, J= 8,6)	116,9	6,81 (1H, d, J= 8,6)	116,8
4"	-	161,4	-	161,4
5"	6,82 (1H, d, J= 8,6)	116,9	6,81 (1H, d, J= 8,6)	116,8
6"	7,46 (1H, d, J= 8,6)	131,2	7,47 (1H, d, J= 8,6)	131,2
7"	7,63 (1H, d, J= 15,8)	146,8	7,66 (1H, d, J= 15,8)	146,8
8"	6,34 (1H, d, J= 15,8)	114,9	6,38 (1H, d, J= 15,8),	115,1
9"	-	168,9	-	169,3

3.1.3.8 Einfache Phenole

Catechol

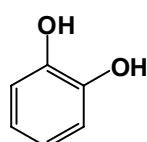


Abb. 3.19 Strukturformel von Catechol (7).

Die Unterfraktion EA 4.1 bestand aus einer kristallinen Substanz mit charakteristischem Geruch. Beim Stehenlassen an der Luft verfärbte sich die Substanz schnell bräunlich. Aus dem ^1H - sowie dem ^{13}C -NMR-Spektrum ging hervor, dass es sich um ein kleines Molekül mit aromatischem AA'BB'-Spinsystem handelte. Zusammen mit der molekularen Masse (LR EI-MS m/z 110 [M^+]) wurde sie als Catechol (**7**, Brenzcatechin, 1,2-Dihydroxybenzol) identifiziert [Smith and Proulx, 1976].

Tab. 3.9 ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Catechol (**7**); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

#	7	
	^1H	^{13}C
	δ (ppm), m, J (Hz)	δ (ppm)
1	-	146,3
2	-	146,3
3	6,74 (1H, dd, J = 5,9, 3,5)	116,5
4	6,64 (1H, dd, J = 5,9, 3,5)	120,9
5	6,64 (1H, dd, J = 5,9, 3,5)	120,9
6	6,74 (1H, dd, J = 5,9, 3,5)	116,5

trans-p-Cumarsäure

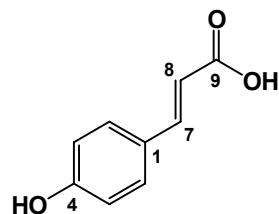


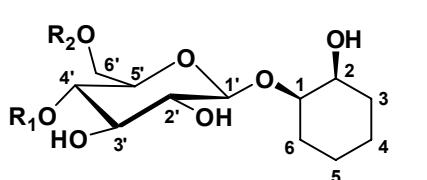
Abb. 3.20 Strukturformel von *trans*-p-Cumarsäure (**10**).

Neben Catechol konnte aus Fraktion EA 4 eine weitere einfache phenolische Struktur isoliert werden. Im Protonenspektrum war wiederum ein phenolisches AA'BB'-Spinsystem zu erkennen. Zusammen mit den Protonendoublets bei δ = 7,58 bzw. 6,28, welche eine 3J -Kopplung von 15,8 Hz aufweisen (*trans*-ständige Protonen einer Doppelbindung) und einem im ^{13}C -Spektrum charakteristischem Signal eines Carbonylkohlenstoffs bei δ = 171,2 wurde in Anbetracht der molekularen Masse (LR EI-MS m/z 164 [M^+]) sowie im Vergleich mit Literaturdaten [Kort et al. 1996] *trans*-p-Cumarsäure zugeordnet.

Tab. 3.10 ^1H -und ^{13}C -NMR-Daten von *trans*-*p*-Cumarsäure (11); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

#	11	
	^1H	^{13}C
	δ (ppm), m, J (Hz)	δ (ppm)
1	-	127,3
2	7,43 (1H, d, $J= 8,6$)	131,0
3	6,79 (1H, d, $J= 8,6$)	116,8
4	-	161,1
5	6,79 (1H, d, $J= 8,6$)	116,8
6	7,43 (1H, d, $J= 8,6$)	131,0
7	7,58 (1H, d, $J= 15,8$)	146,4
8	6,28 (1H, d, $J= 15,8$)	115,8
9	-	171,2

3.1.3.9 Spezielle Phenole



1 | R₁= *trans*-*p*-Cumaryl; R₂= H
2 | R₁= H; R₂= 4-Hydroxybenzoyl

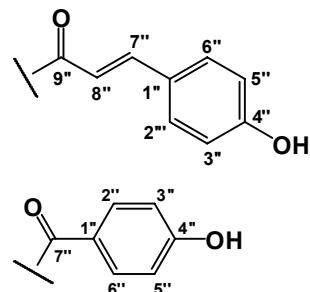


Abb. 3.21 Strukturformeln von Isograndidentatin A (1) und 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin (2).

6'-4-O-Hydroxybenzoylgrandidentin (2)

Aus Fraktion EA 1.5 konnte eine weiße amorphe Substanz isoliert werden. Sie wies ein UV-Maximum (λ_{max}) bei 257 nm (MeOH) und eine spezifische Drehung ($[\alpha]_D^{20}$) von +41° (c = 0,0005, MeOH) auf.

Im ^1H -NMR-Spektrum (siehe Abb. 3.18) ließen sieben Methinsignale zwischen $\delta = 3,24$ und 4,57 das typische Signalmuster eines β -konfigurierten Glucoserestes erkennen. Durch ein ^1H , ^{13}C -HSQC Experiment konnte eines dieser Protonensignale – ein Dublett ($J = 7,9$ Hz) bei $\delta = 4,41$ – dem anomeren Kohlenstoff des Zuckers zugewiesen werden. Weiterhin waren im Tieffeld zwei weitere Doublets ($\delta = 6,81$ und 7,88, beide $J = 8,6$, 2H)

zu erkennen. Zusammen mit dem Signal eines quartären Kohlenstoffkerns ($\delta = 168,0$) und zwei Signalen von aromatischen Protonen (je 2H), welche miteinander korrelierten ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC), wurde eine 4-Hydroxybenzoyl-Teilstruktur vermutet. Da die Protonen an C-6' der Hexopyranose im Gegensatz zu unsubstituierter Glucose einen deutlichen Tieffeldshift erfuhren, wurde eine Veresterung mit 4-Hydroxybenzoësäure an dieser Stelle angenommen. Diese Vermutung wurde durch ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC Experiment bestätigt, in dem ^3J -Korrelationen zwischen dem Kohlenstoffkern des Esters und H-6'a/b vorzufinden waren (siehe Abb. 3.23). Sowohl vier Paare von breiten geminalen Protonensignalen ($\delta = 1,11-1,92$), als auch zwei weitere tieffeldverschobene Protonensignale ($\delta = 3,68-3,78$), deren Kopplung durch ein $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment festgestellt werden konnte, deuteten auf einen 1,2-Cyclohexandiolring hin. Dies wurde durch $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC- und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experimente verifiziert. Die Verknüpfung dieses Rings an Position 1 mit dem anomeren C-Atom der Glucose konnte wiederum durch ein $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Experiment deutlich gemacht werden, hier waren Kreuzsignale der Protonen H-1 und H-1' zu erkennen (siehe Abb. 3.24), was im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY durch die korrespondierenden ^3J -C,H-Korrelationen ebenfalls bestätigt wurde. Um die Stellung der Hydroxygruppen der 1,2-Cyclohexandiolteilstruktur zu eruieren, wurde die Substanz hydrolysiert und dünnenschichtchromatographisch unter Verwendung von Referenzsubstanzen analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.6, S. 24). Sie konnte als *cis*-2-Hydroxy-cyclohexyl-6'-O-4-hydroxybenzoyl- β -D-glucopyranosid identifiziert werden. Die massenspektrometrischen Daten bestätigten dies, es wurde die Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_9$ und eine Molekülmasse von 398,25 g/mol ermittelt (LR ESI-MS (pos.) m/z 399 [$\text{M}+\text{H}]^+$; HR ESI-MS (pos.) m/z 397,1497 [$\text{M}-\text{H}]^+$, berechnet als $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_9$: 397,1504). Da diese Verbindung bis dato in der Literatur nicht beschrieben war, wurde die neue Verbindung 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin benannt.

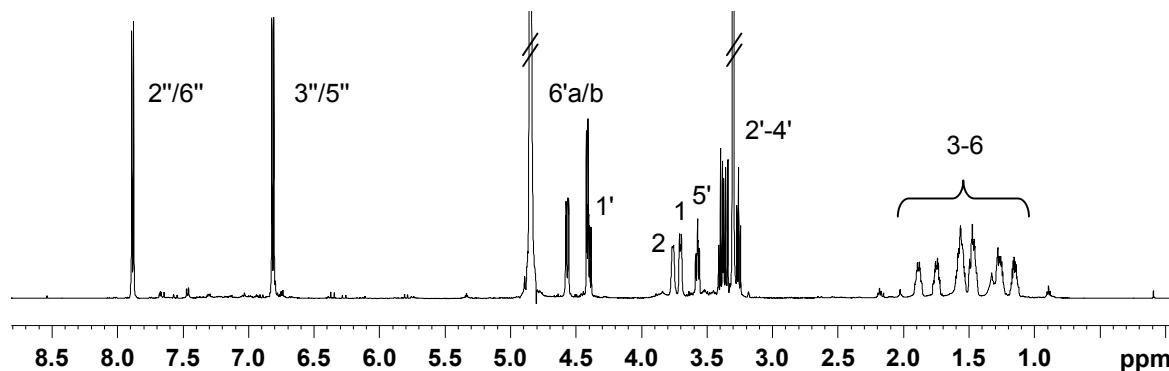


Abb. 3.22 ^1H -NMR Spektrum von (2); 600 MHz, CD_3OD , 298 K.

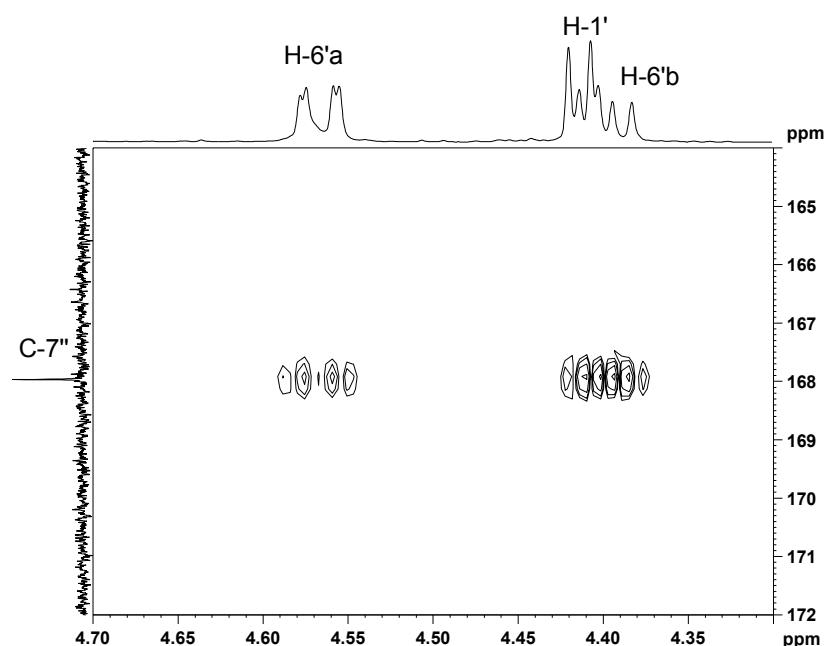


Abb. 3.23 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von (2): Identifizierung der Veresterungsposition der 4-Hydroxybenzoësäure (C-7''/H-6 a/b); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

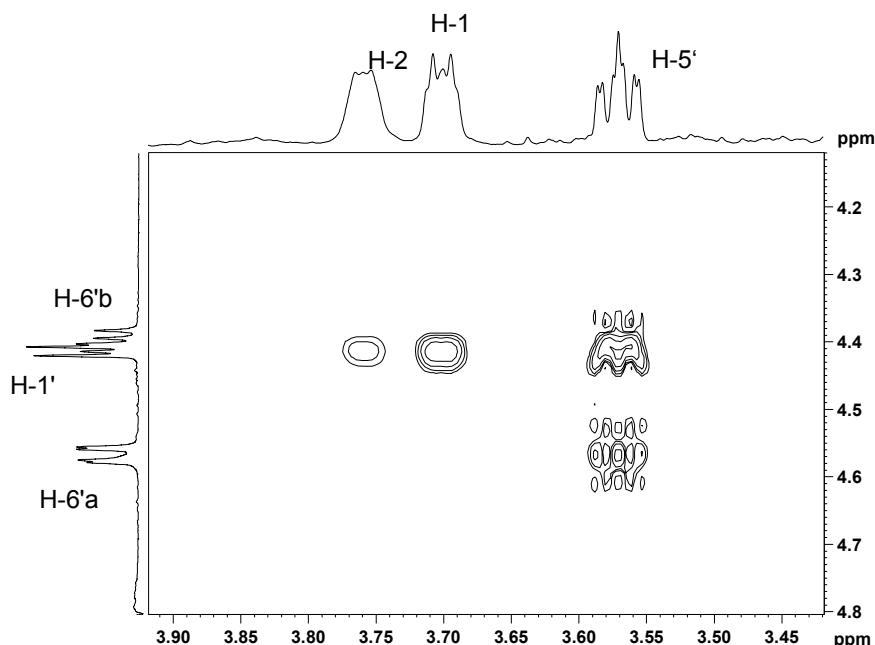


Abb. 3.24 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von (2): Identifizierung der Glucosidierungspositon des cis-1,2-Cyclohexandiolrestes (H-1'/H-1); 600 MHz, CD_3OD , 298 K.

Isograndidentatin A (1)

Eine weitere weiße amorphe Substanz konnte aus Fraktion EA 1.5.2 in reiner Form erhalten werden. Ihre spezifische Drehung ($[\alpha]_D^{20}$) betrug $+57^\circ$ ($c=0,0005$, MeOH), die UV-Maxima (λ_{max}) lagen bei 227 und 313 nm (MeOH).

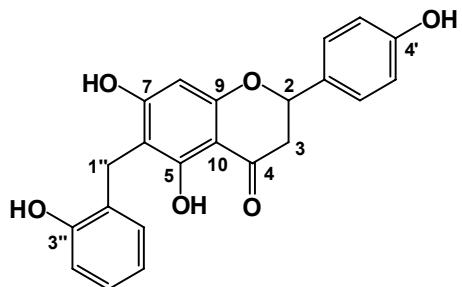
Zunächst wurde – wie schon bei anderen Substanzen beschrieben – die Präsenz eines *trans-p*-Cumarsäurerestes ermittelt. Weiterhin waren im ^1H -Spektrum Protonensignale zu erkennen, die auf eine Hexose hindeuteten. Da es sich um Signale höherer Ordnung handelte, wurde das ^{13}C -Spektrum zur Auswertung herangezogen. Aufgrund des Vergleichs mit der Literatur und kapillarelektrophoretischer Analyse (siehe 2.2.2.7, S. 24) konnte die Hexose als β -D-Glucose identifiziert werden. Auffällig waren die Tieffeldverschiebung des C-4" Kohlenstoffs im ^{13}C -Spektrum, und des H-4"-Protons im ^1H -Spektrum (überlagert vom Lösungsmittelsignal). Dies deutete auf eine Substitution hin. Im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum war eine Korrelation des Carbonyl-Kohlenstoffkerns mit dem Signal des anomeren Protons der Hexose zu erkennen und machte die Position der Veresterung der Glucose mit der *trans-p*-Cumarsäure identifizierbar.

Des Weiteren waren im hohen Feld des Protonenspektrums wie bei Substanz **2** mehrere breite Signale zu erkennen ($\delta = 1,26-1,86$). Aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum konnte entnommen werden, dass es sich um acht Protonen handelte, von denen sich jeweils zwei in geminaler Stellung befanden. Außerdem war ein weiteres breites Signal (2H) im tieferen Feld zu erkennen ($\delta = 3,81-3,89$), hier korrelierte jeweils ein Proton mit einem Kohlenstoffkern ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC). Aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC Spektrum konnte eine Korrelation zwischen einem der Kohlenstoffkerne ($\delta = 79,4$) mit dem Proton des anomeren C-Atoms der Glucose entnommen werden und deutete auf eine acetalische Bindung hin.

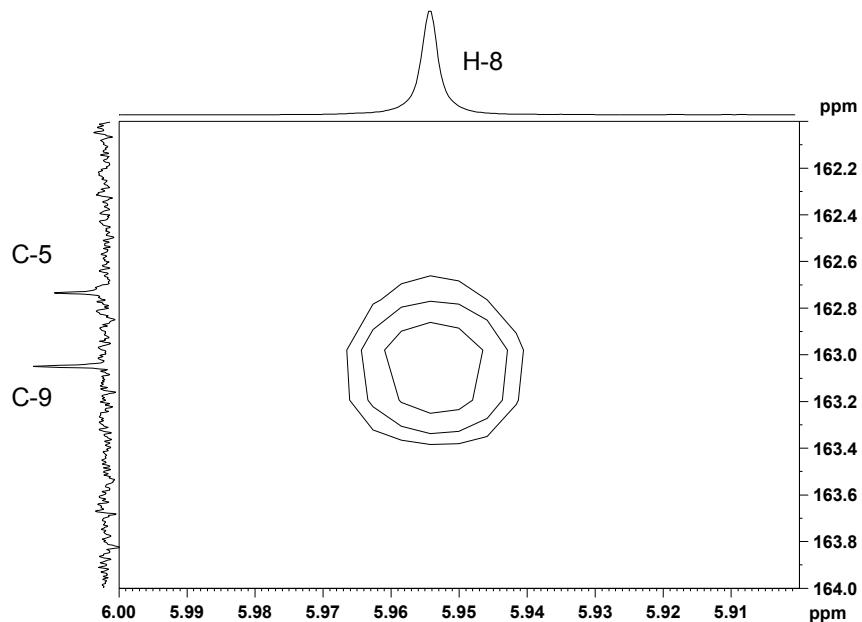
Im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum war eine Kopplung der beiden einzelnen Protonen zu erkennen, was auf einen *ortho*-hydroxylierten Cyclohexanring schließen ließ. Um die Stellung der Protonen an diesem Ring zu bestimmen, wurde das Molekül ebenfalls hydrolysiert und mit Hilfe von Referenzsubstanzen dünnenschichtchromatographisch analysiert. (siehe 2.2.2.6, S.24) Durch die charakteristische Farbentwicklung nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Reagenz sowie den Vergleich des R_f -Wertes wurde eine *cis*-1,2-Cyclohexandiol-Teilstruktur bestätigt. Die Daten stimmen mit der Literatur überein [Si et al. 2009] und erlaubten die Identifizierung von **1** als Isograndidentatin A (*cis*-2-Hydroxycyclohexyl-6'-O-*trans-p*-cumaroyl- β -D-glucopyranosid).

Tab. 3.11 ¹H-und ¹³C-NMR-Daten von Isograndidentatin A (1) und 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin; 600 bzw. 150 MHz, CD₃OD, 298 K.

#	1		2	
	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm), m, J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	3,81-3,89 (1H, m)	79,4	3,68-3,72 (1H, m)	81,6
2	3,81-3,89 (1H, m)	70,9	3,73-3,78 (1H, m)	70,3
3a	1,77-1,86 (1H, m)	31,4	1,71-1,78 (1H, m)	31,3
3b	1,51-1,58 (1H, m)		1,43-1,51 (1H, m)	
4a	1,58-1,66 (1H, m),	22,4	1,52-1,61 (1H, m)	22,6
4b	1,26-1,37 (1H, m)		1,22-1,30 (1H, m)	
5a	1,66-1,77 (1H, m)	23,1	1,52-1,61 (1H, m)	23,1
5b	1,26-1,37 (1H, m)		1,11-1,19 (1H, m)	
6a	1,77-1,86 (1H, m)	27,6	1,85-1,92 (1H, m)	30,0
6b	1,58-1,66 (1H, m),		1,43-1,51 (1H, m)	
1'	4,44 (1H, d, J= 7,9)	102,2	4,41 (1H, d, J= 7,9)	104,4
2'	3,32-3,35 (1H, m),	75,1	3,24-3,28 (1H),	75,4
3'	3,58-3,66 (1H, m)	75,6	3,42-3,76 (1H, m)	77,8
4'	4,80-4,89 (1H, m)	72,5	3,33-3,38 (1H, m)	72,1
5'	3,50-3,55 (1H, m)	76,1	3,57 (1H, ddd, J= 9,2, 7,0, 2,1)	75,4
6'a	3,58-3,66 (1H, m)'	62,4	4,57 (1H, dd, J= 11,8, 2,1)	64,9
6'b	3,50-3,55 (1H, m)		4,40 (1H, dd, J= 11,8, 6,9)	
1''	-	127,1	-	122,2
2''	7,46 (1H, d, J= 8,4, d, J= 8,4)	131,3	7,88 (2H, d, J= 8,6)	132,9
3''	6,80 (1H, d, J= 15,8)	116,9	6,81 (1 H, d, J= 8,6)	116,1
4''	-	161,5	-	163,6
5''	6,80 (1H, d, J= 15,8)	116,9	6,81 (1 H, d, J= 8,6)	116,1
6''	7,46 (2H, d, J= 8,4, d, J= 8,4)	131,3	7,88 (2H, d, J= 8,6)	132,9
7''	7,66 (1H, d, J= 15,8)	147,2	-	168,0
8''	6,36 (1H, d, J= 15,8)	114,8		
9''	-	168,6		

Phelligrin A**Abb. 3.25 Strukturformel von Phelligrin A (20).**

Aus Fraktion EA 6 wurde eine gelb-bräunliche Substanz mit einem UV-Maximum (λ_{\max}) bei 294 nm (MeOH) und einem Drehwert $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ$ (c= 0,0005, MeOH) isoliert.

**Abb. 3.26 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von (20): Identifizierung der Substitutionsposition des Salicylalkoholrestes 2 (C-9/H-8); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.**

Im Protonenspektrum von **20** waren Strukturmerkmale eines Naringeningrundgerüstes und einer Salicylalkoholkomponente zu erkennen, diese beiden Strukturelemente wurden anhand von Referenzdaten (siehe u. a. Naringenin-, Populosid B- bzw. Trichocarposid-Daten) verifiziert. Die Position der Substitution des Naringeningrundgerüstes wurde durch

ein ^1H , ^{13}C -HMBC-Experiment ermittelt. Aufgrund der molekularen Masse (LR EI-MS m/z 379 [$\text{M}+\text{H}]^+$) konnte von einer C-Substitution ausgegangen werden. Das Experiment zeigte ^2J -Korrelationen des Protons H-8 mit den Kohlenstoffkernen in Position 7 und 9, ^3J -Korrelationen zu C-6 und C-10 und eine ^4J -Korrelation zum Carbonyl-Kohlenstoff (Abb. 3.26). Weiterhin wurde das Protonensignal 1" betrachtet. Hier waren ^2J -Korrelationen zu C-6 und C-2" und ^3J -Korrelationen zu C-5, C-7, C-3" und C-7" (Abb. 3.27) zu erkennen. Somit konnte das Kohlenstoffatom in Position 6 als Stelle der C-Substitution identifiziert werden. Bei der isolierten Substanz handelt es sich um Phelligrin A. Die Daten stehen im Einklang mit der Literatur [Mo et al. 2009].

Tab. 3.12 ^1H -und ^{13}C -NMR-Daten von Phelligrin A (20); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

#	20	
	^1H δ (ppm), m, J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	5,32 (1H, dd, $J= 13,1, 3,0$)	80,4
3a	3,11 (1H, dd, $J= 17,0, 13,1$)	44,1
3b	2,68 (1H, dd, $J= 13,1, 3,0$)	
4	-	197,6
5	-	162,7
6	-	108,9
7	-	167,5
8	5,95 (1H, s)	96,3
9	-	163,0
10	-	103,0
1'	-	131,3
2'	7,31 (1H, d, $J= 8,6$)	129,0
3'	6,81 (1H, d, $J= 8,6$)	116,3
4'	-	159,0
5'	6,81 (1H, d, $J= 8,6$)	116,3
6'	7,31 (1H, d, $J= 8,6$)	129,0
1"	3,81 (2H, d, $J= 2,2$)	22,8
2"	-	128,5
3"	-	155,7
4"	6,74 (1H, dd, $J= 7,8, 1,1$)	116,1
5"	6,97 (1H, ddd, $J= 7,8, 7,6, 1,4$)	127,8
6"	6,68 (1H, $J= 7,5, 7,5, 1,1$)	120,7
7"	7,05 (1H, dd, $J= 7,5, 1,5$)	130,9

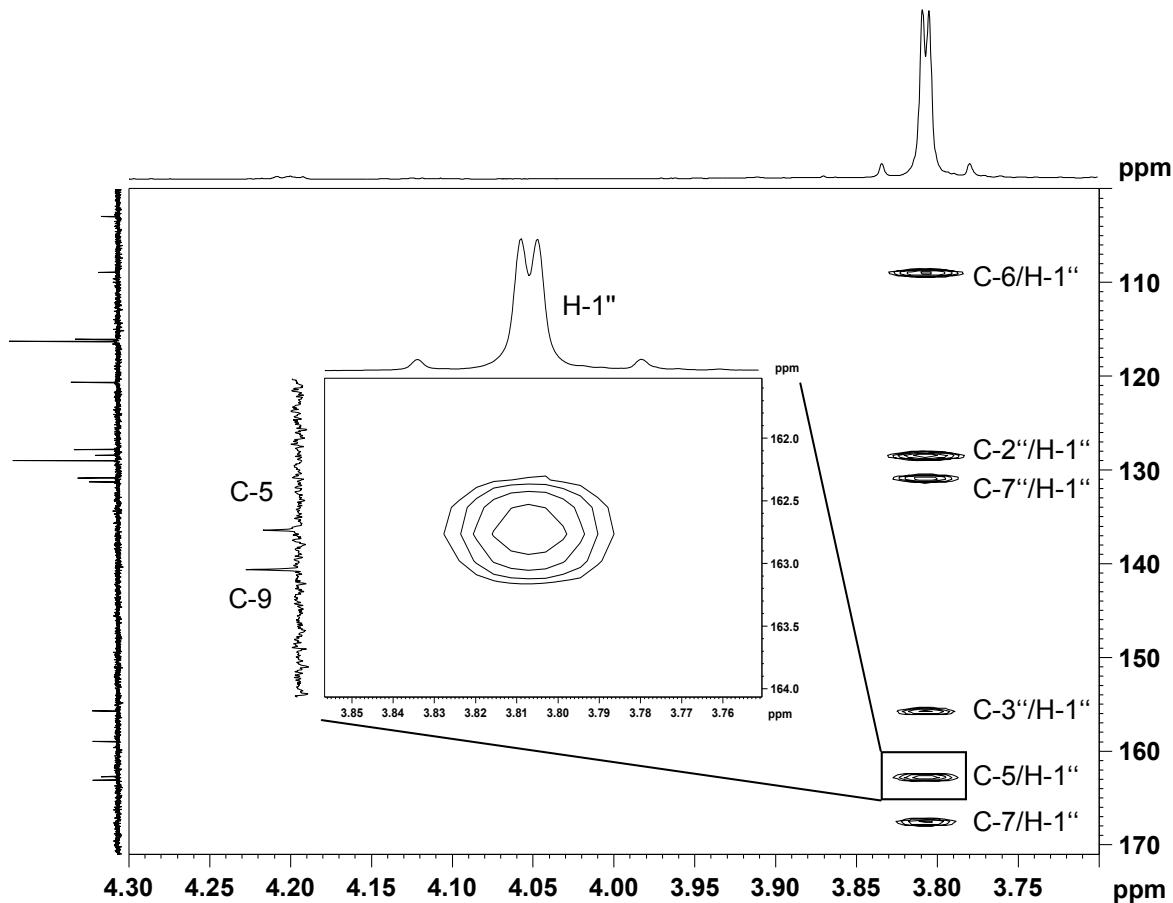


Abb. 3.27 Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von (20): Identifizierung der Substitutionsposition des Salicylalkoholrestes 1 (C-5, C-6, C-7, C-2'', C-3'', C-7''/H-1''); 600 bzw. 150 MHz, CD_3OD , 298 K.

3.1.3.10 Kapillarelektrophoretische Ermittlung der Glucosekonfiguration

Die Konfiguration der Glucose wurde exemplarisch an drei der isolierten Substanzen aus verschiedenen Stoffgruppen (Naringenin-7-O-glucosid, Populosid B und Isograndidentatin A) bestimmt. Dazu wurden die Substanzen hydrolysiert und die Glucose mit S-(-)-1-Phenylethylamin derivatisiert. Die Vergleichssubstanzen D- und L-Glucose wurden ebenfalls derivatisiert. Da die Migrationszeiten bei kapillarelektrophoretischen Untersuchungen nicht im gleichen Maße reproduzierbar sind wie z. B. bei HPLC-Analysen, wurde zunächst ein 1:1-Gemisch der Vergleichssubstanzen kapillarelektrophoretisch untersucht. Im nächsten Schritt wurde dem Gemisch weitere derivatisierte D-Glucose zugesetzt. Über die Veränderung der Peakhöhe konnte nun eine Zuordnung der Diastereomere erfolgen. Als Nächstes wurde dem 1:1-Gemisch der Vergleichzucker je einer der zu bestimmenden Proben zugesetzt. Da sich bei allen Substanzen der Peak der D-Glucose vergrößerte, wurde D-Glucose bei allen Substanzen

als Zuckerkomponente identifiziert. Um dies noch zusätzlich zu verifizieren, wurden alle zu bestimmenden Glucosederivate ohne die Standards per Kapillarelektrophorese analysiert. Bei allen Substanzen wurde nur ein einzelner Glucosepeak detektiert und somit ein Vorliegen von Gemischen ausgeschlossen. Da es sich bei allen bestimmten Substanzen um β -D-Glucopyranoside handelte, wurde im Anbetracht der Syntheseleistung von Pflanzen dieses Ergebnis auf die anderen Substanzen übertragen.

3.1.3.11 Zusammenfassung und Diskussion

Aus der Ethylacetatfraktion des wässrig ausgezogenen Weidenrindentrockenextraktes aus *Salix purpurea* L. wurden 20 phenolische Substanzen isoliert. Naringeninglucoside (**6, 7, 8, 13, 14**) stellen die Hauptvertreter der Flavonoide im untersuchten Trockenextrakt dar. Ein hoher Gehalt an Naringenin-5-O-glucosiden ist charakteristischerweise in älterer Rinde von *S. purpurea* L. vorzufinden, während in jüngerer Rinde das korrespondierende Chalkon Isosalipurposid dominiert [Jarrett und Williams 1967]. Da es sich bei dem verwendeten Trockenextrakt um eine Zubereitung entsprechend der Monographie Salicis cortex des Europäisches Arzneibuches handelt, ist die Verarbeitung von Rinde junger Zweige gewährleistet. Somit hat während der Lagerung oder des Extraktionsprozesses höchstwahrscheinlich eine Isomerisierung von Isosalipurposid (**12**) zu Naringenin-5-O-glucosiden (**6, 7**) stattgefunden. Schon in früheren Arbeiten konnte eine Epimerisierung von (2R)-Naringenin-5-O-glucosid zu (2S)-Naringenin-5-O-glucosid unter experimentellen Bedingungen beobachtet werden [Tyukavkina et al. 1989]. Die Isomerisierung vollzieht sich über die Zwischenstufe des Chalkons, wie Miles und Main [1988] anhand von Naringin aufzeigen konnten. Krause und Galensa [1991a] zeigten, dass (2S)-Naringenin in einem 25%igen Methanol-Wasser-Gemisch bei 70°C innerhalb von drei Stunden vollständig racemisiert, während in reinem Methanol nahezu keine Racemisierung eintrat. Da der untersuchte Extrakt mit reinem Wasser bei 80°C ausgezogen wurde, können somit keine Aussagen über das Verhältnis des Vorliegens der einzelnen Isomere im Ausgangsmaterial getroffen werden. 6"-O-trans-p-Coumaroylnaringenin-5-O- β -D-glucosid (**13/14**) wurde bereits 1969 von Vinokurov und Skigan aus *Salix acutifolia* WILLD. isoliert. Auch hier treten drei Stereoisomere auf, die nebeneinander isoliert werden konnten (**13, 14, 19**). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals NMR-Daten der cumaroylierten Flavanonglucoside vorgelegt, weiterhin wurde eine stereochemische Zuordnung getroffen.

Ein hoher Anteil der Flavonoide Luteolin-7-O-glucosid, Eriodictyol-7-O-glucosid und auch Naringenin-7-O-glucosid ist typischerweise in den Blättern von *S. purpurea* L. zu finden

[Jarrett und Williams 1967]. Die beiden Flavanonglucoside (**11**, **8**) wurden im vorliegenden Extrakt ebenfalls identifiziert. Während der Isolierung aller Flavanon-7-O-glucoside fiel auf, dass ihre Diastereomere sowie die beiden *trans*-Isomere des Dihydrokaempferol-7-O-glucosids (**5**) mittels achiraler HPLC-Phasen unter normalen Chromatographiebedingungen nicht separierbar sind. Bei allen isolierten 7-O-Glucosiden wurden in den NMR-Spektren Doppelsignale beobachtet. Massenspektrometrische Analysen bestätigten das Vorliegen von Isomeren. Zur Auftrennung von Diastereomerengruppen der Flavanon-7-O-glucoside sind chirale Methoden (chirale HPLC oder CE mithilfe chiraler Selektoren, z. B. Cyclodextrine) nötig [Krause und Galensa 1990 und 1991a und 1991b, Aturki et al. 2004, Gel-Moreto et al. 2003]. Im Gegensatz dazu ist anzumerken, dass sowohl die diastereomeren Naringenin-5-O-glucoside, als auch deren cumarylisierten Derivate mittels RP-18 HPLC leicht separierbar waren. Schon im Zuge der dünnsschichtchromatographischen Analyse konnten teilweise zwei unterschiedliche Banden beobachtet werden. Ein Grund hierfür stellt höchstwahrscheinlich eine Wasserstoff-Brückenbindung des Glucoserestes zum Carbonylsauerstoff der Flavanon-5-O-glucoside dar, welche die Rotationsfreiheit des Glucoserestes und somit die Flexibilität des Moleküls stark einschränkt.

Bemerkenswert ist, dass es sich bei den Substanzen **2**, **13**, **14** und **19** um *trans-p*-Cumarsäureester handelt, wobei es sich bei allen um eine Veresterung in 6-Position des β -D-Glucoserestes handelt. Eine Veresterung in 4-Position des Zuckers findet sich nur bei Substanz **1**. Da bekannt ist, dass Acylgruppen innerhalb von Extraktionsprozessen ihre Position ändern können [Pearl und Darling 1963, Birkofe et al. 1966], liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Substanzen um Artefakte handelt, die während des Extraktionsprozesses oder bei der Aufarbeitung entstanden sein könnten. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei Substanz **2** (6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin) um eine bisher nicht bekannte Verbindung. Schon seit den 1960er Jahren sind *cis*-1,2-Cyclohexandiol-Derivate als Inhaltsstoffe der Familie der Salicaceae bekannt, z. B. ist Grandidentatin (*cis*-2-Hydroxycyclohexyl-2'-O-*trans-p*-cumaryl- β -D-glucopyranosid) in der Rinde von *S. purpurea* L. gefunden worden [Pearl und Darling 1962]. In neuerer Zeit wurden Stereoisomere des Grandidentatins, die sogenannten Isograndidentatine aus *Populus* (Salicaceae) isoliert [Si et al. 2009, Kim et al. 2009]. Isograndidentatin A (**1**) wurde hiermit zum ersten Mal in einem Vertreter der Gattung *Salix* gefunden. Die Grandidentatin-Isomere unterscheiden sich hauptsächlich in der Position der Veresterung, was höchstwahrscheinlich ebenfalls auf eine Wanderung der Acylgruppe während der Aufarbeitung zurückzuführen ist. Die Klärung der absoluten Konfiguration des

Kohlenstoffatoms der freien Hydroxygruppe bzw. der glucosidischen Bindungsstelle in der Stoffgruppe der *cis*-1,2-Cyclohexandiolderivate, stellt eine Herausforderung dar. Dahin gehende Experimente sind in der Literatur bisher nicht beschrieben, obwohl auch das entsprechende Stereoisomer des Grandidentatins, das Purpurein, bereits isoliert wurde [Pearl und Darling 1970b].

Die strukturisomeren Salicylalkoholderivate Trichocarposid (**3**) und Populosid B (**4**) stellen bisher unbekannte Inhaltsstoffe der Art *S. purpurea* L. dar. Trichocarposid wurde zuvor aus *S. martiana* LEYB. isoliert [Fernandes et al. 2009], während Populosid B für die gesamte Gattung *Salix* bisher nicht beschrieben wurde [Boeckler et al. 2011]. Jedoch sind Populoside in der Gattung *Populus* (Familie: Salicaceae) zu finden.

Catechol (**9**), ein reaktives Abbauprodukt von Salicylalkoholderivaten mit 1-Hydroxy-6-oxocyclohex-2-en-1-carbonsäureester-Teilstrukturen (z. B. Salicortin, Tremulacin, siehe 1.2.2.1, S.4), konnte in größerer Menge aus der Fraktion gewonnen werden. Der Gehalt im Gesamtextrakt wurde ebenfalls bestimmt (siehe 3.1.4.2, S. 81).

Bemerkenswert ist auch die Isolierung von Phelligrin A (**20**), einem bisher unbekannten Inhaltsstoff in der Familie der Salicaceae. Diese Substanz wurde bisher einzig aus dem Fruchtkörper von *Phellinus igniarius* (L. ex FR.) QUEL. (gemeiner Feuerschwamm), einem essbaren und pharmazeutisch verwendeten Pilz aus der Familie der Hymenochaetaceae (Agaricomycetidae), gewonnen [Mo et al. 2003]. Bei *Phellinus* handelt es sich um einen Parasiten, der Weißfäule an befallenen Bäumen hervorruft. Leider lassen die Autoren offen, um welche Wirtspflanze es sich bei ihrer Wildsammlung handelte. In der Literatur sind Berichte über Isolierungen von solchen C-benzylierten Flavanonen rar. In den 1970er Jahren entdeckten Hufford und Lasswell die 6- bzw. 8-*ortho*-Hydroxybenzyl-derivate des Pinocembrins, das Uvaretin bzw. Isovaretin in der Rinde von *Uvaria chamae* P. BEAUV. (Annonaceae) [Hufford und Lasswell 1976, Lasswell und Hufford 1977]. Lee und Mitarbeiter [1995, 1996] isolierten die Taxifolinderivate Gericudranin D bzw. E aus der Rinde von *Cudrania tricuspidata* BUREAU (Moraceae). In Europa, aber z. B. auch in China, ist der wirtsspezifische *P. igniarius* häufig auf Vertretern der Gattung *Salix* zu finden [z. B. Sell 2008, Tomšovský et al. 2010, Dai et al. 2007]. *Phellinus* stellt eine große und weitverbreitete Gattung dar, die in gemäßigten über subtropische bis hin zu tropischen Klimagebieten auftreten kann [Dai et al. 2007]. In bestimmten Regionen Indiens wird *Phellinus* auch auf lebenden Vertretern der Moraceae gefunden [Ajid und Janardhanan 2007]. Somit könnte die Biosynthese aller bis dato isolierten *ortho*-Hydroxy-

benzylderivate von Flavanonen bzw. Flavanonolen in Zusammenhang mit einem *Phellinus*-Befall der Wirtspflanze stehen. Nun stellt sich die Frage, inwiefern der Pilz diese Synthese beeinflusst und ob er sich das Spektrum an Sekundärmetaboliten der Wirtspflanze für sein eigenes Profil zunutze macht. In diesem Zusammenhang sind weitergehende Untersuchungen nötig, ein erster Schritt würde darin bestehen, die Anwesenheit des Pilzes im Drogenausgangsmaterial nachzuweisen.

3.1.4 Charakterisierung des Trockenextraktes bzw. der Fraktionen

3.1.4.1 DC-Fingerprint

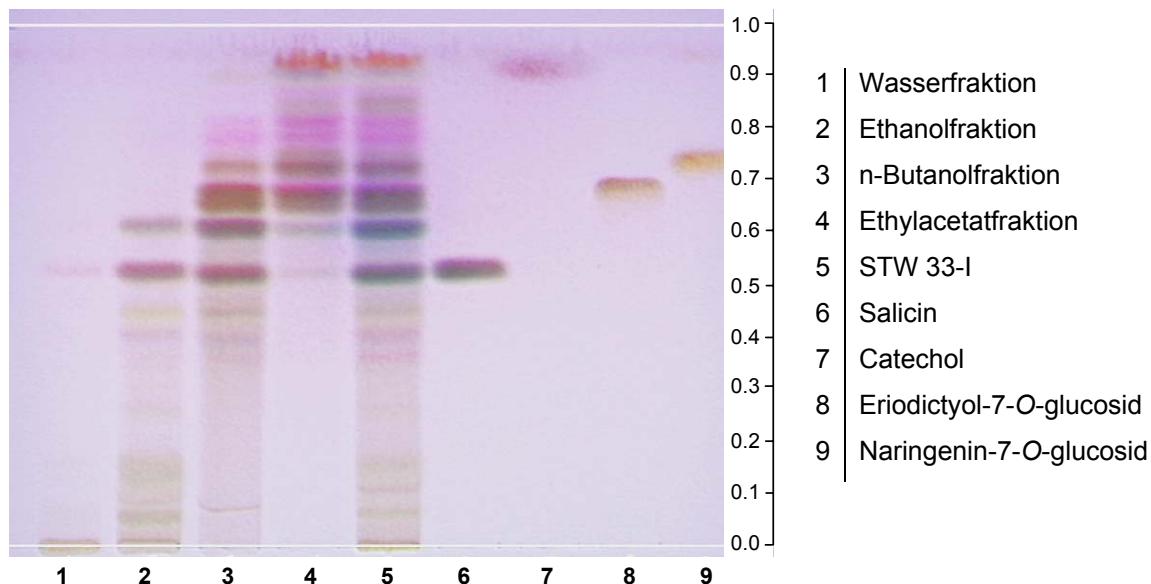


Abb. 3.28 Dünnschichtchromatogramm des Extraktes, Fraktionen und Referenzen.
Fließmittel: Ethylacetat 77: Methanol 15: Wasser 8 (Ph. Eur. 6.0); Laufstrecke 13 cm;
Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure bei Tageslicht.

Auf dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 3.28) ist die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen des Extraktes gut zu erkennen. In der Wasserfraktion befinden sich sehr polare Substanzen, wie z. B. Zucker und eine sehr geringe Menge an Salicin, die Ethanolfraktion enthält hauptsächlich Salicin, jedoch auch polarere Verbindungen. Große Mengen an Salicin finden sich ebenfalls in der Butanolfraktion, jedoch sind auch Flavonoidglucoside enthalten. Die Ethylacetatfraktion beinhaltet hauptsächlich Flavonoide, wie z.B. Naringenin- und Eriodictyolglucoside, aber auch weitere phenolische Inhaltsstoffe, die an einer rosa Färbung der Banden nach Derivatisierung mit Anisaldehydreagenz zu erkennen sind.

3.1.4.2 Catechol

Der Catecholgehalt im Gesamtextrakt wurde mittels Methode C1 bestimmt (2.4.5.4, S. 36, Kalibriergerade: 3.3.2.5, S. 119). Es wurden 20 mg/ml Extrakt in Wasser gelöst und 75 µl per HPLC analysiert. Die Bestimmung wurde dreifach durchgeführt und der Gehalt anhand eines externen Standards bestimmt. Dieser betrug $2,3 \pm 0,1\%$.

3.1.4.3 Gerbstoffe

Der Gehalt an Gerbstoffen wurde nach der Vorschrift aus dem Ph. Eur. 5.8 in abgewandelter Form durchgeführt [Glasl 1983]. Bei dieser Methode wird anstelle der Vergleichssubstanz Pyrogallol die spezifische Absorption von Catechin als Bezugsgröße verwendet. Jede Fraktion bzw. der Gesamtextrakt wurde dreifach aufgearbeitet und analysiert (siehe Tab. 3.13).

3.1.4.4 Gesamtsalicylalkoholderivate bzw. Salicin

Die Bestimmung der Gesamtsalicylalkoholderivate erfolgte laut Ph. Eur. 6.0 (Monographie Weidenrinde) durch basische Hydrolyse zu Salicin (siehe Tab. 3.13). Zudem wurden die Proben auch unhydrolysiert quantifiziert [Meier et al. 1985]. Die Proben wurden mit jeder der beiden Methoden jeweils dreimal aufgearbeitet und dreifach bestimmt.

3.1.4.5 Zusammenfassung der Gehaltsbestimmungen

Laut Ph. Eur. 6.1 erfordert Weidenrindentrockenextrakt einen Gesamtsalicinengehalt von mindestens 5%. Der Trockenextrakt entspricht hinsichtlich des Gesamtsalicylalkoholderivatgehaltes von 23,0% sowohl dem Europäischen Arzneibuch als auch der Spezifikation (23-26%) des Herstellers (siehe Tab. 3.13). Der Hauptanteil dieser Salicylalkoholderivate fand sich in der n-Butanol- (34,7%) und Ethanolfraktion (27,3%) wieder, während in der Ethylacetatfraktion und in der H₂O-Fraktion der Gehalt am niedrigsten ausfiel. Der reine Salicingehalt von STW 33-I betrug 12,8%, wobei das Verteilungsmuster dem der Salicylalkoholderivate entsprach. Damit stellte Salicin den Hauptbestandteil der Salicylalkoholderivate im Trockenextrakt dar. Den höchsten Gesamtphenol, Restphenol und Gerbstoff-Polyphenolgehalt besaß die Ethylacetatfraktion. Der Wert von 33,0% Restphenolen deutete auf einen hohen Flavonoidanteil hin (Bestimmung des Flavonoidgehaltes siehe 3.2, S. 83).

Tab. 3.13 Gehaltsbestimmungen nach Ph. Eur.

Gehalt [%] von Extrakt und Fraktionen (Bestimmung nach Ph. Eur.)						
		STW 33-1	EA	BUT	ETOH	H ₂ O
A	<i>Gesamtphenole</i>	19,7 ± 0,3	41,7 ± 0,1	16,3 ± 0,3	6,7 ± 0,0	4,4 ± 0,0
	<i>Restphenole</i>	12,9 ± 0,1	33,0 ± 0,1	11,9 ± 0,2	4,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1
	<i>Gerbstoff-Polyphenole</i>	6,8 ± 0,2	8,7 ± 0,1	4,3 ± 0,2	2,7 ± 0,0	2,8 ± 0,1
B	<i>Salicin</i>	12,8 ± 0,1	5,2 ± 0,2	18,2 ± 1,0	19,7 ± 0,3	3,9 ± 0,1
	<i>Salicylalkoholderivate</i>	23,0 ± 0,8	14,2 ± 0,2	34,7 ± 1,8	27,3 ± 0,9	5,4 ± 0,3

Auch der Gehalt an Catechol war sich mit 2,3% beachtlich hoch, stand jedoch im Einklang mit der Salicinbestimmung. Von 23% Salicylalkoholderivaten stellten ca. 13% reines Salicin dar. Dies sprach für einen fortgeschrittenen Abbau einiger labiler Salicylalkoholderivate wie z. B. Salicortin und Tremulacin (siehe 1.2.2.1, S. 4). Der Gehalt an reinem Salicin liegt in der Trockenmasse unter 1%. Da Knuth et al. [2011] den Abbau von Salicortin zu Catechol auch in wässrigem Kulturmedium (37°C) beweisen konnten, kann in diesem Fall ebenfalls von einem starken Abbau ausgegangen werden, zumal zur Herstellung des Extraktes die Ausgangsdroge mit heißem Wasser (80°C) extrahiert worden war.

3.2 Quantifizierung von Naringeninderivaten in STW 33-I

3.2.1 Problemstellung

Polyphenole scheinen gemäß den bisher vorliegenden Studien maßgeblich an der Wirkung von Weidenrindenextrakten beteiligt zu sein [Khayyal et al. 2005, Nahrstedt et al. 2007]. Bislang wurde wenig Augenmerk auf die analytische Charakterisierung des Flavonoidspektrums gerichtet und bis heute stellt der Flavonoidgehalt von Weidenrindenpräparaten kein qualitätsbestimmendes Merkmal laut Arzneibuch dar. Durch die Isolierungsarbeit (siehe 3.1.3, S. 46) war bekannt, dass es sich bei den Hauptvertretern der Flavonoide im Trockenextrakt von *Salix purpurea* L. um Naringeninderivate handelt. Entsprechend sollten vor allem die prominentesten Vertreter Naringenin-5-O- β -D-glucosid, Naringenin-7-O- β -D-glucosid, (2R/2S)-6"-O-p-trans-Cumaroylnaringenin-5-O- β -D-glucosid und das Chalkonglucosid Isosalipurposid gemeinsam als Naringenin bestimmt werden. In Anlehnung an die Monographie *Ginkgo folium* [Ph. Eur.] wurde eine HPLC-Gruppenbestimmung entwickelt.

3.2.2 Hydrolysierbarkeit von Flavanonglucosiden

Saure Hydrolyse

Flavanon-5-O- β -D-glucoside und Flavanon-7-O- β -D-glucoside lassen sich unterschiedlich leicht durch Erhitzen mit Säure hydrolysieren [Markham 1982]. Während sich Naringenin-5-O- β -D-glucosid schon nach 30 min Erhitzen unter Rückfluss mit verdünnter Salzsäure spalten ließ, zersetzte sich Naringenin-7-O- β -D-glucosid vor dem Zeitpunkt der quantitativen Hydrolyse zu nicht weiter analysierten Produkten. Mit 11,5%iger TFA wurde dasselbe Ergebnis erhalten.

β -Glucosidase

Flavonoid-O- β -D-glucoside lassen sich auch durch den Einsatz von β -Glucosidasen enzymatisch spalten [Markham 1978b], wobei hier zwar das Naringenin-7-O- β -D-glucosid nahezu vollständig zum Naringenin umgesetzt wurde, jedoch in diesem Fall die 5-O-Glucoside relativ unberührt blieben. Zudem sind β -Glucosidasen nicht in der Lage, acyierte Glucosen umzusetzen [Markham 1982, Harborne 1965, Ruuhola et al. 2003], d. h. (2R/2S)-6"-O-p-trans-Cumaroyl-naringenin-5-O- β -D-glucosid würde bei ausschließlich enzymatischer Hydrolyse der Gehaltsbestimmung entzogen.

3.2.3 Methodenentwicklung

Aufgrund dieser Tatsachen wurde eine Kombination aus den beiden Methoden gewählt. Zunächst erfolgte eine saure Hydrolyse mit TFA, um anschließend die restlichen Verbindungen mithilfe von β -Glucosidase zu spalten. Der Gesamtgehalt an Naringenin wurde mittels HPLC quantifiziert. Alle verwendeten Methoden sind im Methodenteil (Kapitel 2.3, S. 28) beschrieben.

Zunächst wurde eine Methode zur Auftrennung der reinen Referenzsubstanzen Naringenin-5-O- β -D-glucosid und Naringenin-7-O- β -D-glucosid erarbeitet (Methode NO). Die Glucoside wurden ungefähr im Verhältnis ihres Vorkommens in einer Anfangskonzentration von 16 mg/ml Gesamtextrakt STW 33-I eingesetzt. Als Säurekomponente wurde 11,5%ige TFA verwendet, da die Säure im Gegensatz zu verdünnter HCl keinen Einfluss auf die Aktivität der Glucosidase ausübte. In den Chromatogrammen der hydrolysierten Referenzen waren keine Methylierungsprodukte zu erkennen und somit kein Einfluss des Methanolanteils im Lösemittel festzustellen.

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Die Proben wurden in einem Methanol-Wasser-Gemisch gelöst. Hierbei gehen sowohl das Naringenin, als auch die Glucoside in Lösung. Weiterhin wurde 1,0 ml der Lösung mit 1,0 ml einer 11,5% igen TFA-Lösung in einem Wheaton-V-Vial versetzt. Da TFA eine flüchtige Säure ist, wurden die Proben zur Hydrolyse in dicht verschlossenen Wheaton-V-Vials erhitzt, um einen möglichst einheitlichen pH-Wert beizubehalten. Teflon-Silikonkonzepte, die die Aussparungen der Vial-Deckel abdeckten, erwiesen sich als flexibel genug, um die Ausdehnung des Methanol/Wasser-Gemisches bei der Erhitzung zu kompensieren. Ein wesentlicher Schritt für die Quantifizierung war die Neutralisierung der TFA-Lösung, so dass die Glucosidase in einem pH-Bereich von 6-7 [Markham 1982] ihre Wirkung entfalten konnte. Entscheidend ist, dass der pH-Wert nicht ins Basische umschlägt, da sich unter diesen Bedingungen die Naringeninderivate rasch in die korrespondierenden Chalkone umwandeln. Um dieses Milieu zu erreichen, wurde die Probe zunächst mit NaOH und anschließend mit Natriumhydrogenphosphatpuffer versetzt. Ein Teil der Lösung wurde mit ml β -Glucosidaselösung bei 37°C für 30 min im Wasserbad [Markham 1982] erwärmt. Hier war bei der Methodenentwicklung zu beachten, dass die Ionenkonzentration der Lösung nicht zu hoch ausfiel, da dies der Aktivität der Glucosidase stark entgegenwirkte. Um die Teilschritte der Reaktionen zu kontrollieren, wurden von der Ausgangsprobe, der mit TFA hydrolysierten Probe und der

Probe nach Spaltung mit β -Glucosidase HPLC-Chromatogramme angefertigt (siehe Abb. 3.29). Eine genaue Vorgehensweise zur Probenvorbereitung findet sich im Methodenteil.

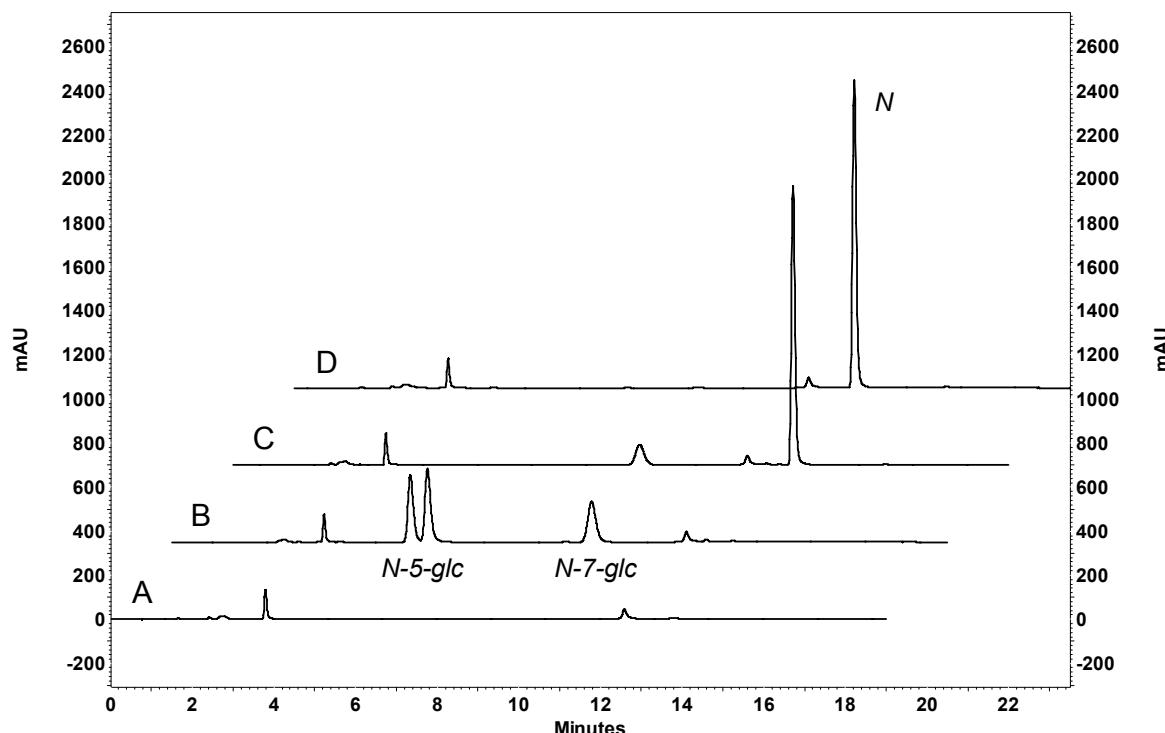


Abb. 3.29 Schrittweise Hydrolyse der Standards. A: Lösungsmittelkontrolle, B: Anfangslösung, C: Probe nach Hydrolyse mit TFA, D: Probe nach Hydrolyse mit TFA und β -Glucosidase. Chromatogramme bei 289 nm, Methode N0.

3.2.3.2 HPLC-Methodenentwicklung

Um die Methode auf den Gesamtextrakt übertragen zu können, wurden zwei weitere RP-HPLC-Methoden entwickelt. Methode N1 trennte die meisten Komponenten des Extraktes innerhalb von 85 min auf und eignet sich zur Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse (Abb. 3.30 bis Abb. 3.32). Die zweite Methode diente der Analytik von Naringenin (Methode N2, siehe Abb. 3.33). Hier wurden die Nebenkomponenten innerhalb von 21 min von Naringenin selektiv abgetrennt und der Naringeninpeak konnte bei 289 nm gegen den internen Standard Hesperetin ausgewertet werden.

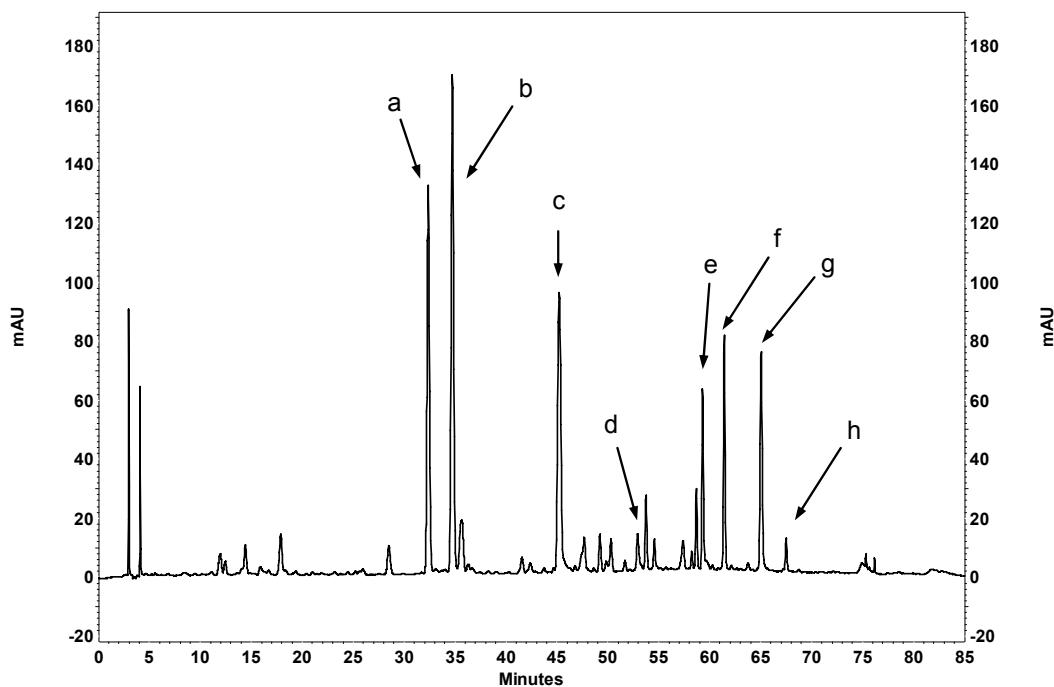


Abb. 3.30 HPLC-Chromatogramm des underivatisierten Gesamtextraktes (Methode N1, 289 nm). Relevante Naringeninderivate: a bzw. b: (2R)- bzw. (2S)-Naringenin-5-O-glucosid, c: Naringenin-7-O-glucosid, d: Isosalipurposid, e bzw. f: 6"-trans-p-Cumaroyl-(2R)- bzw. (2S)-naringenin-5-O-glucosid, g: Naringenin, h: 6"-trans-p-Cumaroylisalipurposid; c_0 : 10,003 mg/ml STW 33-I.

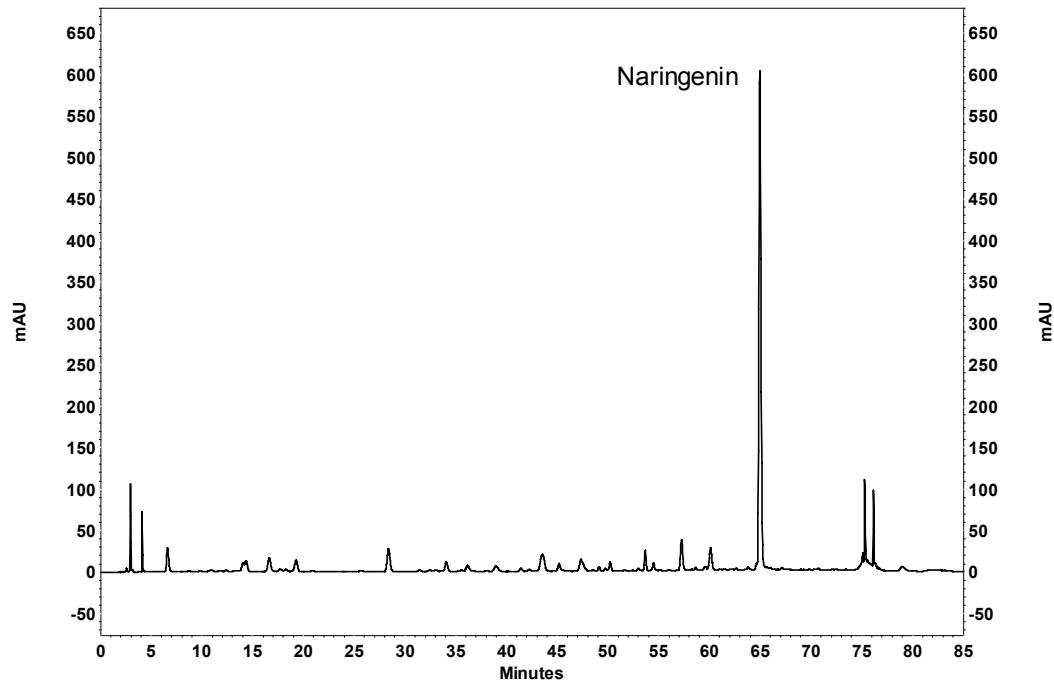


Abb. 3.31 HPLC Chromatogramm des Gesamtextraktes nach vollständiger Hydrolyse (Methode N1, 289 nm). c_0 : 10,003 mg/ml STW 33-I.

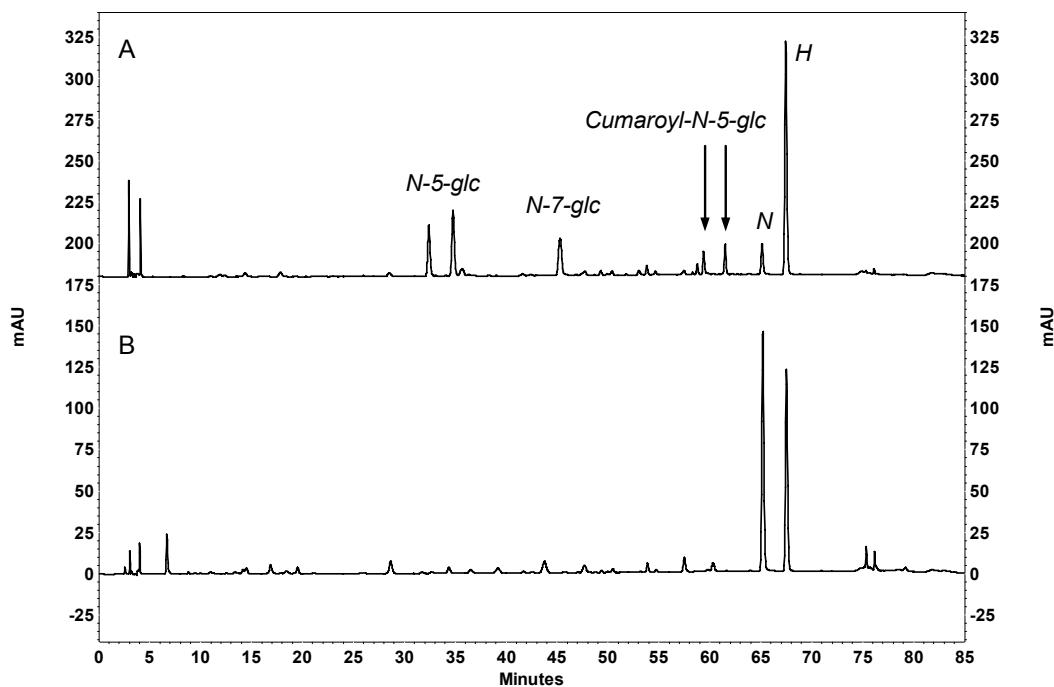


Abb. 3.32 Überprüfung auf Vollständigkeit der Hydrolyse (Methode N1, 289 nm, mit internem Standard Hesperetin). A: unhydrolysierte Probe, B: vollständig hydrolysierte Probe; $c_0 = 5,153 \text{ mg/ml STW 33-I}, 15,96 \mu\text{g/ml Hesperetin (H); Naringenin (N)}$.

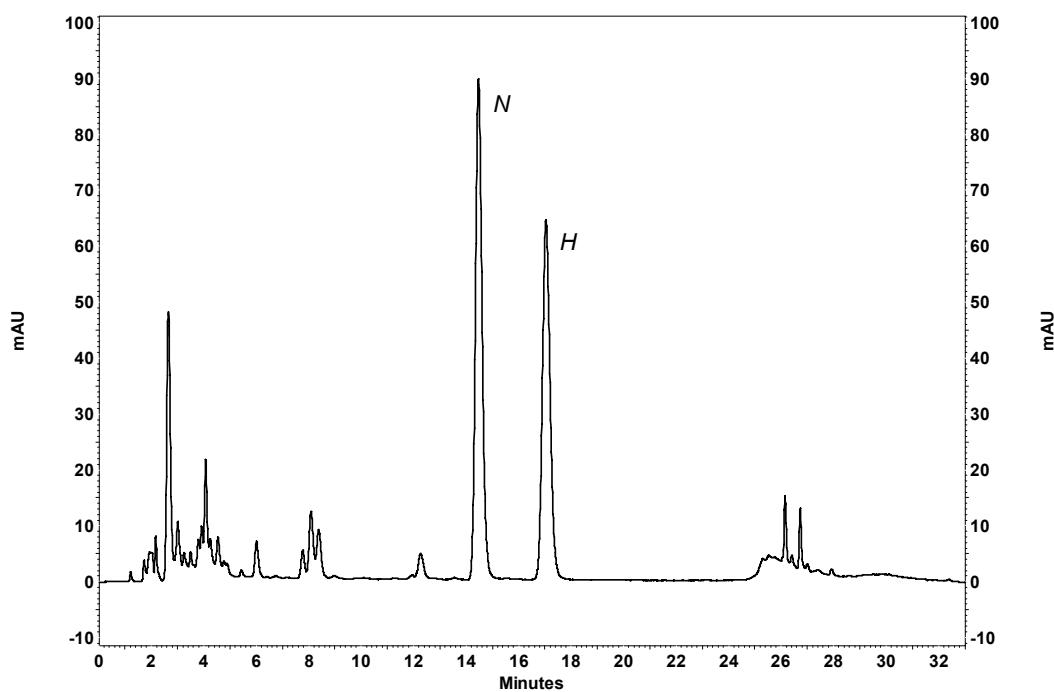


Abb. 3.33 Analysenchromatogramm (Methode N2, 289 nm, mit internem Standard Hesperetin). $c_0 = 5,153 \text{ mg/ml STW 33-I}, 15,96 \mu\text{g/ml Hesperetin (H); Naringenin (N)}$.

3.2.3.3 Hydrolysedauer

Um die optimale Hydrolysedauer der Probe mit 11,5%iger TFA zu ermitteln, wurde eine Probe aus Standards in 4 Parallelen angesetzt und bei 120°C für 10, 20, 30 und 60 min im Trockenschrank hydrolysiert (Abb. 3.34). Anschließend wurde die Probe weiter nach der Methode aufgearbeitet. Ab einer Dauer von 20 min wurde eine vollständige Hydrolyse beobachtet. Auch nach 60 min waren keine prominenten Abbauprodukte erkennbar. Deshalb wurde als Hydrolysedauer ein Zeitraum von 30 min gewählt.

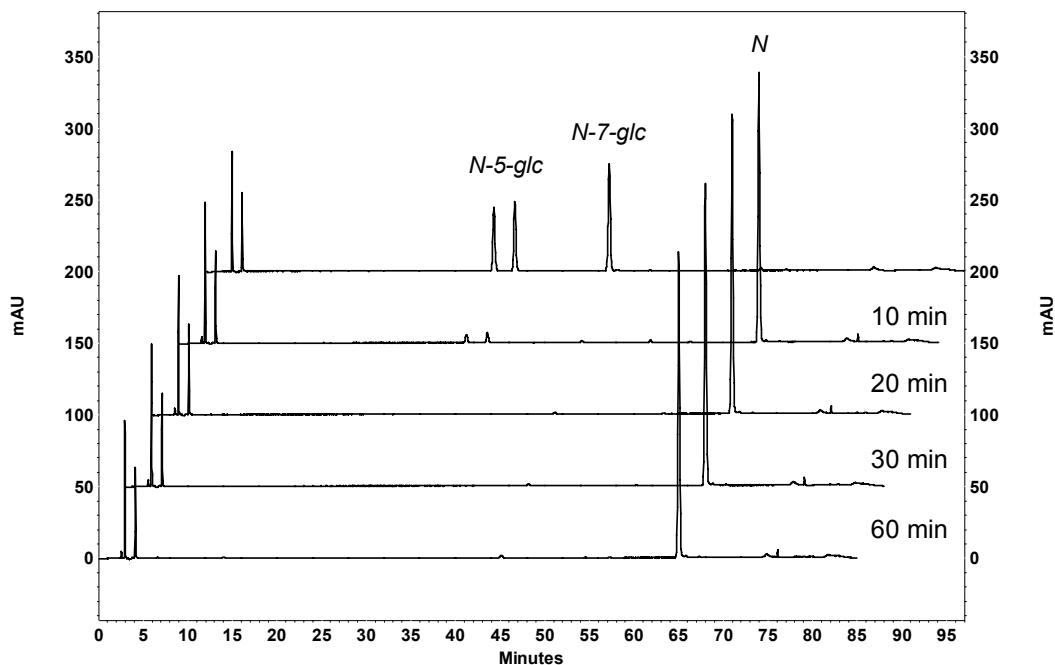


Abb. 3.34 Ermittlung der optimalen Hydrolysedauer (Methode N1, 289 nm). Aufarbeitung einer Probe ($c_0 = 0,61 \text{ mg/ml}$ Naringenin-5-O-glucosid, $0,31 \text{ mg/ml}$ Naringenin-7-O-glucosid) nach einer Hydrolysedauer mit TFA von 10, 20, 30 und 60 min und nachfolgender Behandlung mit β -Glucosidase (oben: Ausgangslösung).

3.2.3.4 Ermittlung der Einwaage

Ein weiterer Vorversuch stellte eine Analyse von STW 33-I in verschiedenen Konzentrationen dar und diente der Verifizierung der gewählten Enzymmenge. Zwar zeigten die Ergebnisse der Einwaagen 4-16 mg/ml keinen statistischen Unterschied zu dem Ergebnis der Einwaage 2 mg/ml, jedoch war ein Trend zu erkennen (Abb. 3.35). Dies röhrt wahrscheinlich daher, dass die Glucosidase ab einer bestimmten Konzentration entweder abgesättigt ist oder dass die Höhe der Ionenkonzentration eine unzureichende Aktivität der Glucosidase bewirkt.

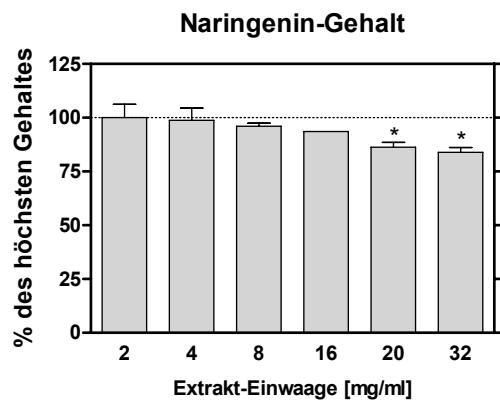


Abb. 3.35 Bestimmung der optimalen Einwaage. Mittelwerte \pm SD der Gehaltsbestimmungen bei verschiedenen Einwaagen des Gesamtextraktes. 2-8 mg/ml: n=3, 16-32 mg/ml: n=2, p < 0,05.

Aufgrund des hohen Flavanonengehaltes des Extraktes wurde eine höhere Ausgangskonzentration von 5 mg/ml gewählt. Dies diente dem Zweck, diese Methode unverändert auch auf andere Weidenrindenextrakte anwenden zu können, deren Gehalt an Naringeninderivaten deutlich geringer ausfallen dürfte, ohne die Einwaage zu erhöhen (um die Aktivität der β -Glucosidase nicht zu beeinträchtigen). Bei Durchführung eines weiteren Versuchs mit der Ausgangskonzentration 5 mg/ml ergaben sich durchschnittlich $425,4 \pm 14,2$ μg Naringenin pro ml Ausgangslösung (n=6) und damit einen Gehalt von $8,51 \pm 0,23\%$ berechnet als Naringenin. Weiterhin wurde die zweifache Ausgangskonzentration (10 mg/ml) getestet. Mit einem Gehalt von $8,44 \pm 0,23\%$ ($844,3 \pm 23,2$ μg Naringenin pro ml Ausgangslösung, n=4) wiesen die beiden Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede auf, weder im Mittelwert (t-Test), noch in der Varianz (F-Test). Somit wurde die Einwaage auf 5 mg/ml STW 33-I festgelegt.

3.2.3.5 Interner Standard

Die Wahl des internen Standards fiel auf das Flavanon Hesperetin (4'-Methoxyeriodictyol). Es weist ein dem Analyten ähnliches UV-Spektrum ($\text{UV}_{\text{max}} = 287$ nm) und eine vergleichbare Löslichkeit auf. Direkt vor der HPLC-Analyse wurde den Proben 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hesperetin (Endkonzentration) zugesetzt. Zu Beginn der Analysen wurde eine reine Hesperetinlösung dreifach gemessen, das Verhältnis A (Naringenin)/A (Hesperetin) der Analysen wurde mit dem Mittelwert der Referenzfläche multipliziert.

3.2.3.6 Verhalten weiterer Naringeninderivate

Um zu ermitteln, wie sich spezielle Einzelsubstanzen unter den Hydrolysebedingungen der Methode verhalten, wurden das Chalkonglucosid Isosalipurposid, sowie die cumarylisierten Derivate einzeln hydrolysiert und optisch mittels DAD Detektion auf Umsetzung zu Naringenin (N) und Bildung unerwünschter Nebenprodukte untersucht.

Zunächst wurde Isosalipurposid hydrolysiert. Es wurden Chromatogramme vor und nach der Hydrolyse bei 289 nm (UV_{max} Naringenin) und 368 nm (UV_{max} Isosalipurposid) aufgenommen. Wie in Abb. 3.36 zu sehen, ist nach der Hydrolyse kein Isosalipurposid mehr vorzufinden, jedoch ist der Naringeninpeak deutlich angestiegen. Es findet somit unter den gegebenen Bedingungen ein Ringschluss vom Naringeninchalkon zum Naringenin statt und Isosalipurposid geht als Naringenin in die Bestimmung mit ein.

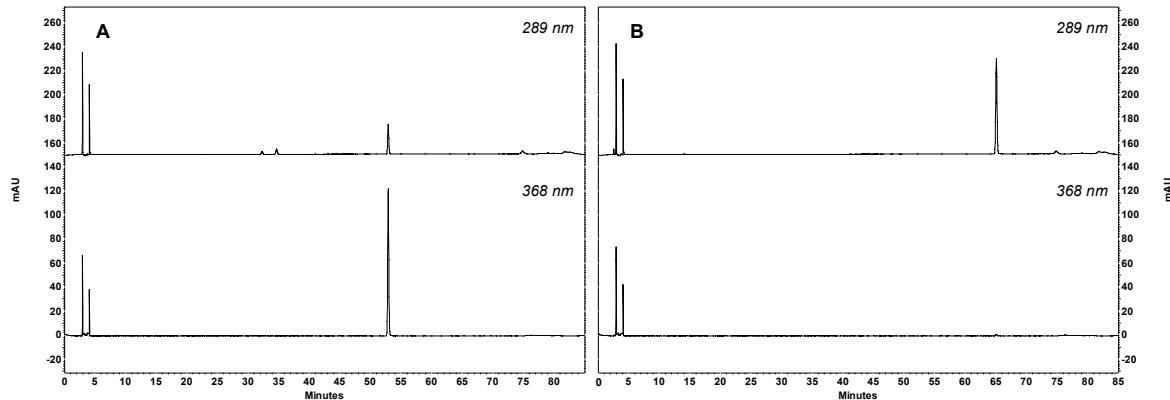


Abb. 3.36 Isosalipurposid vor (A) und nach (B) Hydrolyse (Methode N1). oben: 289 nm (Absorptionsmaximum Naringenin), unten: 368 nm (Absorptionsmaximum Isosalipurposid).

Weiterhin wurden die cumarylisierten Naringeninderivate 6"-*O-trans-p-Cumaroyl-isosalipurposid*, 6"-*trans-p-Cumaroyl-(2R)-naringenin-5-O-β-D-glucosid* und 6"-*trans-p-Cumaroyl-(2S)-naringenin-5-O-β-D-glucosid* (je ca. $c_0 = 0,2 \text{ mg/ml}$), zur Kontrolle wurde *trans-p-Cumarsäure* betrachtet. Wie in Abb. 3.37 zu sehen ist, war bei allen Naringeninderivaten nach der Hydrolyse ein deutlicher Naringeninpeak erkennbar. Jedoch wurden ebenfalls weitere Peaks detektiert ($R_t \approx 15-25 \text{ min}$ und $R_t \approx 60 \text{ min}$), wobei der Peak bei $R_t \approx 60 \text{ min}$ durch eine Zersetzung der *trans-p-Cumarsäure* bedingt zu sein schien. Auffallend war ebenfalls, dass die Chromatogramme aller drei cumarylisierten Derivate ein fast identisches Peakspektrum vorwiesen. Es deutete darauf hin, dass die Hydrolyse dieser Derivate nicht quantitativ abläuft, könnte aber auch auf die Zersetzung von Cumarylglucosiden hindeuten, da sich das Peakspektrum von dem der

Zersetzung von reiner Cumarsäure unterscheidet. Es scheint jedoch zumindest ein Großteil der Substanzen als Naringenin bestimmbar. Auch Naringenin selbst wurde mit dieser Methode aufgearbeitet. Es waren keine Zersetzungprodukte erkennbar.

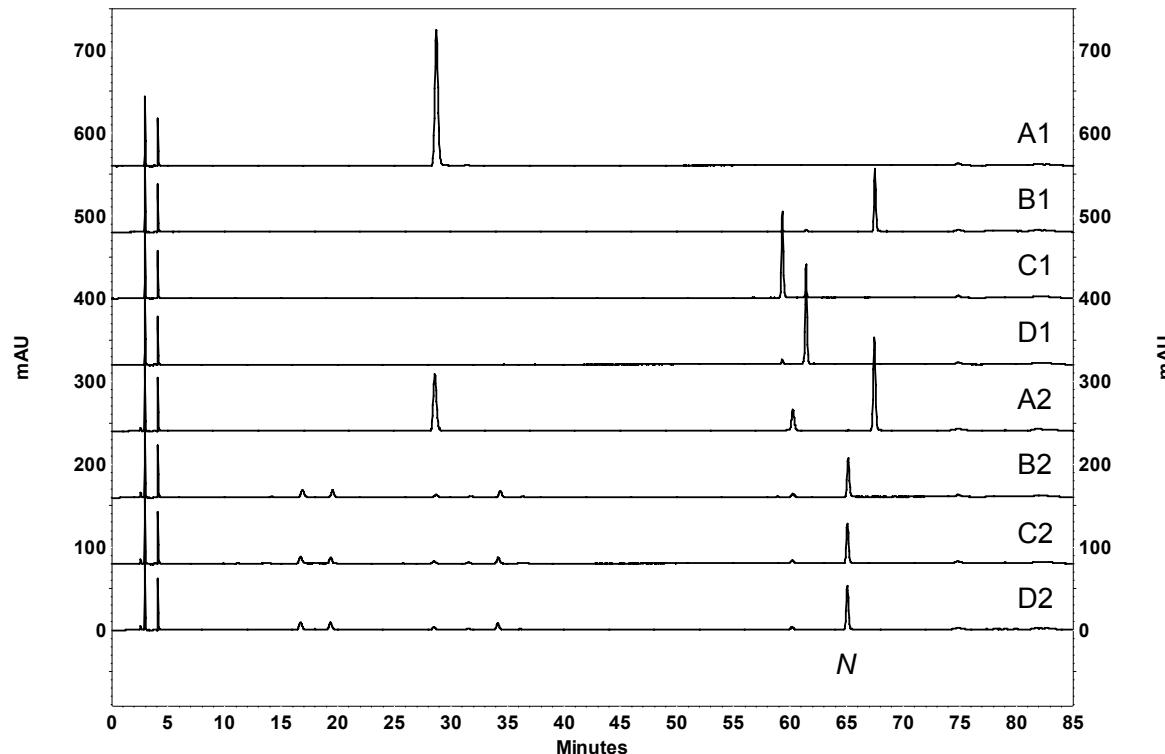


Abb. 3.37 Cumarylisierte Naringeninderivate vor (1) und nach (2) Hydrolyse mit TFA (Methode N1, 289 nm) A: *trans*-*p*-Cumarsäure; B: 6"-O-*trans*-*p*-Cumarylisosali-purposid; C: 6"-O-*trans*-*p*-Cumaryl-(2*R*)-naringenin-5-O- β -D-glucosid; D: 6"-O-*trans*-*p*-Cumaryl-(2*S*)-naringenin-5-O- β -D-glucosid; N: entstandenes Naringenin; 289 nm.

3.2.3.7 Kalibriergerade

Es wurde eine 9-Punkt Kalibriergerade des Analyten Naringenin mittels Methode N2 erstellt ($n=4$).

Analyt	Bereich	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß
Naringenin	0,5-70 µg/ml	$y = 411533x - 43372$	$R^2 = 0,9963$

3.2.4 Validierungsparameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Schritte hinsichtlich einer Validierung unternommen. Um die Methode z. B. im Europäischen Arzneibuch anzuwenden, sind

jedoch weitergehende Schritte und genauere Untersuchungen bezüglich der Richtigkeit, Robustheit, Laborpräzision usw. durchzuführen.

3.2.4.1 Präzision

Intraday precision: Drei Proben (STW 33-1, 5 mg/ml) wurden parallel innerhalb eines Tages aufgearbeitet (Tab. 3.14).

Interday precision: Die Aufarbeitung von sechs Proben (STW 33-1, 5 mg/ml) erfolgte an sechs unterschiedlichen Tagen (Tab. 3.14).

Tab. 3.14 Intraday und interday precision.

Probe	Gehalt Naringenin [%]	
	interday precision	intraday precision
1	8,16	9,27
2	8,70	8,64
3	8,30	8,92
4	8,43	-
5	8,53	-
6	8,94	-
Mittelwert	8,51	8,94
<i>Standardabweichung</i>	0,28	0,31
<i>Variationskoeffizient [%]</i>	3,33	3,49

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Mittelwerte bzw. der Varianzen der Versuchsreihe innerhalb eines Tages und der innerhalb verschiedenen Tagen festgestellt ($p < 0.05$).

Injektionspräzision

Eine Probe (Einwaage 5,107 mg/ml) wurde aufgearbeitet und sechsfach injiziert. Der Variationskoeffizient betrug 0,28% (Tab. 3.15).

3.2.4.2 Stabilität der Probe

Drei Proben wurden analysiert, nach 8 Stunden wurden die Proben abermals vermessen. Der Mittelwert des ermittelten Naringenins in der Probe betrug $17,89 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{ml}$ und nach dem Zeitraum $17,91 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{ml}$. Somit sind keine statistisch signifikanten

Unterschiede festzustellen (t-Test, $p < 0.05$). Die Probe ist über einen Zeitraum von mindestens acht Stunden stabil.

Tab. 3.15 Injektionspräzision (n=6).

Probe	Peakfläche Naringenin (mAU)
1	7773848
2	7731769
3	7784691
4	7752853
5	7782511
6	7746256
Mittelwert	7761988
<i>Standardabweichung</i>	21547
<i>Variationskoeffizient [%]</i>	0,28

3.2.4.3 Spezifität

Die Spezifität wurde anhand des UV-Spektrums des Analyten in der aufgearbeiteten Probe bestimmt. Hierzu wurde die Reinheit (*total peak purity*) des Naringeninpeaks mittels der HPLC Software EZ EliteLaChrom berechnet. Sie betrug $96,7 \pm 1,6\%$ ($n=10$).

3.2.4.4 Linearität

Siehe hierzu die Ermittlung der Einwaage (3.2.3.4). Da es sich bei den untersuchten Proben um einen Trockenextrakt, also eine biologische Probe mit einer Vielzahl an Komponenten handelt, sind bei der Bestimmung der Linearität Matrixeffekte nicht zu unterschätzen. Auch nimmt die Aktivität der β -Glucosidase ab einer bestimmten Extraktkonzentration ab. Durch die Voruntersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung in einem Konzentrationsbereich von 5-10 mg/ml STW 33-I Ausgangslösung (c_0) in einer linearen Beziehung stehen.

3.2.4.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Für die Ermittlung der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze wurde das Signal/Rausch-Verhältnis im Chromatogramm des reinen Analyten (vier Konzentrationen im Bereich von 0,09-0,73, $n=3$) betrachtet. Um die Anwesenheit eines Analyten eindeutig nachweisen zu können, wird ein Signal/Rausch Verhältnis von 3:1 empfohlen, für die Quantifizierung ein

Verhältnis von 9:1 [Kromidas 1999]. Somit betrug die Detektionsgrenze (*limit of detection*, LOD): 0,18 µg/ml und die Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ): 0,51 µg/ml, bei einem Injektionsvolumen von jeweils 30 µl.

3.2.4.6 Robustheit

Siehe hierzu die Ermittlung der Hydrolysedauer (3.2.3.3) und die Ermittlung der Einwaage (3.2.3.4). Eine Hydrolysedauer von 20-60 min scheint keinen Einfluss auf die Bildung des Naringenins auszuüben. Auch konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Einwaage $c_0 = 5 \text{ mg/ml}$ und 10 mg/ml festgestellt werden.

3.2.4.7 Richtigkeit

Wiederfindung

Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurden Proben mit den Einzelsubstanzen Naringenin-7-O-β-D-glucosid und (2R/2S)-Naringenin-5-O-β-D glucosid aufgestockt und die Wiederfindung berechnet.

Probenvorbereitung

Hierzu wurde eine Probenausgangslösung STW 33-I mit doppelter Ausgangskonzentration (10 mg/ml) hergestellt. 0,5 ml dieser Lösung wurde mit 0,5 ml der jeweiligen Standardlösung gemischt und anschließend 1,0 ml 11,5%ige TFA zugegeben. Eine Probe wurde mit reinem Lösungsmittel gemischt, um einen Grundwert zu erhalten. Die Referenzlösungen wurden einzeln hergestellt und jede Probenlösung jeweils nur mit einem Flavanonglucosid aufgestockt. Im Falle des Naringenin-5-O-glucosids wurde eine Konzentration verwendet, die ca. 40% der im Extrakt enthaltenen Konzentration entsprach, für Naringenin-7-O-glucosid eine Konzentration entsprechend 80%. Dies war notwendig, um Unterschiede im resultierenden Naringeninpeak detektieren zu können, da durch Hydrolyse mehrerer Derivate eine relativ große Menge an Naringenin entsteht. Beide Standardlösungen wurden zudem 1:1 verdünnt und ebenfalls in oben beschriebener Weise zugemischt, somit erfolgte eine Aufstockung von Naringenin-5-O-glucosid um ca. 40 und 20%, von Naringenin-7-O-glucosid um ca. 80 und 40% des Ausgangswertes. Zusätzlich wurden die Standardlösungen mit reinem Lösungsmittel versetzt und analysiert.

Berechnung

Zur Berechnung der Wiederfindung der reinen Standards (ohne Matrix) wurde die Ausgangskonzentration c_0 der Naringeninglucoside auf ihre theoretische Konzentration im HPLC-Vial umgerechnet. Anschließend wurde über die molare Masse von Naringenin (272,3 g/mol) bzw. Naringeninglucosid (434,4 g/mol) die zu erwartete Konzentration an Naringenin im Analysenergebnis bestimmt. Diese wurde mit der durch die Analyse tatsächlich bestimmten Konzentration (ermittelt über die Kalibriergerade) prozentual in Bezug gesetzt. Es handelte sich um dieselben Lösungen, die auch den Extraktproben zugesetzt wurden.

Für die Berechnung der Wiederfindung im Gesamtextrakt wurde zunächst die tatsächliche Naringeninkonzentration im HPLC-Vial der Probe ohne Referenzzusatz durch HPLC-Analyse und Berechnung mittels der Kalibriergeraden bestimmt. Dieser Wert diente als Grundwert. Da die Extraktlösungen in den Proben einer Versuchsreihe aus einer Gesamtanfangslösung hergestellt wurden, waren verschiedene Einflüsse z. B. Wägefehler und Temperaturunterschiede im Labor eliminiert. Es folgte eine Addition der errechneten, zu erwartenden Naringeninkonzentrationen der zugesetzten Standards (siehe oben) zu diesem Basalwert, die Summe diente als theoretisch zu erwartender Wert. Anschließend wurden die Proben mit zugesetzten Flavanonglucosiden analysiert und anhand der Kalibriergerade die Naringeninkonzentration berechnet. Wieder wurden die tatsächlich gemessenen Konzentrationen im HPLC-Vial und die theoretische Konzentration zueinander prozentual in Bezug gesetzt.

Ergebnis

Die einzeln bestimmten Naringeninglucoside weisen eine Wiederfindungsrate von 94,0 bis 102,5% auf (Tab. 3.16). Somit lassen sich die Naringeninderivate in reinem Lösungsmittel durch die Methode als Naringenin richtig bestimmen.

Kritischer sollten die Werte der Additionsmethode gesehen werden. Die Fläche des Naringeninpeaks erfuhr durch die zugesetzte Menge an Flavanonglucosiden im Endeffekt eine Erhöhung um ca. 12,5 und 25% des Basalwertes (Tab. 3.17). Für einen sicheren Beweis der Richtigkeit müssten die Wiederfindungsraten jedoch noch höher liegen. Die Wiederfindung war lediglich bei Zusatz von 40% Naringenin-7-O-glucosid zufriedenstellend. Die niedrigeren Werte der anderen Experimente sind wahrscheinlich auf Schwankungen des Basalwertes zurückzuführen, welche während der Experimente beobachtet werden konnten. Diese waren möglicherweise durch die Aufarbeitung und die

durch das Zumischen benötigten zusätzlichen Arbeitsschritte bedingt, was die zumeist hohen Standardabweichungen im Gegensatz zu den Präzisionsversuchen erklärt. Andererseits schien auch bei einigen Proben die Hydrolyse unvollständig abgelaufen zu sein, was am Alter der verwendeten Glucosidase gelegen haben könnte (Ergebnisse, bei denen die Naringeninkonzentrationen unterhalb der des Basalwertes lagen wurden ausgeschlossen). Um die Richtigkeit auch unter Matrixeinflüssen zu verifizieren, wurde zusätzlich auf alternative Methoden zurückgegriffen (siehe 0.).

Tab. 3.16 Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen.

Wiederfindungsrate Referenzsubstanzen [%]				
Flavanon	Naringenin-5-O-glucosid	Naringenin-7-O-glucosid		
40%	20%	80%	40%	
114,3	96,3	100,6	92,6	
97,3	103,8	98,7	104,0	
103,2	100,2	80,6	100,8	
95,1	89,9	96,2	100,4	
	97,9		89,9	
	101,6			
<i>Mittelwert ± SD</i>	<i>102,5 ± 8,6</i>	<i>98,3 ± 4,9</i>	<i>94,0 ± 9,1</i>	<i>97,5 ± 6,0</i>

Tab. 3.17 Wiederfindungsrate des Gesamtextraktes nach Addition der Standardlösungen.

Wiederfindungsrate STW 33-1 [%]				
zugesetztes Flavanon	Naringenin-5-O-glucosid	Naringenin-7-O-glucosid		
40%	20%	80%	40%	
105,0	98,9	95,3	103,3	
94,9	96,1	102,1	94,9	
94,2	91,1	104,1	100,3	
89,0	94,7	82,4	100,5	
		88,4		
<i>Mittelwert ± SD</i>	<i>95,8 ± 6,7</i>	<i>95,2 ± 3,3</i>	<i>94,5 ± 9,2</i>	<i>99,8 ± 3,5</i>

3.2.5 Gehalt von Fraktionen und Gesamtextrakt

Auch die Extraktfraktionen wurden auf ihren Gehalt an Naringeninderivaten untersucht. Es wurden jeweils ca. 2,5 mg/ml EA, und jeweils ca. 5 mg/ml BUT, EtOH und STW 33-I als Ausgangslösung verwendet ($n=3$). Der jeweilige prozentuale Gehalt wurde als Naringeninmonoglucosid berechnet (siehe Tab. 3.18).

3.2.5.1 Alternative Methode 1: HPLC-Einzelbestimmung

Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurde auf eine HPLC-Methode von Knuth und Mitarbeitern [2010] zurückgegriffen. Hierbei wurden die Flavonoide per HPLC aufgetrennt und anhand ihres UV-Spektrums identifiziert (Methode N3, Abb. 3.38). Alle relevanten Peaks wurden bei 282 nm integriert und addiert. Mittels dieser Gesamtpeakfläche wurde der Gehalt an Flavonoiden als Naringenin-7-O-glucosid über eine Kalibriergerade berechnet (siehe Tab. 3.18). Ca. 3-6 mg/ml wurden in 20%igem Methanol gelöst. Die Bestimmung erfolgte dreifach.

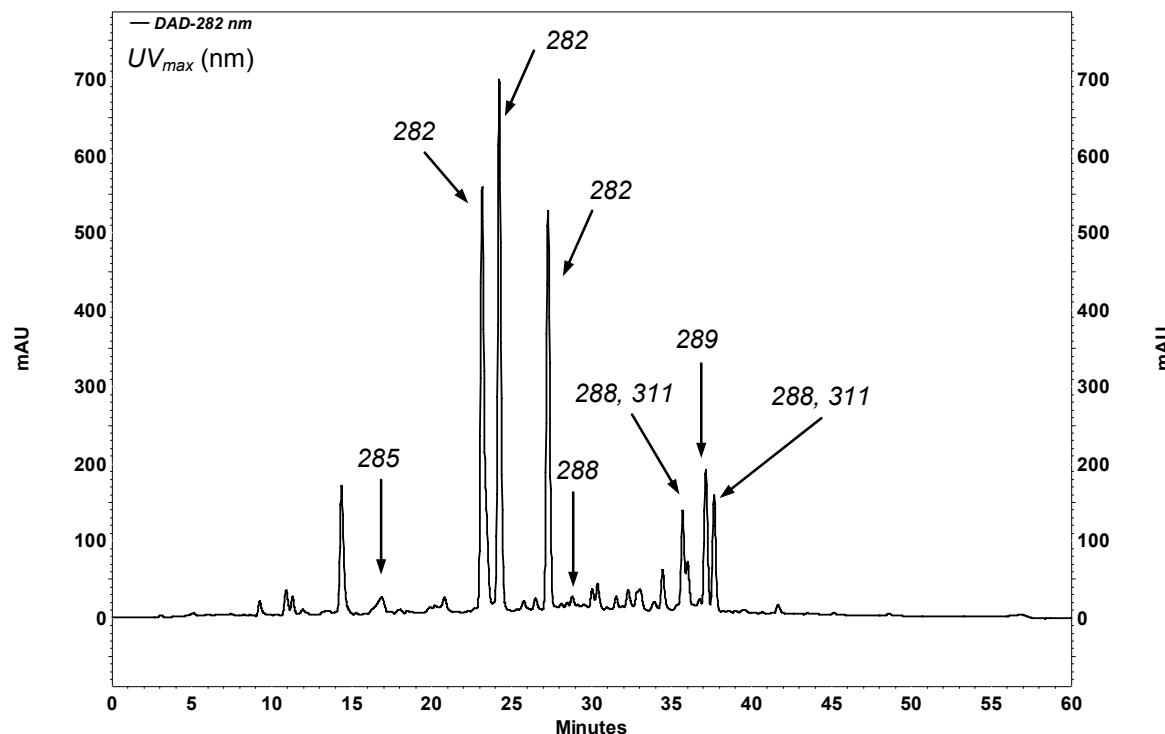


Abb. 3.38 HPLC-Chromatogramm von STW 33-I (Methode N3, 282 nm). Pfeile: Zur Auswertung herangezogene Peakflächen mit den UV-Maxima der betreffenden Substanzen. $c_0 = 3,08 \text{ mg/ml}$

Kalibriergerade

Es wurde eine 5-Punkt Kalibriergerade des Analyten Naringenin-7-O-glucosid mittels Methode N3 erstellt ($n=3$).

Analyt	Bereich	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß
Naringenin-7-O-glucosid	8,2-410 µg/ml	$y = 26073x + 1171$	$R^2 = 0,9990$

3.2.5.2 Alternative Methode 2: Konventionsmethode (Ph. Eur.)

Im Rahmen der Extraktcharakterisierung mittels Konventionsmethoden des Europäischen Arzneibuchs wurde auch der Flavonoidgehalt des Extraktes bzw. der einzelnen Fraktionen nach der Monographie Weißdornblätter mit Blüten-Trockenextrakt mit Borsäure-Oxalsäure-Reagenz bestimmt (siehe 2.2.3.3, S. 27 und Tab. 3.18).

3.2.5.3 Alternative Methode 3: Restphenolbestimmung

Diese Methode wurde im Rahmen der Extraktcharakterisierung durchgeführt (siehe 2.2.3.2, S. 26 und 3.1.4.3, S. 81 bzw. Tab. 3.18).

3.2.5.4 Vergleich der Ergebnisse

Um die Richtigkeit der entwickelten Methode zu überprüfen, wurden alternative Methoden angewendet, um den Gehalt an Flavonoiden bzw. Naringenoglucosiden sowohl im Gesamtextrakt als auch in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen (Tab. 3.18). Da Naringeninderivate die Hauptflavonoide des Extraktes darstellen, sollten die Gehalte der verschiedenen Bestimmungen in ähnlichen Größenbereichen liegen. Zunächst soll die alternative HPLC-Methode betrachtet werden. Die ermittelten Gehalte liegen in derselben Größenordnung wie die Gehalte bestimmt durch die neu entwickelte Methode. Unterschiede sind jedoch im Gesamtgehalt, der EtOH-Faktion und vor allem in der BUT-Faktion zu finden. Peaks wurden aufgrund ihres Absorptionsspektrums identifiziert und die Flächen bei dem Absorptionsmaximum von Naringenin-7-O-glucosid (282 nm) integriert. Dabei wurden die spezifischen Absorptionsmaxima der einzelnen Flavonoide nicht berücksichtigt, was vor allem bei den cumaroylierten Derivaten wahrscheinlich zu Verzerrungen führt. Auch wurden Substanzen eingeschlossen, die bei der entwickelten Bestimmung von Naringeninderivaten nicht erfasst werden. Die gute Übereinstimmung der Gehalte der Ethylacetatfraktion ist plausibel, da hauptsächlich Naringeninderivate in

dieser Fraktion enthalten sind und somit die durch Begleitsubstanzen verursachten Unterschiede verhältnismäßig niedrig ausfallen dürften.

Die Flavonoidgehalte von Extrakt und Fraktionen wurden auch durch Komplexbildung mit Borsäure-Oxalsäure-Reagenz nach einer Arzneibuchmethode (Weißdornblätter mit Blüten-Trockenextrakt Ph. Eur.) bestimmt. Die Werte fielen jedoch um ca. das Zehnfache niedriger aus (EtOH: keine Absorption im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes), als die durch die anderen Methoden ermittelten. Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Borsäure-Oxalsäurekomplexe mit den enthaltenen Flavanonen aufgrund der fehlenden Doppelbindung in 2,3-Position ein hypsochrom verschobenes UV-Maximum aufweisen, wurde die Einzelsubstanz Naringenin nach selbiger Methode bestimmt. Die Annahme konnte bestätigt werden, da das UV-Maximum des Komplexes bei 382 nm lag. Somit ist die Methode des Arzneibuches (Vermessung bei 410 nm und anschließende Berechnung mit dem spezifischen Absorptionskoeffizienten des Hyperosids) nicht anwendbar. Überlegungen hinsichtlich einer Anpassung der Messwellenlänge wurden verworfen, da das Chalkoglucosid Isosalipurposid (ohne Komplexierung) ein Absorptionsmaximum in diesem Bereich aufweist (368 nm). Zudem ist zweifelhaft, ob Naringenin-5-O-glucoside der Komplexierung überhaupt zugänglich sind. Die Sicherstellung der Richtigkeit einer angepassten Methode hätte eingehende Untersuchungen zur Komplexierung von Einzelsubstanzen nach sich gezogen.

Bemerkenswert ist allerdings die gute Übereinstimmung der ermittelten Gehalte durch die entwickelte Methode mit der Restphenolgehaltsbestimmung (bis auf die EtOH-Fraktion), die im Rahmen der Gerbstoffbestimmung durchgeführt wurde (siehe 2.2.3.2, S. 26, 3.1.4.3, S. 81 und 3.1.4.5, S. 81). Der besseren Vergleichbarkeit wegen sind die Werte nochmals in Tab. 3.18 aufgeführt. Zur Bestimmung des Restphenolgehaltes wurden die Proben nach Fällung der Gerbstoffe durch Hautpulver mit Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt. Dabei wird die im Reagenz enthaltene Wolframato- bzw. Molybdatophosphorsäure durch das Reduktionspotential der enthaltenen Polyphenole zu „Wolframblau“ bzw. „Molybdänblau“ reduziert. Das Ausmaß dieses Farbumschlages wurde photometrisch bestimmt und anhand eines spezifischen Absorptionskoeffizienten in den Gehalt umgerechnet. Für diese Bestimmung wurde der von Glasl [1983] vorgeschlagene Koeffizient für die Bestimmung von Ratanhiawurzel verwendet, da diese Droge, wie die Weidenrinde, einen hohen Catechingerbstoffgehalt aufweist (verwendeter $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: 1000, $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ (Catechin): 1006 [Glasl 1983]). Die Ergebnisse könnten dazu verleiten, die viel schnellere und praktikablere Methode der Restphenolbestimmung als Methode zur Flavonoidbestimmung in Weidenrindenextrakten zu postulieren. Allerdings müssen hinsichtlich der Restphenolbestimmung einige Punkte beachtet werden. Zunächst handelt

es sich bei der Bestimmung um eine indirekte Methode bei der das antioxidative Potential von Substanzen ermittelt wird. Dies wird an den stark unterschiedlichen Ergebnissen der Gehaltsbestimmungen der EtOH-Fraktion deutlich. Offensichtlich sind andere Substanzen als Naringeninderivate für den höheren Gehalt bei der Restphenolbestimmung verantwortlich. Jedoch kann daraus nicht geschlossen werden, dass es sich dabei nicht doch um Flavonoide handelt. Unklar ist auch, ob die verwendete Messwellenlänge dem Absorptionsmaximum der entstandenen Mischoxide entspricht. Für Catechin z. B. konnte Glasl zeigen, dass die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich ausfällt. Ebenfalls zu bedenken ist, dass der verwendete spezifische Absorptionskoeffizient eventuell nicht im richtigen Größenbereich liegt. Eine weitere Frage betrifft die Flavanonnenkomponenten im Extrakt: Eriodictyol und seine Glucoside werden höchstwahrscheinlich miterfasst, also müsste der Gehalt im Endeffekt über demjenigen liegen, der mit der entwickelten Methode bestimmt wurde, die lediglich Naringenin und seine Derivate erfasst. Das Verhalten der Chalkone und der cumaroylierten Derivate in diesem Rahmen ist ebenfalls unklar. Nichtsdestotrotz ist die Übereinstimmung der Ergebnisse (ausgenommen die der EtOH-Fraktion) nicht zu übersehen und möglicherweise vielversprechend. Deshalb sollten eingehende Untersuchungen in dieser Richtung unternommen werden.

Tab. 3.18 Flavonoidgehaltsbestimmung.

A: entwickelte Methode: Hydrolyse und HPLC-Bestimmung als Naringenin, Berechnung als Naringeninmonoglucosid; **B:** HPLC-Einzelbestimmung als Naringenin-7-O-glucosid; **C:** Konventionalmethode Ph. Eur. (Weißdornblätter mit Blüten-Trockenextrakt), Berechnung als Hyperosid; **D:** Gerbstoffbestimmung nach der abgewandelten Hautpulvermethode, Bestimmung der „Restphenole“.

Gehalt [%] Flavonoide				
STW 33-1	EA	BUT	EtOH	
A $13,6 \pm 0,5$	$34,7 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,7$		$0,5 \pm 0,0$
B $16,0 \pm 0,3$	$35,3 \pm 1,0$	$16,4 \pm 0,4$		$0,1 \pm 0,1$
C $1,3 \pm 0,0$	$3,5 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,3$		-*
D $12,9 \pm 0,1$	$33,0 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,2$		$4,0 \pm 0,0$

*unter dem Detektionslimit.

3.2.6 Zusammenfassung und Diskussion

Da die Wirksamkeit von Weidenrinden nach neuesten Untersuchungen nicht nur vom Salicin gehalt abhängt, sondern auch eine Beteiligung von Polyphenolen vermutet wird, wurde eine Gehaltsbestimmung für die Weidenrindenflavonoide bzw. deren Hauptvertreter, die Naringeninderivate entwickelt. Bei der Methode werden zunächst die Naringenin-5-O-glucoside als auch acylierte Derivate mit TFA hydrolysiert, um anschließend die schwer hydrolysierbaren Naringenin-7-O-glucoside mit β -Glucosidase zu deglucosylieren. Anschließend erfolgt eine HPLC-Bestimmung des entstandenen Naringenins.

Im Zuge der Säurehydrolyse wird auch das Chalkoglucosid Isosalipurposid zu Naringenin umgesetzt. Cumarylisierte Derivate werden ebenfalls zu Naringenin hydrolysiert, dies scheint jedoch nicht quantitativ zu verlaufen. Die entwickelte Methode wurde anhand verschiedener Parameter validiert. Die Variationskoeffizienten der Intraday- und Interday-Präzision lagen unter 5%, die Proben waren nach Aufarbeitung mehrere Stunden stabil. Die Spezifität des Naringenin-Peaks bei der HPLC-Bestimmung lag über 95%, LOD und LOQ wurden ebenfalls ermittelt. Die Methode ist hinsichtlich einer Hydrolysedauer von 20-60 min robust. Den kritischsten Parameter stellt bei dieser Methode der Einsatz der β -Glucosidase dar. Ihre Aktivität wird durch den pH-Wert, die Ionenkonzentration des verwendeten Puffers und die Stoffmenge der Probe stark beeinflusst. Deshalb sollte vor ihrem Zusatz unbedingt eine pH-Kontrolle erfolgen. Auch ein Monitoring der Hydrolyse mithilfe der zweiten HPLC-Methode scheint sinnvoll. Weiterhin ist eine Erniedrigung der Extraktanfangskonzentration zu überlegen. Da der verwendete Extrakt einen sehr hohen Gehalt an Naringeninderivaten enthält, wurde eine höhere Ausgangskonzentration gewählt. Dies hatte den Hintergrund, dass die Methode auch auf andere Extrakte mit weitaus weniger Naringeninderivaten anwendbar sein sollte. So sind nachweisbare Konzentrationen an Naringenin in jedem Fall zu erhalten, ohne eine Anpassung der kritischen Glucosidase-bedingten Parameter vornehmen zu müssen.

Die Wiederfindung von Referenzsubstanzen in matrixfreien Proben war valide, jedoch wurden diese in sehr niedrigen Konzentrationen untersucht. Die Wiederfindung von Naringenoglucosiden aus aufgestockten Proben war unzureichend, jedoch könnten Ursachen hierfür in der Methodik der Probenaufarbeitung zu finden sein. Um die Richtigkeit auf anderem Wege zu verifizieren, wurden weitere Methoden zur Gehaltsbestimmung angewendet und die Ergebnisse verglichen. Dabei lagen die Gehalte in vergleichbaren Größenordnungen. Insgesamt kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich die entwickelte Methode eignet, den Gesamtnaringengehalt in

Weidenpräparaten vergleichend zu bestimmen. Weitere Untersuchungen bezüglich des Verhaltens der β -Glucosidase, sowie zur Routineanwendung sind jedoch nötig. Auffallend war auch die größtenteils sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Restphenolbestimmung im Rahmen der Gerbstoffquantifizierung. Eine mögliche Eignung dieser Methode zur Flavonoidbestimmung sollte ebenfalls in Erwägung gezogen und eingehend überprüft werden.

3.3 Zellbiologische Untersuchungen

3.3.1 Entzündungen und die Bedeutung von ICAM-1 auf Endothelzellen

Entzündungen sind durch die Kardinalsymptome Röte (rubor), Wärme (calor), Schwellung (tumor) und Schmerz (dolor) gekennzeichnet. Diese Symptome werden u. a. durch Cytokinfreisetzung von Makrophagen und Mastzellen eingeleitet. TNF- α -vermittelt weiten sich betroffene kleine Blutgefäße im umgebenden Gewebe und der Blutfluss wird verlangsamt. Die entzündete Stelle rötet und erwärmt sich. [Schütt und Bröker 2011]

Die Rekrutierung von Leukozyten – hauptsächlich handelt es sich hierbei um neutrophile Granulozyten – in die betroffenen Gewebe besteht aus einer mehrstufigen Kaskadenreaktion, in deren Folge Endothelzellen aktiviert und für Leukozyten im Bereich der postkapillaren Venen durchlässig werden [Egger 2005]. Die Regulation dieser Schritte erfolgt durch blutflussbedingte Scherkräfte, apikale Chemokine und induzierbare Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen [Cinamon et al. 2001, Yang 2005].

Den Ablauf des Durchtritts von Leukozyten durch das Endothel bezeichnet man als homing. Man unterscheidet vier Phasen: Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Diapedese [Schütt und Bröker 2011]. Der Kontakt eines Teils der im Blut zirkulierenden Zellen mit dem Endothel kommt durch den langsamen Marginalstrom des Blutes zustande (margination). Zunächst gehen die Granulozyten mit den Endothelzellen Selektin-vermittelt lockere Bindungen ein, die durch den Blutfluss wieder gelöst und an anderer Stelle neu geknüpft werden. Dies passiert sehr schnell und es entsteht der Eindruck einer Rollbewegung der Zellen entlang des Endothels. Durch Cytokin-Aktivierung der Leukozyten verlangsamt sich die Bewegung und kommt schlussendlich zum Stillstand, da eine feste Oberflächenbindung entsteht. Die Adhäsion wird hauptsächlich durch β_2 -Integrine seitens der Granulozyten und Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie auf der Oberfläche von Endothelzellen vermittelt. Zu dieser Familie zählen u. a. die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und -2 (intercellular adhesion molecule-1 bzw. -2), VCAMs (vascular adhesion molecules) und PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule). ICAM-2 wird dabei konstitutiv exprimiert, um die Emigration von Leukozyten ins Gewebe außerhalb von Entzündungsvorgängen zu vermitteln, während zur ICAM-1-Expression Transkriptionsreize notwendig sind. Solche Reize werden z. B. durch die Cytokine IL-1 oder TNF- α vermittelt. Nach Stimulation wird die ICAM-1 Expression des Endothels gesteigert, woraufhin eine höhere Anzahl Granulozyten auf seiner Oberfläche anhaftet. Um diesen Effekt zu erreichen, müssen jedoch die Mediatoren über mehrere

Stunden und in höherer Konzentration auf die Zellen einwirken. Der Körper verhindert so eine überschießende Immunantwort durch geringfügige, kurzzeitige Stimuli. VCAMs sind den ICAMs vergleichbar, jedoch bevorzugen sie Integrine des β_1 -Typs, welche vorwiegend auf Monozyten bzw. lymphatischen Zellen zu finden sind. [Egger 2005]

Als letzter Schritt erfolgt die Diapedese durch das Endothel in das Gewebe. Dies kann para- oder transzellulär erfolgen. Die parazelluläre Route beinhaltet die Beteiligung von Cadherinen, PECAM-1 und anderen junctionalen Adhäsionsmolekülen, während bei der transzellulären Route wiederum ICAM-1 eine große Rolle spielt [Ley et al. 2007]. Die Leukozyten migrieren zufällig oder chemotaktisch gesteuert zum Entzündungsherd ins Gewebe, welches hierdurch anschwillt. Granulozyten und Makrophagen werden dabei durch Cytokine zu erhöhten Aktivitäten wie Phagozytose und zur Freisetzung von ROS (reactive oxygen species), lysosomalen Enzymen, Entzündungsmediatoren und Cytokinen angeregt, um das Schadmaterial zu bekämpfen. [Egger 2005]

Gestörte Immunreaktionen sind Ursache einer Vielzahl von chronisch entzündlichen Erkrankungen. Bei der chronischen Polyarthritis werden Immunprozesse in Gang gesetzt, in deren Folge überaktivierte Phagozyten den Gelenkknorpel durch die Freisetzung ihrer Wirkstoffe schädigen. Cytokine wie IL-1 und TNF- α , die von Makrophagen abgegeben werden, stimulieren Chondrozyten und Osteoklasten zum Knorpel- und Knochenabbau. Heftige entzündliche Reaktionen lösen z. B. bei der Gicht im Gelenkbereich abgelagerte Uratkristalle aus, wobei hauptsächlich überaktivierte neutrophile Granulozyten den Gelenkknorpel zerstören [Egger 2005].

3.3.1.1 ICAM-1- und MTT-Assay

ICAM-1-Assay

Die in den 1990er Jahren etablierte Zelllinie HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) [Ades et al. 1992], besteht aus adhärent wachsenden Zellen. Sie bilden Monolayer und sind u. a. zur Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektinen fähig [Bouïs et al. 2001].

Bei dem von Dirsch und Mitarbeitern [2004] entwickelten und durch Çalış und Mitarbeiter [2008] hinsichtlich der Bestimmung von ICAM-1 modifizierten Assay handelt es sich um ein zelluläres Testsystem, in dem HMEC-1 durch Zugabe des Cytokins TNF- α zur Adhäsionsmolekül-Expression (u. a. ICAM-1) angeregt werden. Der zelluläre Signalweg führt hier hauptsächlich über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear Factor κ B). NF- κ B befindet sich in einem Komplex, gebunden an inhibitorische Proteine

(IkB), im Cytosol inaktiver Zellen. Durch die Ligation von TNF- α an seinen Rezeptor (TNFR2) werden Kinasen (IKK) aktiviert, die den Inhibitor IkB phosphorylieren, wodurch dieser vom NF- κ B-Komplex dissoziiert und proteolytisch abgebaut wird. Freier NF- κ B kann nun in den Nukleus diffundieren und an die DNA binden, um die Regulation der Transkription einer Vielzahl entzündungsrelevanter Gene hochzuregulieren. Letztendlich resultiert daraus u. a. eine Expressionserhöhung von ICAM-1 auf der Oberfläche des Endothels. [Malerich und Elston 2006, Schütt und Bröker 2011]

Das verwendete Testsystem dient als *in vitro* Modell der Unterdrückung eines krankhaft gesteigerten homings auf Ebene der Endothelzellen durch Betrachtung des Markerproteins ICAM-1. Die Testsubstanzen werden auf ihr Potential hin untersucht, eine gesteigerte Expression dieses Markers zu unterdrücken. Die Untersuchung erfolgt per Durchflusscytometrie mithilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen ICAM-1. Die Antikörper-markierten Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter: FSC-H) verkörpert ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen, das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter: SSC-H) für ihre Granularität. Nur Zellen, die eine anhand unbehandelter Zellen festgelegte Größe und Granularität aufweisen, werden gezählt. Die Anregung der Fluorochrome der auf den Zellen befindlichen Antikörper erfolgt per Laser und die Fluoreszenz-Intensität (FL1-H) wird ermittelt.

Die HMEC-1-Zellen wurden mit den Testlösungen 30 min vorinkubiert, um anschließend die ICAM-1-Expression durch Zugabe von TNF- α zu steigern. Die Aufarbeitung erfolgte nach 24 Stunden. Als Kontrollen wurde einerseits die basale ICAM-1-Expression völlig unbehandelter Zellen bestimmt, andererseits die Expression nach Zugabe von TNF- α und des Sesquiterpenlactons Parthenolid, welches als NF- κ B-Inhibitor die ICAM-1-Expression stark inhibiert [Hehner et al. 1999]. Als Bezugswert wurde die maximale ICAM-1-Expression, hervorgerufen durch die Behandlung der Zellen mit TNF- α ohne Zugabe von Testsubstanzen, herangezogen.

MTT-Assay

Um cytotoxische Effekte der im ICAM-1-Assay getesteten Extrakte auf HMECs zu eruieren, wurden MTT-Assays durchgeführt. Toxische Einflüsse der Testsubstanzen auf die Zellen führen im ICAM-1-Assay mit großer Wahrscheinlichkeit zu falsch-positiven Ergebnissen, da in diesem Fall eine gesteigerte ICAM-1-Expression infolge

schwindender Viabilität der Zellen nicht zustande kommt, jedoch als Unterdrückung infolge von antiinflammatorischem Potential gewertet würde.

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen Test nach Mosmann [1983]. Die Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blaues Formazan durch zelluläre Oxidoreduktasen dient hier als Maß für die Viabilität von Zellen (Abb. 3.39). Sie erfolgt vor allem durch aktive NAD(P)H-benötigende Enzyme des endoplasmatischen Retikulums und die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase vitaler Zellen [Berridge 1996]. Das gebildete, unlösliche Formazan wird dabei in der Zelle angereichert. Durch Behandlung mit Detergentien werden die Zellen lysiert und das Formazan in Lösung gebracht. Das Ausmaß dieser Umsetzung wird photometrisch bestimmt. Je mehr MTT umgesetzt wird, desto lebensfähiger sind die Zellen.

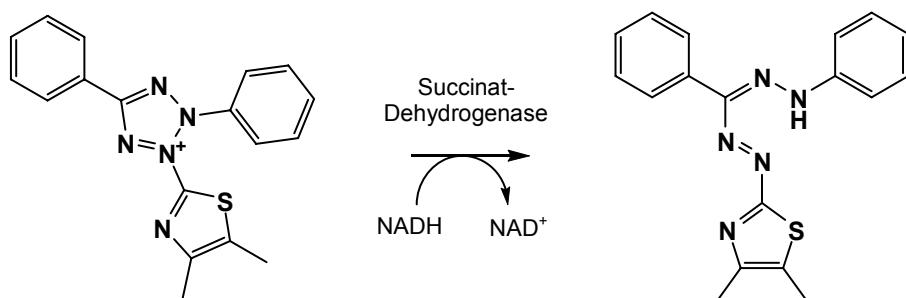


Abb. 3.39 Reduktion von gelbem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumsalz zu blauem Formazan.

Die Viabilität der HMEC-1-Zellen wurde nach 24-stündiger Behandlung mit den Testsubstanzen ermittelt und prozentual auf die Viabilität unbehandelter Zellen bezogen. Da es sich bei den Untersuchungslösungen meist um flavonoidhaltige Fraktionen bzw. Flavonoide als Reinsubstanzen handelte, die bekannterweise ein hohes Redoxpotential aufweisen, wurde darauf geachtet, direkte Interaktionen mit dem MTT-Reagenz zu vermeiden. Dazu wurde die Testlösung entfernt und die HMECs mit PBS gewaschen, bevor die Aufgabe von in Medium gelöstem MTT erfolgte [Bruggisser 2002].

3.3.1.2 Extrakt und Fraktionen

Zunächst wurde der Gesamtextrakt in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (50 µg/ml und 10 µg/ml) untersucht. In beiden Fällen konnte eine deutliche Hemmung der ICAM-1-Expression beobachtet werden. Der Extrakt hemmte in niedriger Konzentration die Expression um 31%, in höherer Konzentration wurde die Expression sogar um 59% unterdrückt (Abb. 3.40, Figur A, S. 108). Um die Aktivität des Weidenrindentrockenextraktes genauer zu bestimmen, wurden die Fraktionen der Flüssig-Flüssig-Verteilung (siehe 2.2.1.1, S. 18 und 3.1.1, S. 43) ebenfalls analysiert. Die Dosierung erfolgte anteilig der Massenverteilung im Gesamtextrakt, wobei bei der Berechnung der Verluste durch Entfernung der Hilfsstoffe sowie durch die Trocknung und Zentrifugation berücksichtigt wurden. Hier stellte sich heraus, dass die Ethanol- bzw. n-Butanolfraktion mit einer Expressionshemmung auf 82% bzw. 76% der maximalen Expression mäßig aktiv waren, während die H₂O-Fraktion kaum eine Hemmwirkung zeigte. Sehr beeindruckend stellte sich jedoch das Ergebnis der Ethylacetatfraktion dar, denn trotz der niedrigen eingesetzten Konzentration von 8 µg/ml wurde eine Hemmung um 57% bewirkt (Abb. 3.40, Figur A, S. 108).

Um diese Aktivität näher zu untersuchen, wurden die Unterfraktionen der Ethylacetatfraktion (EA1-EA6, siehe 3.1.2, S. 43), wiederum anteilig ihrer Masse am Gesamtextrakt, bestimmt. Während die Fraktionen EA 1-EA 3, EA 5 und EA 6 die maximale ICAM-1 Expression nur um bis zu 10% hemmten, wies die Fraktion EA 4 in der geringen Konzentration von 0,9 µg/ml eine beachtliche Hemmung um 37% auf (Abb. 3.40, Figur B, S. 108). In den getesteten Konzentrationen war bei keiner Fraktion Toxizität im MTT-Assay zu erkennen (Abb. 3.40, Figur C, S. 108). Somit konnte die Aktivität von STW 33-I größtenteils auf die EA 4 Fraktion zurückgeführt werden.

3.3.1.3 Einzelsubstanzen

Es wurden Einzelsubstanzen aus der Fraktion EA 4 isoliert (siehe 3.1.2, S. 43) und die prominentesten Inhaltsstoffe ebenfalls auf ihre Aktivität untersucht. Naringenin-5-O-β-D-glucosid, Naringenin-7-O-β-D-glucosid, Isosalipurposid, Eriodictyol-7-O-β-D-glucosid und Catechol wurden in verschiedenen Konzentrationen im ICAM-1-Assay getestet. Hierbei erwies sich Catechol als potenter Hemmstoff der ICAM-1-Expression (Abb. 3.40, oben), die anderen Substanzen zeigten in diesem Testsystem in den verwendeten Konzentrationen 10 µM und 100 µM keine Aktivität (die maximale Hemmung betrug 3,9 %). Auch hier war mittels MTT-Assay bei keinem der Inhaltsstoffe Toxizität in den

getesteten Konzentrationen zu erkennen (Abb. 3.41, unten, S. 109). Die *cis*-1,2-Cyclohexandiolderivate (**1**, **2**) zeigten ebenfalls keine antiinflammatorische Aktivität in diesem Testsystem.

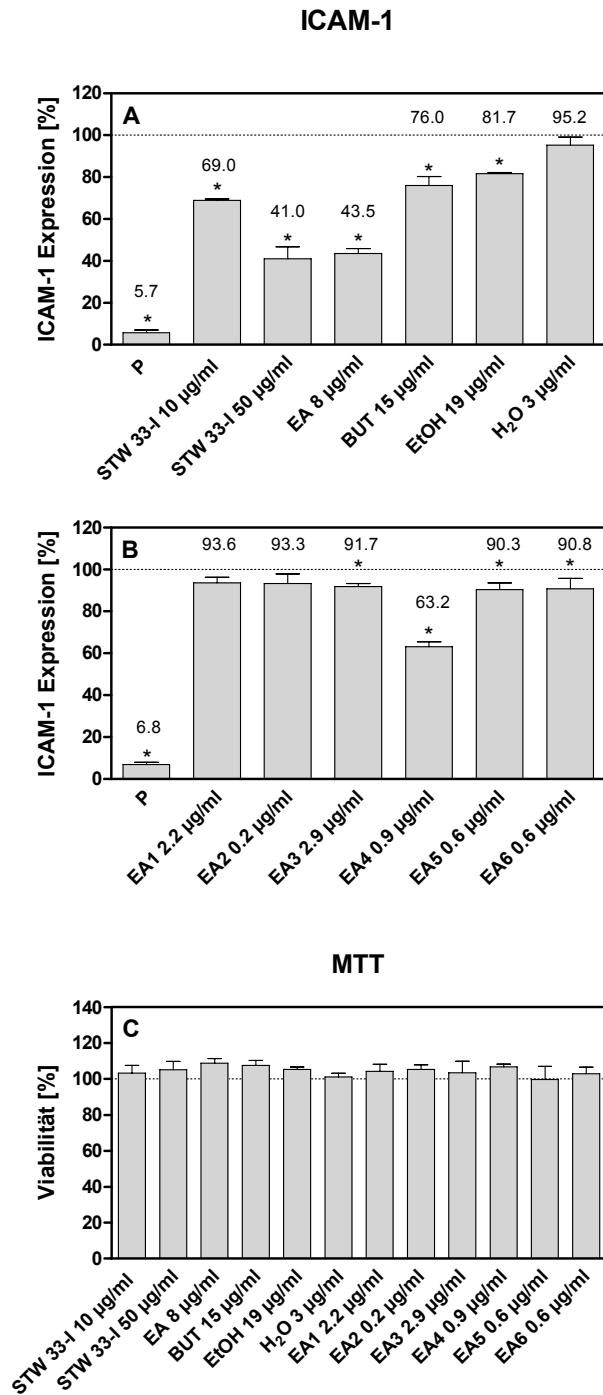


Abb. 3.40 ICAM-1 und MTT Assay von Extrakt und Fraktionen (HMEC-1).

A/B: ICAM-1 Assay. Mittelwert \pm SD, n=3 (Doppelbestimmung), Positivkontrolle: Parthenolid 10 μ M (P), Basalwert der unbehandelten Zellen: $3,2 \pm 0,6\%$. Die Fluoreszenzintensität der Zellen in Medium + TNF- α (10 nM) entspricht 100%, *p < 0,05. **C: MTT-Assay (Toxizitätskontrolle).** Mittelwert \pm SD, n=3 (Sechsfachbestimmung). Die Absorption der unbehandelten Zellen entspricht 100%; *p < 0,05.

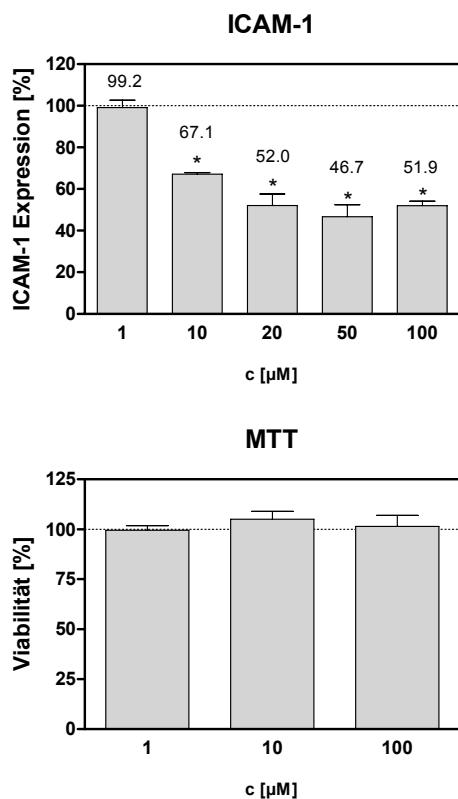


Abb. 3.41

ICAM-1 und MTT Assay von Catechol (HMEC-1). oben: **ICAM-1 Assay.** Mittelwert \pm SD, n=3 (Doppelbestimmung), Positivkontrolle: Parthenolid 10 μ M (P), Basalwert der unbehandelten Zellen: $3,2 \pm 0,6\%$. Die Fluoreszenzintensität der Zellen in Medium mit TNF- α (10 nM) entspricht 100%, *p < 0,05; unten: **MTT-Assay (Toxizitätskontrolle).** Mittelwerte \pm SD, n=3 (Sechsfachbestimmung). Die Absorption der unbehandelten Zellen entspricht 100%, *p < 0,05.

Da die getesteten Hauptinhaltsstoffe der Fraktion EA 4 größtenteils glucosidischer Natur waren, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ihre Inaktivität im ICAM-1-Assay auf zu hoher Polarität und somit auf fehlender passiver Diffusion durch die Plasmamembran und fehlender aktiver Transportsysteme beruhen. Deshalb wurden die korrespondierenden Aglyca, die in geringerem Maße ebenfalls im Extrakt vorhanden sind, untersucht. Da bei einigen der isolierten Flavonoide eine Catechol-Grundstruktur im B-Ring vorzufinden ist, wurden mögliche Zusammenhänge zwischen diesem Strukturmerkmal und einer Aktivität im ICAM-1 Assay untersucht. Zu diesem Zweck wurden zudem weitere, im Extrakt nicht enthaltene Aglyca getestet (Abb. 3.43 und Tab. 3.19). Zur Eliminierung falsch-positiver Ergebnisse wurden parallel MTT-Assays mit den jeweils höchsten im ICAM-1-Assay getesteten Substanzkonzentrationen durchgeführt. Es war keine Toxizität festzustellen. Die verwendeten Lösungsmittel wurden in ihrer Endkonzentration im Medium (EtOH 0,1%, bzw. DMSO 0,1%) ebenfalls im ICAM-1- und im MTT-Assay untersucht. Hier konnten keine signifikanten Einflüsse festgestellt werden.

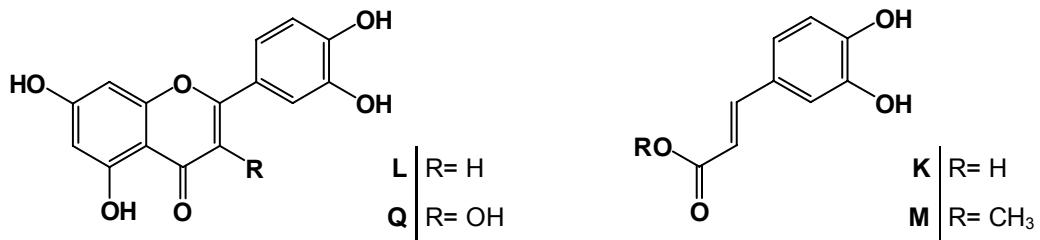


Abb. 3.42 Strukturformeln weiterer getesteter Einzelsubstanzen. L: Luteolin, Q: Quercetin, K: Kaffeesäure, M: Methylkaffeat.

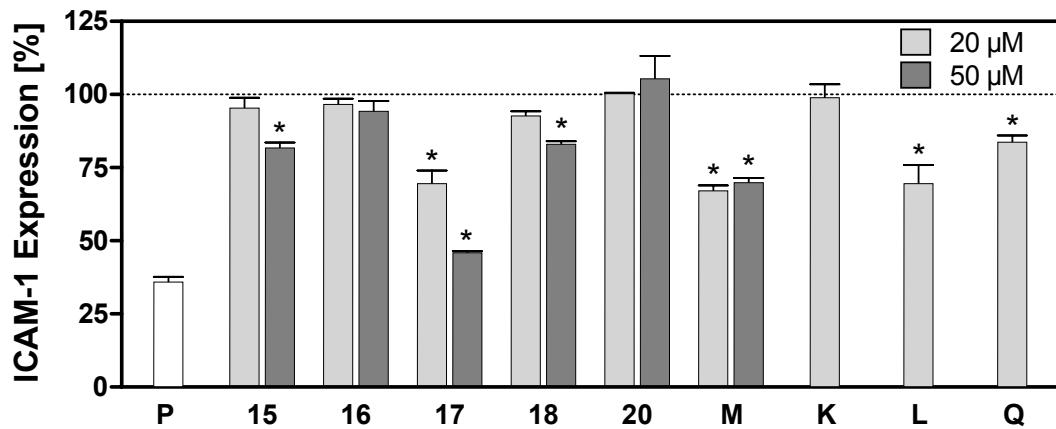


Abb. 3.43 ICAM-1-Assay der isolierten Einzelsubstanzen 15-18, 20 und weiterer Flavonoidaglyca (M, K, L, Q). HMEC-1, Mittelwert \pm SD, n=3 (Doppelbestimmung), Positivkontrolle: Parthenolid 10 μ M (P), Basalwert der unbehandelten Zellen: $3,2 \pm 0,6\%$. Die Fluoreszenzintensität der Zellen in Medium + TNF- α (10 nM) entspricht 100%, *p < 0,05.

Tab. 3.19 Werte der ICAM-1- und MTT-Bestimmung.

Verbindung	ICAM-1 Expression [%]		Viabilität [%]	
	20 μ M	50 μ M	20 μ M	50 μ M
Taxifolin (15)	95,4 \pm 6,1	81,7 \pm 3,2*	-	99,9 \pm 1,7
Dihydrokämpferol (16)	96,6 \pm 3,5	94,2 \pm 6,1	-	100,0 \pm 4,2
Eriodictyol (17)	69,5 \pm 0,6*	45,9 \pm 0,8*	-	95,2 \pm 6,2
Naringenin (18)	92,7 \pm 2,7	83,0 \pm 1,7*	-	102,2 \pm 8,1
Phelligrin A (20)	100,2 \pm 0,6	105,4 \pm 11,0	-	n. b.
Methylkaffeat (M)	67,0 \pm 3,3*	69,9 \pm 2,7*	-	101,6 \pm 2,8
Kaffeesäure (K)	98,9 \pm 4,5	-	99,6 \pm 1,6	-
Luteolin (L)	69,5 \pm 6,4*	-	101,7 \pm 3,7	-
Quercetin (Q)	83,7 \pm 2,3*	-	98,8 \pm 3,6	-

n. b.: aufgrund fehlender Aktivität nicht bestimmt

Neben Catechol besaß auch das Flavanon Eriodictyol (**17**) ein beträchtliches *in vitro* Hemmpotential. In höherer Konzentration konnte eine Hemmung auf 46% der maximalen Expression festgestellt werden. Naringenin (das korrespondierende Flavanon ohne Catecholstrukturelement im B-Ring) hingegen zeigte zwar in höherer Konzentration eine moderate Hemmung, diese fiel jedoch deutlich geringer aus als bei Eriodictyol. Auch bei den Flavanonolen konnte dieser Effekt in schwächerer Ausprägung in der eingesetzten Konzentration von 50 µM beobachtet werden. Hier fällt jedoch auf, dass sich die Hemmung insgesamt schwächer darstellte als beim korrespondierenden Flavanon, was auf die zusätzliche Hydroxygruppe in 3-Position zurückzuführen sein könnte. Die höhere Aktivität des Flavons Luteolin (**L**) im Gegensatz zum Flavonol Quercetin (**Q**), beide mit Catecholstruktur des B-Rings, bestätigen diese Vermutung. Aufgrund zytotoxischer Effekte konnten diese beiden Substanzen nur in geringerer Konzentration getestet werden, wobei hier relativ hohe Aktivitäten zu beobachten waren (siehe Tab. 3.19). Weiterhin wurde das korrespondierende Flavanon Apigenin untersucht, jedoch erwies sich dieses schon in einer Konzentration von 20 µM im MTT-Assay als cytotoxisch. Phelligrin A (**20**), eine Struktur mit Naringeningrundgerüst und Salicylalkoholrest in Position 6, zeigte in den untersuchten Konzentrationen von 20 bzw. 50 µM keine Aktivität. Die Inaktivität der Kaffeesäure trotz Catecholstrukturelement ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Polarität der im wässrigen partial dissozierten Carboxylgruppe zurückzuführen, da der Methylester in beiden Konzentrationen ein deutliches Hemmpotential aufwies.

3,4-Dihydroxyphenylstrukturelemente üben in diesem Testsystem einen deutlichen Einfluss auf das Hemmpotential aus, was durch die Aktivitäten von Catechol, Eriodictyol, Luteolin, Quercetin und Methylkaffeat belegt wurde. Eine Hydroxylierung in 3-Position der Flavonoide scheint jedoch diese Aktivität abzuschwächen. Auf eine zusätzliche strukturelle Bedeutung einer Doppelbindung in 2,3-Position weisen die ausgeprägten Aktivitäten des Quercetins und des Luteolins und des Methylkaffeats hin. Jedoch erwiesen sich das Flavon und das Flavonol in höheren Konzentrationen als toxisch, während Catechol, Eriodictyol und Methylkaffeat auf die Endothelzellen in den untersuchten Konzentrationen keine Viabilitätsminderung ausübten.

3.3.1.4 Diskussion

In der Literatur sind spezifische Effekte von Eriodictyol im Gegensatz zu Luteolin oder Naringenin nur spärlich beschrieben. Habtemariam [1997] inkubierte murine Tumorzellen mit TNF-α um eine protektive Aktivität von Flavonoiden im Hinblick auf die

TNF- α -vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen. In der Regel tritt der Zelltod auf diese Weise nach 24 h ein. Eriodictyol erwies sich als das protektivste aller getesteten Flavonoide (63-fach bzw. fünffach potenter als Luteolin bzw. Quercetin), während Apigenin und Naringenin die Zytotoxizität sogar verstärkten. Weitaus häufiger ist jedoch eine höhere Aktivität von Luteolin im Gegensatz zu Eriodictyol vorzufinden [z. B. van Zanden et al. 2004, Takano-Ishikawa et al. 2003, Sasaki et al. 2003]. Dieser Effekt wird der zusätzlichen 2,3-Doppelbindung zugeschrieben. Die Bedeutung dieses Strukturmerkmals wird auch bei Experimenten, die die Verminderung der VCAM-1-, ICAM-1- und E-Selektin-Expression in anderen endothelialen Zelllinien untersuchen, erwähnt, wobei Naringenin sich als inaktiv erwies, Eriodictyol jedoch interessanterweise nicht getestet wurde [Lotito und Frei 2006]. Im Allgemeinen wird angenommen, dass Hydroxygruppen in 5- und 7-Position des Flavonoid-A-Rings, die Doppelbindung in 2,3-Position, sowie eventuell eine Hydroxygruppe in 4-Position des B-Rings maßgeblich an einer Unterdrückung der Adhäsionsmolekül-Expression beteiligt sind. Eine *ortho*-Dihydroxyphenylstruktur des B-Rings, sowie eine Hydroxylierung in 3-Position wird hingegen als Ursache für eine antioxidative Wirkung angesehen [Lotito und Frei 2006, Chen et al. 2004]. Nichtsdestotrotz konnten Takano-Ishikawa und Mitarbeiter [2003] eine signifikante E-Selektin-Inhibition (mittels TNF- α -Zugabe) in HUVECS durch Eriodictyol feststellen. Von Luteolin als auch von Eriodictyol ist bekannt, dass Toll-like-Rezeptor-vermittelte inflammatorische Prozesse *in vitro* abgeschwächt werden können [Lee et al. 2009]. Eine Unterdrückung der Expression von Adhäsionsfaktoren durch Eriodictyol *in vitro* ist aufgrund der Datenlage wahrscheinlich. Interessanterweise berichten Lee und Mitarbeiter [2009] von einem positiven Effekt in ihrem Testsystem, der unabhängig sowohl von Flavonoiden mit einer Doppelbindung in 2,3-Position als auch von solchen mit Catecholstruktur des B-Rings ausging. Insgesamt bleibt jedoch ein möglicher profunder Beitrag von Eriodictyol zu den antiinflammatorischen *in vivo*-Effekten von STW 33-fragwürdig, da dieses Flavanon im Extrakt nur in geringen Mengen vorliegt.

Der potente *in vitro* Hemmstoff Catechol hingegen ist im Extrakt in weitaus höheren Mengen (2,3%, siehe 3.1.4.2, S. 81) enthalten. Dies ist auf den Abbau der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäureeinheit von Salicin und Catechinderivaten zurückzuführen. Wie hier gezeigt, reduziert Catechol die ICAM-1-Expression in HMEC-1 Zellen drastisch, womit die Bedeutung der 1,2-Dihydroxyphenylstruktur unabhängig von einer Flavongrundstruktur an der Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen untermauert wird. Dies belegen auch die Daten des Kaffeesäuremethylesters in dem hier verwendeten Testsystem. Eine ICAM-1-Hemmung in HMEC-1-Zellen durch demethyliertes Curcumin,

einem Molekül mit Kaffeesäurestrukturelement, wurde ebenfalls beobachtet [Khanna et al. 2009]. Catechol als auch Kaffesäuremethylester und andere Kaffesäurederivate sind in der Literatur als potente Hemmstoffe des Transkriptionsfaktors NF-κB beschrieben [Ma et al. 2003, Lee et al. 2010]. Dies wurde für Catechol auch bei der Inhibition von LPS-induzierter NO-Produktion in Mikrogliazellen festgestellt [Zheng et al. 2008]. Jedoch befasst sich ein Großteil der wissenschaftlichen Arbeiten mit der Toxizität von Catechol. Es erwies sich im Tierversuch als krebsfördernd, nach oraler Aufnahme (0,8% Anteil im Futter) wurde adenomatöse Hyperplasie in Mägen von Ratten und Mäusen beobachtet, während Adenokarzinome nur bei Ratten auftraten [Hirose et al. 1993]. Weiterhin stellte Catechol ein orales und dermales Kokarzinogen *in vivo*, jedoch keinen Tumorpromotor dar. Darüber hinaus sind immunmodulierende Effekte, z. B. die Unterdrückung der Reifung von B-Zell-Vorläufern im Knochenmark durch Catechol in Mäusen beschrieben. Eine Vielzahl an Mutagenitätstests in Bakterien- und Säugerzellmodellen, als auch dahingehende *in vivo* Untersuchungen an Ratten, wurden durchgeführt. Die Datenlage zeichnet jedoch kein eindeutiges Bild: die Studien kamen sowohl zu positiven, als auch zu negativen Ergebnissen [Übersicht: Andersen 1997].

Es wird angenommen, dass Catechol hauptsächlich aufgrund seines Redoxpotentials u. a. Schäden an Proteinen hervorrufen oder DNA durch Adduktbildung deaktivieren kann [z. B. Schweigert et al. 2001]. In neuerer Zeit wird vermutet, dass eben diese Effekte an der NF-κB-Inhibierung und somit an einer antiinflammatorischen Wirkung beteiligt sein könnten [Lee et al. 2010]. Die hier vorgelegten Daten geben keine Hinweise auf toxische Effekte in HMEC-1 Zellen und unterstützen die Ergebnisse von Zheng und Mitarbeitern, die einen möglichen positiven Effekt von Catechol postulieren. Der Beitrag dieses reaktiven Moleküls zur antiinflammatorischen Wirkung von Weidenrindenpräparaten bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Potentielle karzinogene Wirkungen werden immer wieder diskutiert, jedoch ist Catechol ebenso in einer Vielzahl von Lebensmitteln, wie z. B. Kaffee, Malz, Brotkruste oder Kakaopulver vorzufinden [Lang et al. 2008]. Eine Bewertung der klinischen Relevanz von möglichen durch Catechol verursachten Nebenwirkungen ist gegenwärtig spekulativ, da es keine Untersuchungen im Rahmen realistischer Dosierungen gibt. Auch bezüglich der Freisetzung, Wirkung, sowie dem Metabolismus *in vivo* ist die Datenlage noch unzureichend.

3.3.2 Resorptionsvorgänge und die Rolle des Darmepithels

Der Großteil von oral applizierten Arzneistoffen bzw. Nahrungsmitteln wird im Dünndarm resorbiert. Dieser gliedert sich in drei Abschnitte unterschiedlicher Länge. Der erste Abschnitt, das Duodenum (Zwölffingerdarm), erstreckt sich über ca. 20-30 cm. Hier wird die Magensäure neutralisiert. Es schließt sich das ca. 1,5 m lange Jejunum (Leerdarm) an. Der letzte Abschnitt des Dünndarms, das Ileum (Krummdarm), besitzt eine Länge von etwa 2 m. Das Jejunum und das Ileum stellen die Hauptorte der Resorption dar. Dabei beträgt die Gesamtlänge des Dünndarms im tonisierten Zustand (*in vivo*) ca. 3,75 m, bei post mortaler Relaxation etwa 6 m. Die Darmschleimhaut (Mukosa) ist aus Epithelzellen, Bindegewebe und einer Muskelschicht aufgebaut. Darunter ist die Submukosa lokalisiert, sie besteht aus kleinen und mittelgroßen Blut- und Lymphgefäßen, sowie dem enterischen Nervensystem. Mukosa und Submukosa bilden bis zu 1 cm hohe zirkulare Kerckring-Falten, deren Oberfläche durch weitere Mukosausstülpungen, den Zotten (Villi), zusätzlich vergrößert ist. Die Mukosa ist durch eine Zellschicht absorbierender Enterozyten (Saumzellen), dem sogenannten Dünndarmepithel, gegenüber dem Darmlumen abgegrenzt. Durch den lumenständigen protoplasmatischen Bürstensaum (Microvilli) der Epithelzellen erfährt die Oberfläche nochmals eine starke Vergrößerung. Somit stellt die absorbierende Gesamtoberfläche des Dünndarms eine Fläche von etwa 200 m² dar. [Schmidth et al. 2010, Ernst und Vögeli 2010, Mutschler et al. 2001]

Die Enterozyten des Dünndarmepithels besitzen eine hochprismatische Morphologie und eine polare Struktur. Neben den Enterozyten sind weitere Zelltypen, wie z. B. die schleimbildenden Becherzellen im Epithel vorhanden. Während die Sekretion von Muzinen und anderen Sekreten vorwiegend in den Krypten der Villi stattfindet, erfolgt die Absorption von Arzneistoffen bzw. Nahrungsbestandteilen zum großen Teil an der Zottenspitze. Die funktionelle Außenseite bzw. die dem Darmlumen zugewandte Seite des Epithels bezeichnet man als apikale Membran, während die basolaterale Membran die dem Blut zugewandte Seite abgrenzt. Zwischen den einzelnen Epithelzellen befinden sich Interzellulärspalte, die apikal durch Schlussleistenkomplexe abgedichtet werden. Der Komplex besteht zum einen aus den tight junctions (zonula occludens), welche die freie Diffusion von Molekülen kontrollieren. Sie sind aus Proteinsträngen aufgebaut, umschließen die apikalen Enden der Enterozyten gürtelförmig und bilden auf diese Weise Verschlusskontakte zwischen den Zellen. Einen weiteren Bestandteil des Komplexes stellen die Desmosomen dar, durch welche die Zellen mechanisch zusammengehalten werden. Zusätzlich existieren verschiedene weitere Zellkontakte, über die die Zellen

miteinander in Verbindung stehen. [Ernst und Vögeli 2010, Schmidth et al. 2010, Thews und Vaupel 2005].

Transepithelialer Stofftransport kann auf verschiedene Arten erfolgen. Beim parazellulären Weg erfolgt die Resorption ins Blut über den Schlussleistenkomplex und den Interzellulärspalt. Die Permeation von gelösten Molekülen ist von ihrer Größe abhängig, nur kleinere gelöste Moleküle und Wasser sind hier bis zu einem gewissen Grad durchgängig. Deshalb kann vereinfacht die Funktion des Schlussleistenkomplexes mit der der Poren eines Molekularsiebes verglichen werden, wobei jedoch die Resorption von Kationen tendenziell höher ist als die von ungeladenen Molekülen oder Anionen. Da die Oberfläche der Schlussleistenkomplexe im Vergleich zur Oberfläche der Enterozytenmembranen sehr gering ist, spielt die parazelluläre Route für den Transport des Großteils der oral verabreichten Arzneistoffe eine eher untergeordnete Rolle. Die passive transzelluläre Route beschreibt die Diffusion von Substanzen durch die apikale Membran, über das Cytoplasma und die basolaterale Membran von Endothelzellen zum Blut, wobei meist auch eine Teilstrecke über den Interzellulärspalt zurückgelegt wird. Um auf diese Weise die Zellschicht überwinden zu können, benötigen Moleküle bestimmte Eigenschaften. Eine einfache Methode zur Abschätzung der passiven Permeabilität von Substanzen über Membranen stellt Lipinsky's Rule of Five dar [Lipinsky et al. 1997]. Sie beschreibt vier Molekülkriterien: ein Molekulargewicht unter 500 g/mol, ein Octanol-Wasser-Koeffizient ($\log P$) unter 5, bis zu fünf H-Brücken-Donoren und bis zu 10 H-Brücken-Akzeptoren. Verletzt eine Substanz zwei oder mehr Parameter, ist eine geringe Absorption zu erwarten. Jedoch unterliegen aktiv transportierte Substanzen dieser Regel nicht. [Ernst und Vögeli 2010, Schmidth et al. 2010]

Weiterhin kann transzellulärer Substanztransport durch Transporter (Transportproteine oder Kanäle) erfolgen. Im Gegensatz zur passiven Diffusion ist diese erleichterte Diffusion sättigbar. Erleichterte passive Diffusion bezeichnet die Beteiligung von Uniportern ohne Energieverbrauch entlang eines Konzentrationsgradienten, während aktiver transzellulärer Transport typischerweise durch ATP angetrieben wird. In Umkehr können Xenobiotika jedoch auch aktiv aus der Zelle hinaustransportiert werden, somit wird die Resorption herabgesetzt. P-gp (P-Glycoprotein), MRP (multidrug resistance-associated protein) und BCRP (breast cancer resistance protein) entstammen der Transporter-Superfamilie ABC (ATP binding cassette) und sind am Efflux von Arzneistoffen aus Zellen beteiligt. P-gp wird in diversen Organen und Körperzellen

exprimiert, u. a. auch auf der apikalen Membran von Enterozyten hauptsächlich im unteren Dünndarm und dem Colon. [Ernst und Vögtli 2010, Schmidth et al. 2010]

Eine zusätzliche Möglichkeit der Stoffaufnahme in Zellen stellt die Endocytose dar. Dabei bewirken aufzunehmende Makromoleküle oft unter Beteiligung spezifischer Membranrezeptoren eine Einstülpung der Membran. Durch Abschnürung entstehen intrazelluläre Vesikel. Ein Durchtritt der Vesikel durch die gesamte Zelle bezeichnet man als Transzytose. [Thews und Vaupel 2005, Schmidth et al. 2010]

Enterozyten weisen außerdem eine metabolische Aktivität auf. Sie besitzen Cytochrom P450 (CYP) Isoenzyme, auch Glucuronidierung oder Sulfatierung mit anschließendem luminalem Efflux ist möglich. CYP3A4 als auch P-gp sind im Darm an der Spitze der Villi zu finden, eine limitierende synergistische Wirkung der beiden Proteine hinsichtlich der Bioverfügbarkeit oral applizierter Arzneistoffe wird vermutet. [Suzuki und Sugiyama 2000, Ernst und Vögtli 2010].

3.3.2.1 Caco-2 Resorptionsmodell

Zur Bestimmung der epithelialen Resorption von Arzneistoffen stellt das Caco-2 Modell ein weit verbreitetes *in vitro* Testsystem dar. Die Caco-2 Zelllinie wurde 1977 von Fogh aus dem Kolonkarzinom eines 72-jährigen Kaukasiers isoliert. Transportstudien mittels dieser Zelllinie wurden in den 1990er Jahren etabliert [Hidalgo et al. 1989, Artursson 1990, Hilgers et al. 1990] und stellen seitdem Gegenstand intensiver Untersuchungen dar. Inzwischen wird die Geschwindigkeit der Permeation von Arzneistoffen über Caco-2-Monolayer von der FDA zur routinemäßigen Einteilung von Arzneistoffen im Rahmen des biopharmazeutischen Klassifizierungssystems anerkannt.

Trotz Ursprungs aus dem Kolon weisen Caco-2-Zellen große funktionale und morphologische Ähnlichkeit mit den Enterozyten des Dünndarms auf [Artursson et al. 1996; Hidalgo et al. 1989, Hilgers et al. 1990]. Die polarisierten Zellen bilden einen definierten Bürstensaum auf der apikalen Seite sowie Schlussleistenkomplexe aus. Auch exprimieren sie bestimmte Bürstensaum-Enzyme und besitzen metabolische Aktivität durch Enzyme wie z. B. Gluthation-S-Transferasen, Sulfotransferasen und Glucuronyltransferasen. Caco-2-Zellen exprimieren außerdem eine Reihe von Transportern, die sowohl der Aufnahme als auch dem Efflux von Substanzen dienen können, wie z. B. P-gp, MRPs und BCRP [van Breemen und Li 2005, Brand et al. 2008]. Das Ausmaß der

Expression an Transportern ist jedoch auch von den Kulturbedingungen abhängig [Li et al. 2003]. Das Testsystem stellt ein aussagefähiges Modell dar, auch wenn fehlende Parameter wie z. B. die Mucusschicht oder die bakterielle Darmflora berücksichtigt werden müssen [Hidalgo 1996, Barthe et al. 1999]. Auch CYP-Isoenzyme sind im Gegensatz zu humanen Dünndarmenterozyten in Caco-2-Zellen im Normalfall unterexprimiert [van Breemen und Li 2005].

Die Permeabilitätskoeffizienten des passiven transepithelialen Transports von β -Blockern über den Caco-2-Monolayer korrelieren mit der Aufnahme *in vivo* [Artursson 1991]. Sehr hydrophile Verbindungen hingegen werden im Caco-2-Modell schlechter transportiert. Dies hängt mit dem Schlussleistenkomplex zusammen, der physiologisch von distaler in proximaler Richtung des Darms an Dichtigkeit gewinnt. Damit nimmt auch der transepithiale Widerstand, der ein Maß für die Dichtigkeit des Monolayers darstellt und hauptsächlich durch die Schlussleisten bestimmt wird, in dieser Richtung zu [Schmidth et al. 2011]. Da es sich bei der Ziellinie um Kolonkarzinomzellen handelt, ist der transepithiale Widerstand generell höher als unter physiologischen Bedingungen im Dünndarm.

3.3.2.2 Versuchsaufbau

Für die Ausbildung eines Monolayers wurden Caco-2-Zellen auf der Polycarbonatmembran von Transwell-Einsätzen 21-23 Tage in 12-well-Zellkulturplatten kultiviert (siehe Abb. 3.44). Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Um den Monolayer nicht zu verletzen, wurde das zu wechselnde Medium der apikale Seite vorsichtig abgegossen [Hubatsch et al. 2007]. Durch das Herausnehmen der Einsätze besteht eine erhöhte Kontaminationsgefahr durch Mikroorganismen. Deshalb wurden dem Medium ab dem Zeitpunkt der Ansaat auf der Membran Antibiotika zugesetzt.

Der Transport der Einzelsubstanzen bzw. der Ethylacetatfraktion wurde von apikaler zu basolateraler Seite der Monolayer untersucht, nachdem die Integrität des Monolayers durch TEER-Messung (2.4.5.2, S. 35) bestätigt wurde. Dazu wurde die Testlösungen (in HBSS, pH 7,4) apikal aufgegeben und die Zellen inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde Medium basolateral entnommen und gegen frisches ersetzt. Nach jedem Versuch wurde erneut der TEER-Wert bestimmt, um eine erhöhte Durchlässigkeit des Monolayers während des Versuchs durch mechanische Verletzung oder aufgrund zytotoxischer Effekte der aufgegebenen Substanzen auszuschließen.

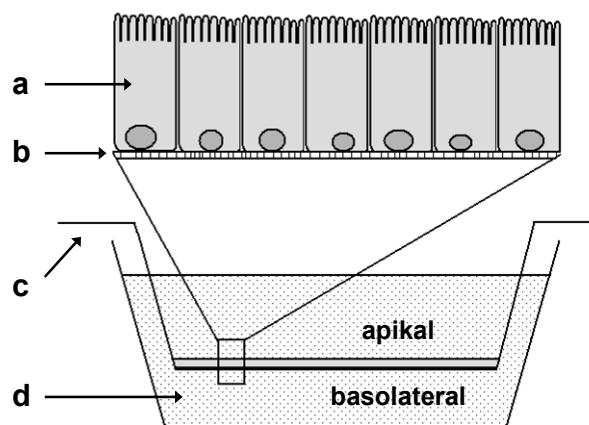


Abb. 3.44 Versuchsaufbau. **a** Monolayer aus Epithelzellen, **b** Polycarbonatmembran, **c** Transwell-Einsatz, **d** mit Medium befülltes well.

3.3.2.3 Vorversuche

TEER-Messung

Um die Entwicklung der Monolayer zu überprüfen, wurde der TEER-Wert zu Beginn der Experimente jeden zweiten Tag exemplarisch bestimmt. Die Passagen 34-37 wiesen nach 21 bis 29 Tagen durchschnittlich einen TEER-Wert von $455 \pm 36 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=43$) auf.

Stabilität der Probe

Da der Trockenextrakt durch Auszug des Rindenmaterials mit heißem Wasser hergestellt wurde und die Ethylacetatfraktion aus diversen Verteilungsschritten hervorging, waren weitergehende Abbauschritte durch die Inkubation bei 37°C im Versuchsverlauf nicht zu erwarten. Um dennoch eine Veränderung der Probe während der Inkubationszeit auszuschließen, wurde exemplarisch eine Probe der Ethylacetatfraktion in HBSS-Puffer (5 mg/ml) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Der Gehalt an Catechol und Naringenin wurde zu den Zeitpunkten 0, 60, 90 und 120 min durch HPLC-Analysen bestimmt. Dabei wurde eine leichte Steigerung des Catecholgehaltes beobachtet (nach 60 min 103%, nach 90 min 106% und nach 120 min 109% des Ausgangswertes) und eine leichte Abnahme des Naringeningehaltes (nach 60 min 99%, nach 90 min 99% und nach 120 min 98% des Ausgangswertes). Die Versuchsdauer wurde auf 90 min festgelegt.

3.3.2.4 Kontrollsubstanzen

Bei jedem Versuch wurden zwei Kontrollsubstanzen mitgeführt. Zur Charakterisierung des passiv transzellulären Transports wurde der β -Blocker Propranolol verwendet. Für die Bestimmung des parazellulären Transports kam FITC-Dextran zum Einsatz. Die

beiden Substanzen dienen der Charakterisierung des Testsystems und sollen zur Vergleichbarkeit von Versuchsergebnissen beitragen.

3.3.2.5 Kalibriergeraden

Die Erstellung der Kalibriergeraden von FITC-Dextran erfolgte fluorimetrisch am Versuchstag durch Verwendung der Aufgabelösung (Bereich 0,02-640 µg/ml). Die restlichen Kalibrierungen (Tab. 3.20) wurden per HPLC-Analyse durchgeführt. Bis auf Catechol wurde bei allen Analyten die Peakfläche ausgewertet. Der Catecholgehalt wurde aufgrund einer nicht vollständig abtrennbaren Verunreinigung mittels Auswertung der Peakhöhe berechnet.

Tab. 3.20 Kalibriergeraden der Caco-2 Transportversuche.

Analyt	Methode	Bereich	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß
Catechol	C2	0,06-120 µg/ml	y = 26591x + 9823	R ² = 0,9982
Naringenin	C3	0,1-30 µg/ml	y = 935695x - 93349	R ² = 0,9997
Naringenin in EA	C4	0,1-30 µg/ml	y = 1113292x - 85510	R ² = 0,9998
Propranolol	C5	0,125-80 µg/ml	y = 231646x + 42201	R ² = 0,9975

3.3.2.6 Ergebnisse und Diskussion der Caco-2-Transportversuche

Für die Versuche wurden Caco-2 Zellen der Passagen 34-37 verwendet. Die Transportexperimente wurden mindestens dreifach mit jeweils unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt. Eine quantifizierbare Resorption unter diesen Versuchsbedingungen war bei Catechol und Naringenin zu beobachten, wohingegen die glucosidischen Verbindungen unter diesen Versuchsbedingungen nicht resorbiert wurden (siehe Abb. 3.45).

Permeabilitätskoeffizienten der Kontrollsubstanzen

Für Propranolol wurde ein scheinbarer Permeabilitätskoeffizient $22,5 \pm 1,3 \times 10^{-6}$ cm/s bestimmt. Dies steht im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen (u. a. $23,4 \pm 2,8 \times 10^{-6}$ cm/s [Walgren et al. 1998], $41,9 \pm 4,31 \times 10^{-6}$ cm/s [Artursson und Karlsson 1991], $43,0 \pm 3,6 \times 10^{-6}$ cm/s [Artursson 1990], $11,2 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ cm/s [Walter et al. 1996]).

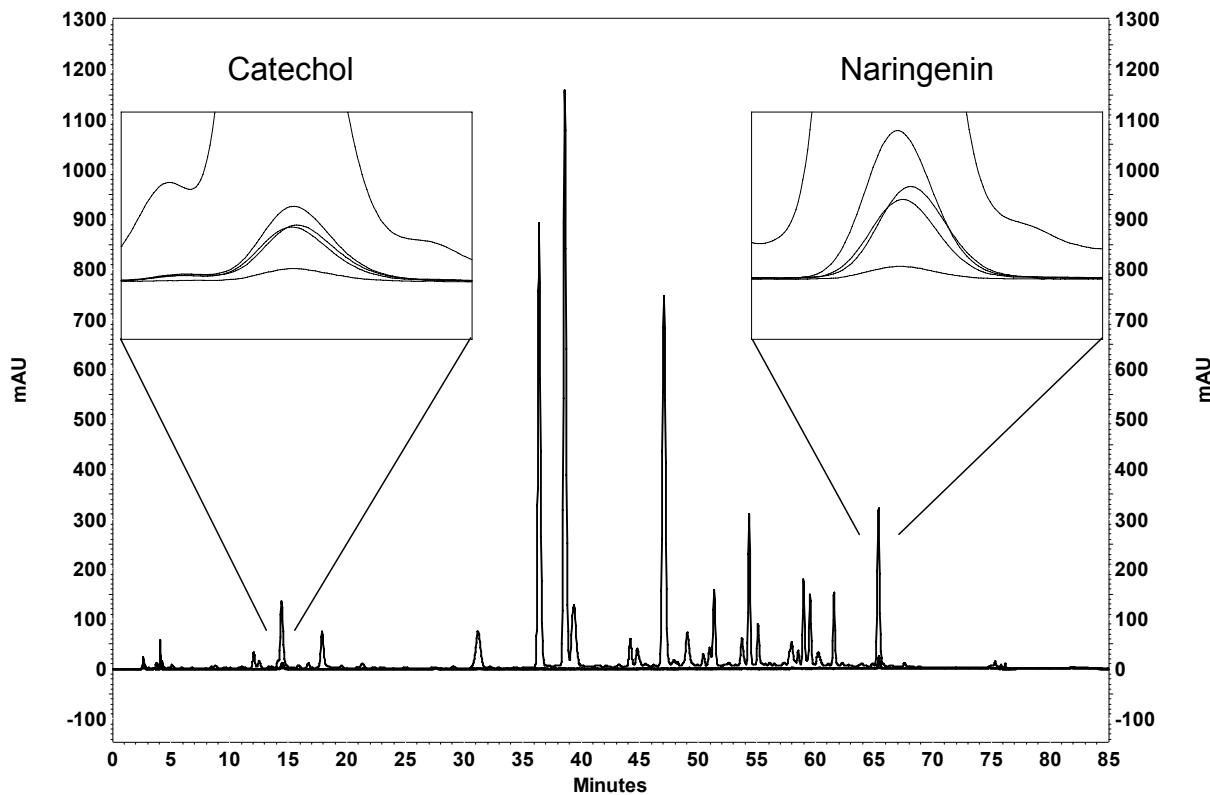


Abb. 3.45 Transport der Ethylacetatfraktion über den Caco-2-Monolayer (Methode C1). HPLC-Chromatogramme zu den Zeitpunkten $t=0$ (apikal entnommene Probe), $t=20$, $t=60$ und $t=90$ (basolateral entnommene Probe), Aufgabekonzentration 1 mg/ml, 289 nm (übereinandergelegt).

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient von FITC-Dextran konnte nicht bestimmt werden. Obwohl die Fluoreszenzmessung eine sehr empfindliche Methode darstellt, waren die transportierten Stoffmengen nicht ausreichend hoch, um mittels der Kalibriergerade einen genauen Wert zu erhalten. Dies spricht für eine hohe Dichtigkeit der Schlussleistenkomplexe der Epithelzellen und korreliert mit den relativ hohen TEER-Werten. Kotzé und Mitarbeiter [1997] fanden einen sehr niedrigen P_{app} von $0,0004 \times 10^{-6}$ cm/s für FITC-Dextran, in der Literatur sind jedoch auch höhere Werte zu finden (z. B. Takahashi und Mitarbeiter [2002]: $P_{eff} = 0,07 \pm 0,01 \times 10^{-6}$ cm/s). Dies spiegelt eine allgemein vorherrschende Heterogenität von Versuchsergebnissen wider, die von unterschiedlichen Kultur- und Versuchsbedingungen herrührt. Der nicht ermittelbare Permeationskoeffizient dient jedoch als zusätzlicher Beweis für die Integrität des Monolayers über die Dauer des Versuchs. Zur Kontrolle wurde der P_{app} von FITC-Dextran ohne Zellmonolayer bestimmt. Dieser lag bei $36,8 \pm 11,3 \times 10^{-6}$ cm/s und somit in einer ähnlichen Größenordnung wie der von Boje [2002] ermittelte Koeffizient ($15,9 \pm 2,5 \times 10^{-6}$ cm/s).

Permeabilitätskoeffizienten der Testsubstanzen

Zur Untersuchung eventueller Unterschiede des Transports von Catechol und Naringenin als Einzelsubstanzen im Gegensatz zum Transport der Substanzen in der Matrix der Ethylacetatfraktion, wurden die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) unter Sink-Bedingungen, sowie ihre Wiederfindung bestimmt (Tab. 3.21). Dazu wurden die entnommenen Proben der Ethylacetatfraktion der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unterworfen und jeweils der Gehalt von Catechol und Naringenin bestimmt. Da Catechol relativ frühzeitig eluierte, wurde mit derselben, aber verkürzten Methode der Gehalt an Catechol-Einzelsubstanz ermittelt. Für die Bestimmung der Proben von Naringenin als Einzelsubstanz wurde eine zusätzliche HPLC-Methode angewendet. Die Einzelsubstanzen wurden in Konzentrationen im vergleichbaren Größenbereich ihres Vorliegens in der Ethylacetatfraktion aufgegeben. Alle Proben wurden in DMSO gelöst (Endkonzentration im Aufgabepuffer 0,5%). Zeitgleich wurde zu jedem Versuch mit Zellmonolayer auch ein separater Versuch ohne die Zellschicht unter Verwendung der gleichen Ausgangslösung durchgeführt. Dabei wurde auf dieselbe Weise vorgegangen wie bei der Bestimmung mit Zellschicht. Unter diesen Umständen waren jedoch keine Sink-Bedingungen gegeben. Deshalb wurden für die Versuche ohne Caco-2-Monolayer keine Permeabilitätskoeffizienten bestimmt, sondern die Wiederfindungen herangezogen, um Interaktionen der Testsubstanzen mit der Polycarbonatmembran der Transwell-Einsätze und den anderen Kunststoffoberflächen feststellen zu können. Die prozentuale Wiederfindung ohne Zellmonolayer betrug für Catechol bzw. Naringenin $107,3 \pm 5,9\%$ bzw. $110,5 \pm 9,6\%$ als Einzelsubstanz und $117,5 \pm 2,7\%$ bzw. $118,3 \pm 8,9\%$ in der Matrix. Somit konnten oben genannte Einflüsse ausgeschlossen werden.

Diskussion der Ergebnisse

Zahlreiche Autoren stellten *in vitro/in vivo*-Korrelationen zwischen dem Transport im Caco-2-Modell und physiologischer oraler Resorption auf. Bei Betrachtung verschiedener Postulate [Übersicht: Volpe 2005] ist ein Einvernehmen der meisten Autoren festzustellen, dass Substanzen mit scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von über $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ zu 70-100% resorbiert werden sollten. Sowohl Catechol als auch Naringenin erfüllten dieses Kriterium, sowohl als Einzelsubstanzen, als auch in der Matrix der Ethylacetatfraktion.

Tab. 3.21 Einfluss der Matrix auf die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten und die basolaterale Wiederfindung nach 90 min. **E:** Einzelsubstanz, **M:** Substanz in der Matrix der Ethylacetatfraktion, **A:** Apikale Bestimmung, **BL:** basolaterale Bestimmung, n=4.

Masse (µg)	Catechol		Naringenin	
	E	M	E	M
Aufgabe (t=0); A	25,8 ± 0,3	37,5 ± 0,6	13,4 ± 1,0	8,4 ± 0,5
Resorption (t=90); A (%)	13,6 ± 0,9 (52,8 ± 3,1)	15,0 ± 1,2 (41,4 ± 2,9)	6,1 ± 0,2 (47,6 ± 0,9)	3,3 ± 0,3 (39,9 ± 2,0)
Wiederfindung (t=90); BL (%)	11,7 ± 1,8 (84,6 ± 7,3)	15,7 ± 0,3 (104,2 ± 4,9)	4,1 ± 0,6 (70,5 ± 1,9)	3,1 ± 0,3 (95,0 ± 4,1)
P_{app} [10⁻⁶ cm/s]	46,2 ± 4,6	39,4 ± 3,2	23,2 ± 5,9	34,2 ± 3,0

Der scheinbare Permeabilitätskoeffizient von Catechol als Einzelsubstanz wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Koeffizienten von Catechol in der Ethylacetatfraktion auf. Somit können Einflüsse der Matrix auf die Resorption von Catechol in diesem Versuchsmodell ausgeschlossen werden. Die Permeabilitätskoeffizienten von Catechol lagen im Größenbereich der Kontrollsubstanz Propranolol, weshalb ein passiv transzellulärer Transport plausibel erscheint. Betrachtet man jedoch die Absorption, so fällt auf, dass trotz höherer Ausgangsmenge in der Ethylacetatfraktion prozentual weniger Catechol resorbiert wurde als bei der niedrigeren Aufgabemenge der Einzelsubstanz. Dies könnte auf einen sättigbaren Mechanismus hindeuten. Jedoch ist die Datenlage zur oralen Resorption von Catechol in der Literatur unzureichend. Jung und Mitarbeiter [2003] fanden, dass Catechol in ethanolischer Trägerlösung *in vivo* und *in vitro* rasch dermal resorbiert wird. Dies wirft Fragen auf, ob die hauptsächliche Absorption von Catechol im Dünndarm stattfindet, oder *in vivo* schon früher durch Mund- und Magenschleimhaut erfolgt.

Die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten der Einzelsubstanz Naringenin ($P_{app} = 23,3 \pm 5,9 \times 10^{-6}$ cm/s) stehen im Einklang mit der Literatur ($12,6 \pm 1,4 \times 10^{-6}$ cm/s [Tian et al. 2009], $24,8 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ cm/s [Chabane et al. 2009], $37,8 \pm 7,3 \times 10^{-6}$ cm/s [Serra et al. 2008]). In jüngerer Zeit wurden mehrere Studien bezüglich des Transportmechanismus von Naringenin im Caco-2-Transportmodell durchgeführt. Die Permeabilitätskoeffizienten der Substanz wurden sowohl von apikaler in basolateraler

Richtung als auch umgekehrt bestimmt. Hier fiel auf, dass das Effluxverhältnis ($P_{app\ B \rightarrow A}/P_{app\ A \rightarrow B}$) in den Versuchen bei 1,2-2,9 lag, d. h. die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten von basolateraler in apikale Richtung höher lagen als die von apikal nach basolateral [Chabane et al. 2009, Tian et al. 2009, Serra et al. 2008]. Das Vorhandensein eines Protonengradienten verminderte das Verhältnis nur marginal. Durch Einsatz verschiedener Transportinhibitoren konnte belegt werden, dass es sich bei Naringenin um ein Substrat der Efflux-Proteine P-gp und MRP-2 (Lokalisation auf der apikalen Seite von Epithelzellen) und des Transporters MRP-1 (auf basolateraler Seite) handelt. Eine Kombination aus passiv transzellulärer Absorption unter Beteiligung von MRP-1 und einem P-gp- und MRP-2-vermittelten Efflux wird als Transportmechanismus *in vitro* postuliert [Chabane et al. 2009].

Naringenin wurde im vorliegenden Testsystem in der Matrix der Ethylacetatfraktion ($P_{app} = 34,2 \pm 3,0 \times 10^{-6}$ cm/s) statistisch signifikant schneller resorbiert als die Einzelsubstanz ($P_{app} = 23,3 \pm 5,9 \times 10^{-6}$ cm/s). Die prozentuale Menge an resorbiertem Naringenin war bei der Einzelsubstanz etwas größer als in der Matrix, die Wiederfindung war jedoch mit 71% bei der Einzelsubstanz deutlich niedriger als bei Naringenin in der Matrix (95%). Dies deutet auf eine längere Verweildauer von Naringenin als Einzelsubstanz in den Caco-2 Zellen hin, die möglicherweise auf Hemmung oder Induktion verschiedener Transportmechanismen durch die Ethylacetatfraktion zurückzuführen ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Wiederfindung stellt eine verstärkte Metabolisierung des Naringenins ohne die Matrix dar, wobei das Molekül durch Transformation der Analytik entzogen worden wäre. Hier könnten Inhaltsstoffe der Ethylacetatfraktion verschiedene metabolisierende Enzyme hemmen. Bei genauerer Betrachtung der Chromatogramme des Transports von Naringenin als Einzelsubstanz ist festzustellen, dass nach Zellkontakt tatsächlich zusätzliche Peaks vorzufinden sind. Da die Substanzen bei höherer Polarität des Fließmittels eluieren, handelt es sich um Verbindungen höherer Polarität, möglicherweise Naringenoglucuronide oder -sulfate. Diese können nach Transport von Naringenin über den Monolayer nach 90 min sowohl im apikalen (Abb. 3.46) als auch im basolateralen Kompartiment detektiert werden, wobei beim Transportversuch ohne Caco-2 Zellen diese zusätzlichen Verbindungen fehlten. Die Ergebnisse sprechen für eine verminderte Wiederfindung zumindest teilweise aufgrund von Metabolismus.

Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten bei einer Wiederfindung unter 80% dazu neigen, zu niedrig auszufallen [Hubatsch et al. 2007]. Nichtsdestotrotz sind bei der Absorption von Naringenin in der Matrix verglichen mit der Resorption als Einzelsubstanz deutliche Unterschiede festzustellen.

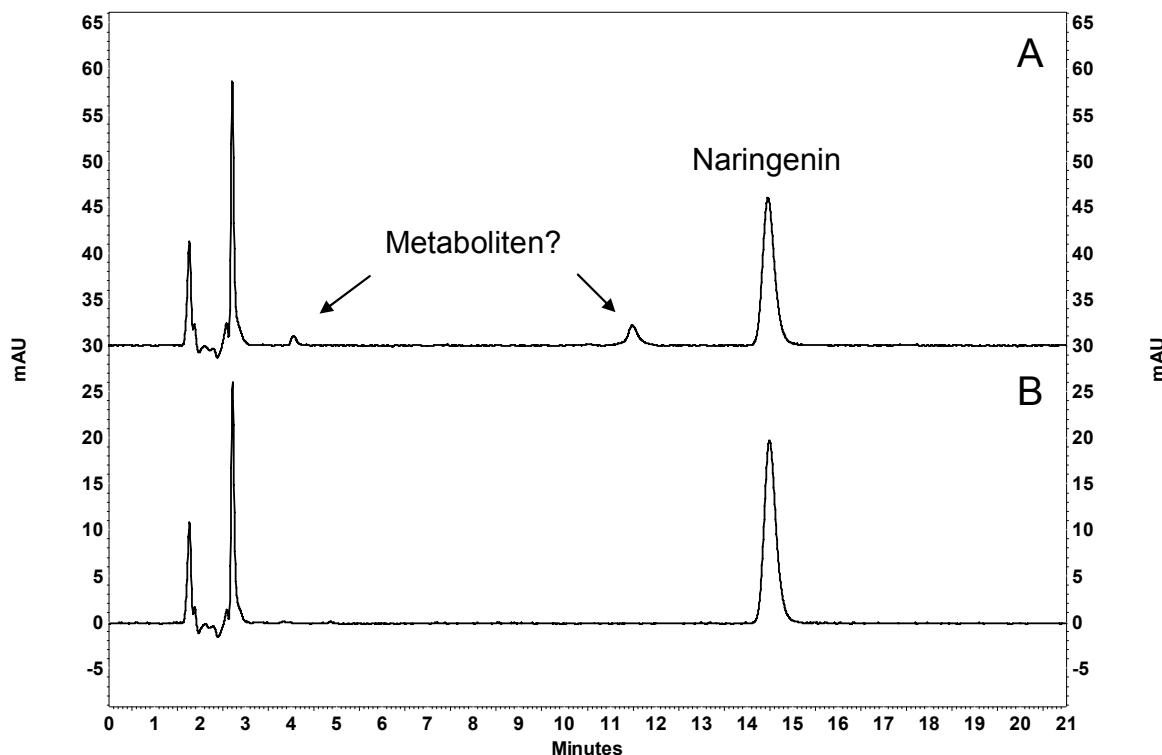


Abb. 3.46 HPLC-Chromatogramm einer basolateral entnommenen Probe des Transportexperiments von Naringenin-Einzelsubstanz (Methode C3). A mit, B ohne Caco-2-Monolayer, 289 nm, t=90.

Die Hauptinhaltsstoffe der Ethylacetatfraktion, (2R/2S)-Naringen-5-O- β -D-glucosid und Naringenin-7-O- β -D-glucosid, konnten erwartungsgemäß nicht auf basolateraler Seite detektiert werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass Flavonidglycoside erst nach bakterieller Hydrolyse zum Aglycon in unteren Darmabschnitten resorbiert werden können. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass einige Flavonoidglycoside mithilfe des natriumabhängigen Glucosetransporters-1 (SGLT1) intakt in die Dünndarmenterozyten aufgenommen werden. Hier erfolgt die Deglycosidierung durch cytosolische β -Glucosidasen (CBG). Jedoch scheinen zumindest einige Flavonoidglycoside vor der Hydrolyse durch Efflux-Transporter (MRP-2, BCRP) wieder aus der Zelle hinaus transportiert zu werden. Eine zweite Möglichkeit der Resorption besteht in der Hydrolyse durch die bürstensaumständige Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) und anschließende passive Diffusion der Aglyca über die Zellmembran. Im Zellinneren angelangt, können die Aglyca entweder passiv transzellulär zur basolateralen Seite gelangen oder aber sie werden metabolisiert (Glucuronidierung, Sulfatierung) und gelangen über weitere Transportsysteme zur Blutseite oder durch Efflux wieder ins Darmlumen [Übersicht: Walle 2004, Brand et al. 2010]. Zudem sind Hinweise darauf gefunden worden, dass vor allem

Monoglycoside schon in der Mundhöhle [Walle et al. 2005] und auch im Magen deglykosiert werden [Lu et al. 2010]. Im Caco-2-Zellmodell (mit Ausnahmen von speziellen Klonen) ist die LPH für metabolische Studien nicht ausreichend vorhanden, jedoch wurden Naringenin-7-O-glucosid als auch Eriodictyol-7-O-glucosid durch eine aus Schafsdünndarm gewonnene LPH schnell hydrolysiert [Németh et al. 2003]. Wie jedoch in Kapitel 3.2.2 (S. 83) gezeigt wurde, ist die enzymatischen Hydrolyse von (2R/2S)-Naringen-5-O- β -D-glucosid und Naringenin-7-O- β -D-glucosid unter Umständen nicht vergleichbar. Dieser Aspekt und seine mögliche Relevanz *in vivo* bedürfen weiterer Versuche. Schlussendlich besteht die Möglichkeit, dass die Naringeninglucoside in diesem Zellmodell deglucosidiert (z. B. durch CBG nach Aufnahme in die Zellen) und über den Monolayer ins basolaterale Kompartiment transportiert wurden. Die Abnahme von Naringeninglucosiden im apikalen Kompartiment wurde nicht betrachtet. Sowohl Naringenin als auch Naringenin-7-O-glucosid wurden im Rattenmodell gut resorbiert, die Plasmakonzentrationen an Naringenin waren nach Fütterung der jeweiligen Substanz vergleichbar [Felgines et al. 2000]. Dies zeigt, dass die Deglucosidierung eine profunde Rolle bei der Absorption der Naringeninderivate spielt und daher das verwendete Caco-2-Modell unzureichend geeignet ist, diesen Sachverhalt zu untersuchen. Für die Aglyca Catechol und Naringenin hingegen konnten Permeabilitätskoeffizienten bestimmt werden. Die Absorption von Naringenin in der Matrix unterscheidet sich signifikant von der Einzelsubstanz. Die Ursachen hierfür, eventuelle resorptionsfördernde Eigenschaften der Matrix, sowie mögliche Metaboliten bieten Raum für weitergehende Untersuchungen.

4 Zusammenfassung

Weidenrinde besitzt eine lange Tradition als gut verträgliches pflanzliches Arzneimittel gegen Schmerzen und Fieber. Dabei wurde lange Zeit das Phenolglucosid Salicin als wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoff betrachtet. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass Salicin nicht allein für die antiinflammatorischen Eigenschaften ausschlaggebend sein kann. So rückten vor allem die Polyphenole in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag, das Polyphenolspektrum von STW 33-1 bzw. *S. purpurea* L. genauer zu beschreiben und prominente Flavonoide zu quantifizieren. Zudem wurden mögliche Wirkmechanismen und die Resorption von Extrakt bzw. Extraktfraktionen *in vitro* untersucht.

Der standardisierte Trockenextrakt STW 33-I (*S. purpurea* L., DEV 16-23:1, 23-26% Gesamtsalicingehalt, Auszugsmittel: Wasser) wurde durch Flüssig-Flüssig-Verteilung fraktioniert und phytochemisch charakterisiert. Die Ethylacetatfraktion wies den höchsten Flavonoid-Anteil auf. 20 Substanzen, darunter Flavanone, Flavanonole und deren Glucoside, Chalkonglucoside und korrespondierende Cumarsäureester wurden aus dieser Fraktion isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt. NMR-Daten und eine stereochemische Zuordnung der epimeren 6"-O-*p*-trans-Cumaroyl-(2S/2R)-naringenin-5-O-β-D-glucoside wurden vorgelegt. Weiterhin lieferte die Ethylacetatfraktion Salicylalkoholderivate und einfache phenolische Verbindungen, wobei Populosid B erstmals in der Gattung *Salix* und Trichocarposid erstmals in *Salix purpurea* L. gefunden wurden. Die Isolierung von Minorkomponenten wie *cis*-1,2 Dihydroxycyclohexanderivaten lieferte die bisher unbekannte Substanz 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentin sowie Isograndidentatin A, eine bisher nicht beschriebene Substanz innerhalb der Gattung *Salix*. Darüber hinaus gelang erstmals die Gewinnung von Phelligrin A aus einer Salicaceae. Phelligrin A nimmt strukturell eine Zwischenstellung zwischen Flavanonen und Salicylalkoholderivaten ein und wird vermutlich durch symbiotische Effekte zwischen einem Rindenpilz und der Weide als Wirtspflanze synthetisiert.

Flavanonglucoside und deren acylierte Derivate stellen neben den Salicylalkoholderivaten die Hauptinhaltsstoffe des untersuchten Trockenextraktes dar. Laut Monographie des Europäischen Arzneibuches ist der Gehalt an Salicylalkoholderivaten das Hauptkriterium für die Qualität von Weidenrinde. Um die Qualitätsansprüche den neuesten wissenschaftlichen Untersuchungen anzupassen, werden Methoden zur Polyphenolbestimmung von Weidenextrakten benötigt. Deshalb wurde in einem ersten Schritt eine Methode zur Quantifizierung von Naringenin und Naringeninderivaten, den Hauptvertretern der Weidenrindenflavonoide, entwickelt und validiert. Es handelt sich um

eine quantitative hydrolytische Spaltung der Naringeninderivate, die teilweise durch Trifluoressigsäure erfolgt und durch enzymatische Deglucosidierung vervollständigt wird. In Anlehnung an die Gehaltsbestimmung von *Ginkgo biloba* werden die zu Aglyca umgesetzten Flavanonderivate durch hochleistungsflüssigkeitschromatographische Analyse gemeinsam als Naringenin erfasst. Der Gehalt des Gesamtextraktes an Naringeninderivaten beträgt nach dieser Methode $13,6 \pm 0,5\%$, berechnet als Naringenin-monoglucosid.

Weiterhin wurden zellbiologische Untersuchungen durchgeführt. Im ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) -Assay wird das antiinflammatorische Potential von Substanzen untersucht, die ICAM-1-Expression auf stimulierten mikrovaskulären Endothelzellen zu unterdrücken. Die Aktivität des Gesamtextraktes konnte größtenteils auf die Ethylacetatfraktion und den darin enthaltenen NF- κ B-Hemmstoff Catechol zurückgeführt werden. Catechol ist als Abbauprodukt bestimmter Salicylalkoholderivate im untersuchten Gesamtextract zu etwa 2% enthalten. Weitere isolierte Substanzen wurden ebenfalls untersucht, wobei glucosidische Verbindungen keine Aktivität aufwiesen. Eine deutliche Hemmung bewirkte außerdem das Flavanon Eriodictyol. Es konnte gezeigt werden, dass Catecholstrukturelemente die Aktivität von Molekülen im ICAM-1-Assay erhöhen.

Um Hinweise auf die Bioverfügbarkeit der im Extrakt enthaltenen phenolischen Substanzen zu erhalten, wurde die Resorption der Ethylacetatfraktion im Caco-2-Zellkulturmodell untersucht. Lediglich Catechol und Naringenin waren nach 90 min im basolateralen Kompartiment in quantifizierbaren Konzentrationen detektierbar. ($P_{app} = 46,2 \pm 4,6$ bzw. $23,3 \pm 5,9 \times 10^{-6}$ cm/s). Demgegenüber wurde die Resorption der Einzelsubstanzen betrachtet ($P_{app} = 39,4 \pm 3,2$ bzw. $34,2 \pm 3,0 \times 10^{-6}$ cm/s). Für Catechol wurden erstmals Permeabilitätskoeffizienten beschrieben. Statistisch signifikante Unterschiede, die für eine erhöhte Resorption der Substanzen infolge positiver Matrixeffekte durch die Ethylacetatfraktion sprechen, waren in diesem Testsystem bei Naringenin, jedoch nicht bei Catechol festzustellen.

Die Bedeutung von Catechol und Flavonoiden mit Catecholstrukturelement an der antiinflammatorischen Wirkung von Weidenrindenextrakten sowie deren Resorption und Metabolismus, bieten Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Aufgrund des hohen Catecholgehaltes dieses Extraktes werden zudem Studien zur chronischen Toxizität von Weidenrindenextrakten dringend benötigt.

5 Summary

Willow bark preparations hold a long tradition as well-tolerated herbal remedies for pain and fever. For the longest time, the phenolic glucoside salicin was regarded as the main active principle. However, recent studies indicate that salicin alone cannot be responsible for the observed antiinflammatory effects. Therefore, mainly the attendant polyphenols gained scientific attention. This study entailed the identification and quantification of prominent flavonoids of *Salix purpurea* L. In addition, possible modes of action as well as the absorption of a polyphenol-rich fraction were investigated *in vitro*.

The standardized willow bark extract STW 33-I (*S. purpurea* L., DER 16-23:1, 23-26% total salicin content, extracting agent: water) was subjected to liquid-liquid partition and subsequent phytochemical characterization. The largest amount of flavonoids was found in the ethyl acetate fraction. Twenty compounds, including flavanones and flavanonols, their glucosides, along with chalcone glucosides and corresponding coumaric derivatives were isolated and their structures elucidated. The stereochemical assignment of the epimeric 6"-O-*p*-trans-coumaroyl-(2S/2R)-naringenin-5-O-β-D-glucosides was determined. The ethyl acetate fraction yielded salicylic alcohol derivatives and simple phenolic compounds of which populoside B was detected in *Salix* and trichocarposide in *S. purpurea* L. for the first time. The isolation of minor compounds like *cis*-1,2-dihydroxycyclohexane derivatives yielded the hitherto unknown compound 6'-O-4-hydroxybenzoylgrandidentin, as well as isograndidentatin, a compound previously not observed within *Salix* genera. Furthermore, phelligrin A was isolated for the first time from a Salicaceae. This molecule combines structural elements of a salicylic alcohol and a flavonoid. It is synthesized most probably due to a symbiosis between a wood decaying fungus and its willow tree host.

Together with salicylic alcohol derivatives, flavanone glucosides and their acylated derivatives represent the principal compounds of the investigated dry extract. According to the monograph of the European Pharmacopeia the content of salicylic alcohol derivatives is the main criterion determining the pharmaceutical quality of willow bark preparations. With regard to the possible contribution of the polyphenols to the effect, a procedure for quantification of the principal flavonoid naringenin and its derivatives was developed and validated. First, most of the glucosides were cleaved by acid hydrolysis followed by an enzymatic deglucosidation of the remaining derivatives. Adapting the general idea of the procedure used to assay the flavonoid glycosides of *Ginkgo biloba* leaves (Ph. Eur.), naringenin glucosides and their corresponding chalcones were quantified as aglycones by high pressure liquid chromatography. The content of

naringenin derivatives in the dry extract was determined to be $13.6 \pm 0.5\%$ (m/m), calculated as naringenin monoglucoside.

Further, cell biological investigations were carried out. The ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) assay evaluates antiinflammatory potential of substances by determination of the suppression of ICAM-1 expression on the surface of stimulated microvascular endothelial cells. The major activity of the whole extract was found in the ethyl acetate fraction and assigned in large part to the simple phenol and NF- κ B-inhibitor catechol. This compound is a degradation product of some salicylic alcohol derivatives and is present in the extract to an extent of approximately 2%. Isolated glucosidic compounds were shown to be inactive. A considerable inhibition of ICAM-1 expression was caused by the flavanone eriodictyol. It was demonstrated, that catechol moieties enhance the activity of compounds in the ICAM-1 assay.

In order to investigate the bioavailability of willow bark flavonoids *in vitro*, the absorption and transport of the ethyl acetate fraction was determined in a caco-2 cell culture model. Only catechol and naringenin were detected in quantifiable amounts in the basolateral compartment after 90 min ($P_{app} = 46.2 \pm 4.6$ and $23.3 \pm 5.9 \times 10^{-6}$ cm/s, respectively). The transport of each single compound ($P_{app} = 39.4 \pm 3.2$ and $34.2 \pm 3.0 \times 10^{-6}$ cm/s, respectively) was determined. An apparent permeability coefficient for catechol was determined for the first time. An increase in transport velocity due to matrix effects of the ethyl acetate fraction was demonstrated for naringenin, but not for catechol at a statistically significant level.

The relevance of catechol and flavonoids with catechol moieties, their contribution to the antiinflammatory properties of willow bark extracts, as well as their absorption and metabolism represent interesting fields for future research. Moreover, due to the relatively high content of catechol, data regarding the *in vivo* metabolism of this compound are needed.

6 Abkürzungsverzeichnis

↓	Niederschlag
6-HCH	6-Hydroxycyclohex-2-en-1-on
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BUT	n-Butanol bzw. n-Butanolfraktion
Caco-2	Human Caucasian colon adenocarcinoma cell line-2
CBC	Cytosolische β -Glucosidase
CD	Circulardichroismus
CDC	Centers for disease control and prevention, USA
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
COSY	Correlated spectroscopy
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarray-Detektor
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetatfraktion
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisierung
EMEA	European Medicines Agency
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Elektronensprayionisierung
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol bzw. Ethanolfraktion
FACS	Durchflusscytometer (Fluorescence assisted cell sorter)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	US food and drug administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMEC-1	Human microvascular endothelial cell line-1
HMPC	Herbal Medicinal Product Committee
HR	High resolution
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence

HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell-line
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
KG	Körbergewicht
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPH	Lactat-Phlorizin-Hydrolase
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Low resolution
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRP	Multidrug Resistance Protein
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (non essential amino acids)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NOE	Nuclear Overhauser enhancement/effect
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum (non steroidal antiinflammatory drug)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea)
ROESY	Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
ROS	Reaktive Sauersoffspezies (reactive oxygen species)
RP-18	Umkehrphase, Kieselgel modifiziert mit Octadecylgruppen (reversed phase)
RP-8	Umkehrphase, Kieselgel modifiziert mit Octylgruppen (reversed phase)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SGLT1	Natriumabhängiger Glucosetransporter 1 (Sodium-dependent glucose transpoter 1)
STW 33-I	Weidenrindentrockenextrakt der Fa. Steigerwald
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNF-α	Tumor-necrosis factor α
WHO	World Health Organisation
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index

7 Literatur

A

Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., George, V.G., Summers, S., Bosse, D.C., Lawley, T.J., 1992. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683-690.

Ajith, T.A., Janardhanan, K.K., 2007. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 40, 157-162.

Andersen, F.A., 1997. Amended final report on the safety assessment of pyrocatechol. *Int. J. Toxicol.* 16 (1 Suppl), 11-58.

Argus, G.W., 1997. Infrageneric classification of *Salix* (Salicaceae) in the New World. *Syst. Bot. Monographs*, Vol. 52, 1-121.

Artursson, P., 1990. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* 79, 476-482.

Artursson, P., Karlsson, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 880-885.

Aturki, Z., Brandi, V., Sinibaldi, M., 2004. Separation of flavanone-7-O-glycoside diastereomers and analysis in Citrus juices by multidimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5303-5308.

B

Barthe, L., Woodley, J., Houin, G., 1999. Gastrointestinal absorption of drugs: Methods and studies. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13, 154-168.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R., 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4, 14-19.

Biegert, C. 2003. Eine randomisierte, kontrollierte klinische Studie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindeextraktes in der Behandlung von Cox- und Gonarthrosen. Dissertation, Universität Tübingen.

Biegert, C., Wagner, I., Lüdtke, R., Köller, I., Lohmüller, C., Günaydin, I., Taxis, K., Heide, L., 2004. Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. *J. Rheumatol.* 31, 2121-2130.

Birkofe, L., Kaiser, C., Kosmol, H., Romussi, G., Donike, M., Michaelis, G., 1966. D-Glucose- und L-Rhamnoseester der p-Cumar- und Ferulasäure. *Liebigs Ann. Chem.* 199, 223-231.

Boeckler, G.A., Gershenson, J., Unsicker, S.B., 2011. Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* 72, 1497-1509.

Boje, K., 2002. Phytochemische und biopharmazeutische Untersuchungen zu *Harpagophytum procumbens* DC. Dissertation, Universität Münster.

Bonaterra, G.A., Heinrich, E.U., Kelber, O., Weiser, D., Metz, J., Kinscherf, R., 2010a. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine* 17, 1106-1113.

- Bonaterra, G. A., Kelber, O., Weiser, D., Metz, J., 2010b. In vitro anti-proliferative effects of the willow bark extract STW 33-I. *Arzneimittelforschung* 60, 330-335.
- Bouïs, D., Hospers, G.A., Meijer, C., Molema, G., Mulder, N.H., 2001. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4, 91-102.
- Brand, W., van der Wel, P.A.I., Rein, M.J., Barron, D., Williamson, G., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.C.M., 2008. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1794-1802.
- Brand, W., Padilla, B., van Bladeren, P.J., Williamson, G., Rietjens, I.M.C.M., 2010. The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in Caco-2 cell monolayers. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 851-860.
- van Breemen, R.B., Li, Y., 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1, 175-185.
- Bruggisser, R., Daeniken von, K., Jundt, G., Schaffner, W., Tullberg-Reinert, H., 2002. Interference of plant extracts, Phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 68, 445-448.
- Brune, K., 2002. Klinische Indikationen für die Arzneimitteltherapie. In: Laufer, S., Gay, S., Brune, K. (Hrsg), *Rheumatische Erkrankungen und Entzündung. Von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Brune, K., Manger, B. 2010. Rheumatische Erkrankungen. In: Lemmer, B., Brune, K.(Hrsg) *Pharmakotherapie. Klinische Pharmakologie*, 14. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Burlingham, B.T., Rettig, J.C., 2008. Evaluating mechanisms of dihydroxylation by Thin-Layer Chromatography. A microscale experiment for organic chemistry. *J. Chem. Educ.* 85, 959-961.
- Buß, T. 2005. Studie über die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, Salicin und Salicortin sowie Synthesen von Salicylsäure-Glycosiden und Salicin-Analoga. Dissertation, Universität Marburg.
- C**
- Çalış, I., Barbič, M., Jürgenliemk, G., 2008. Bioactive cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus elongatus*. *Z. Naturforsch.* 63c, 813-820.
- Cameron, M., Gagnier, J.J., Chrubasik, S., 2011. Herbal therapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2), CD002948.
- Chabane, M.N., Ahmad, A.A., Peluso, J., Muller, C.D., Ubeaud-Séquier, G., 2009. Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 1473-1483.
- Chen, C.-C., Chow, M.-P., Huang, W.-C., Lin, Y.-C., Chang, Y.-J., 2004. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol. Pharmacol.* 66, 683-693.
- Chrubasik, S., Eisenberg, E., Balan, E., Weinberger, T., Luzzati, R., Conradt, C., 2000. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am. J. Med.* 109, 9-14.
- Chrubasik, S., Künzel, O., Model, A., Conradt, C., Black, A., 2001a. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatology* 40, 1388-1393.

Chrubasik, S., Künzel, O., Black, A., Conradt, C., Kerschbaumer, F., 2001b. Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study. *Phytomedicine* 8, 241-251.

Cinamon, G., Shinder, V., Alon, R., 2001. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat. Immunol.* 2, 515-522.

Clausen, T.P., Koller, J.W., Reichardt, P.B., 1990. Aglycone fragmentation accompanies β -glucosidase catalyzed hydrolysis of salicortin, a naturally-occurring phenol glycoside. *Tetrahedron Lett.* 31, 4537-4538.

D

DAB 10,1991. Weidenrinde - *Salicis cortex*, 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.

Dai, Y.C., Cui, B.K., Yuan, H.S., Li, B.D., 2007. Pathogenic wood-decaying fungi in China. *For. Path.* 37, 105-120.

Dirsch V. M., Keiss H. P., Vollmar A. M., 2004. Garlic metabolites failed to inhibit the activation of the transcription factor NF- κ B and subsequent expression of the adhesion molecule E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Nutr.* 43, 55-59.

E

Egger, G., 2005. Akute Entzündung. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Ernst, B., Vögeli, A. 2010. Moderne Pharmakokinetik. Transport durch Membranen. Wiley-VCH, Weinheim.

ESCOP-Monographie, 2003. *Salicis cortex - Willow Bark*.

F

Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Régerat, F., Rémesy, C., 2000. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G1148-1154.

Fernandes, C.C., de Carvalho Cursino, L.M., de Abreu Pinheiro Novaes, J., Avelino Demetrio, C., Liborio Pereira, O.Jr.; Nunez, C.V., do Amaral, I.L., 2009. Salicylates isolated from leaves and stems of *Salix martiana* Leyb. (Salicaceae). *Quim. Nova* 4, 983-986.

Fiebich, B., Chribasik, S., 2004. Effects of an ethanolic extract on the release of selected inflammatory mediators. *Phytomedicine* 11, 135-138.

Förster, N., Ulrichs, C., Zander, M., Kätzel, R., Mewis, I., 2010. Factors influencing the variability of antioxidative phenolic glycosides in *Salix* species. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8205-8210.

Foo, L.Y., Karchesy, J.J., 1989. Polyphenolic glycosides from Douglas fir inner bark. *Phytochemistry* 4, 1237-1240.

G

Gagnier, J.J., van Tulder, M.W., Berman, B., Bombardier, C., 2007. Herbal medicine for low back pain: a Cochrane review. *Spine* 32, 82-92.

Gebhardt, K., 2010. Neuzüchtung und Erprobung bisher nicht registrierter Weidenklone und -sorten. Vortrag Agrarholz 2010, 18.-19.05.2010, Berlin. (http://www.fnr-server.de/cms35/fileadmin/allgemein/pdf/veranstaltungen/Agrarholz2010/10_2_Beitrag_Gebhardt.pdf)

Gel-Moreto, N., Streich, R., Galensa, R., 2003. Chiral separation of diastereomeric flavanone-7-O-glycosides in *Citrus* by capillary electrophoresis. Electrophoresis 24, 2716-2722.

Germann, I.D. 2005. Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer. Dissertation, Universität Tübingen.

Glasl, H., 1983. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. DAZ 42, 1979-1987.

H

Habtemariam, S., 1997. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cells. J. Nat. Prod. 60, 775-778.

Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E., 2007. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-κB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-κB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* 2007, Article ID 45673.

Han, X.H., Hong, S.S., Hwang, J.S., Lee, M.K., Hwang, B.Y., Ro, J.S., 2007. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Arch. Pharm. Res.* 1, 13-17.

Harborne, J., 1965. Plant Polyphenols -XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry* 4, 107-120.

Haruta, M., Pedersen, J.A., Constabel, C.P., 2001. Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.* 112, 552-558.

Hedner, T., Everts, B., 1998. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. *Clin. Rheumatol.* 17, 17-25.

Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Dröge, W., Lienhard Schmitz, M., 1999. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-κB by targeting the IκB kinase complex. *J. Immunol.* 163, 5617-5623.

Herz, W., Gibaja, S., Bhat, S.V., Srinivasan, A. 1972. Dihydroflavonols and other flavonoids of *Eupatorium species*. *Phytochemistry* 11, 2859-2863.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2005. Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie. 7. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.

Hidalgo, I.J., 1996. Cultured epithelial cell models. in: Borchardt, R.T., Smith, P.L., Wilson, G. Models for assessing drug absorption and metabolism. Plenum Press, New York, 35-50.

Hilgers, A.R., Conradi, R.A., Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 7, 902-910.

Hirose, M., Fukushima, S., Tanaka, H., Asakawa, E., Takahashi, S., Ito, N., 1993. Carcinogenicity of catechol in F344 rats and B6C3F₁ mice. *Carcinogenesis* 14, 525-529.

- HMPC, 2009a. Final Community Herbal Monograph on *Salix*, Cortex.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018256.pdf
- HMPC, 2009b. Overview of comments received on Community Herbal Monograph on *Salix*, Cortex (EMEA/HMPC/295338/2007). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Overview_of_comments_received_during_consultation/2009/12/WC500018255.pdf
- Hostanska, K., Jürgenliemk, G., Abel, G., Nahrstedt, A., Saller, R., 2007. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detection and Prevention* 31, 129-139.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G.E., Artursson, P., 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* 2, 2111-2119.
- Hufford, C.D., Lasswell, W.L.Jr., 1976. Uvaretin and isouvaretin. Two novel cytotoxic C-benzylflavanones from *Uvaria chamae* L. *J. Org. Chem.* 41 (7), 1297-1298.
- I**
- Ibrahim, L.F., El-Senousy, W.M., Hawas, U.W., 2007. NMR spectral analysis of flavonoids from *Chrysanthemum coronarium*. *Chem. Nat. Compd.* 6, 659-662.
- J**
- Jarrett, J.M., Williams, A.H., 1967. Flavonoid glycosides of *Salix purpurea*. *Phytochemistry* 6, 1585-1586.
- Jones, R., 2001. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *Am. J. Med.* 110, 4S-7S.
- Jürgenliemk, G., Petereit F., Nahrstedt A., 2007. Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. *Pharmazie* 62, 231-234.
- Julkunen-Tiitto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213-217.
- Julkunen-Tiitto, R., Meier, B., 1992. The Enzymatic Decomposition of Salicin and Its Derivatives Obtained from Salicaceae Species. *J. Nat. Prod.* 55, 1204-1212.
- Jung, C.T., Wickett, R.R., Desai, P.B., Bronaugh, R.L., 2003. In vitro and in vivo percutaneous absorption of catechol. *Food Chem. Toxicol.* 41, 885-895.
- K**
- Khanna, S., Park, H.-A., Sen, C.K., Golakoti, T., Sengupta, K., Venkateswarlu, S., Roy, S., 2009. Neuroprotective and antiinflammatory properties of a novel demethylated curcuminoid. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 449-468.
- Khayyal, M.T., El-Ghazaly, M.A., Abdallah, D.M., Okpanyi, S.N., Kelber, O., Weiser, D., 2005. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effects of a standardized willow bark extract. *Arzneimittelforschung* 55, 677-687.
- Kim, J.-K., Bae, Y.-S., 2009. Grandidentatin isomer from bark of suwon poplar (*Populus alba* L. × *Populus glandulosa* Uyeki). *Holzforschung* 63, 315-318.

- Knuth, S., Formisano, C., Schübel, H., Hellermann, M., Jürgenliemk, G., 2010. In-vitro inhibition by an extract and fractions of willow bark. Posterbeitrag, Drugs from Nature targeting inflammation, 08.-10.04.2010, Innsbruck, Österreich.
- Knuth, S., Schübel, H., Hellermann, M., Jürgenliemk, G., 2011. Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF- α induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Med.* 77, 1024-1026.
- Kommission E, 1984. Monographie Salicis cortex. Bundesanzeiger Nr. 228 vom 05.12.1984.
- Koptina, A., Kelber, O., Müller, J., Freischmidt, A., Heilmann, J., Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. 2011. The group of peripheral glutamate receptors are targeted by salicylates of willow bark and the antidepressant imipramine in a rat model of depression. Posterbeitrag, Phytopharm 2011, 25.-27.05.2011, Nürnberg.
- Kort, R., Vonk, H., Xu, X., Wolff, W.D., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J., 1996. Evidence for *trans-cis* isomerisation of the *p*-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 382, 73-78.
- Kotzé, A.F., Lueßen, H.L., de Leeuw, R.J., de Boer, B. G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 1997. N-Trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: *In-Vitro* evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 14, 1197-1202.
- Krause, M., Galensa, R., 1990. Improved chiral stationary phase based on cellulose triacetate supported on non-macroporous silica gel diol for the high-performance liquid chromatographic separation of racemic flavanones and diastereomeric flavanone glycosides. *J. Chromatogr.* 502, 287-296.
- Krause, M., Galensa, R., 1991a. Analysis of enantiomeric flavanones in plant extracts by high-performance liquid chromatography on a cellulose triacetate based chiral stationary phase. *Chromatographia* 32, 69-72.
- Krause, M., Galensa, R., 1991b. High-performance liquid chromatography of diastereomeric flavanone glycosides in *Citrus* on a β -cyclodextrin-bonded stationary phase (Cyclobond I). *J. Chromatogr.* 588, 41-45.
- Krivoy, N., Pavlotzky, E., Chribasik, S., Eisenberg, E., Brook, G., 2001. Effect of salicis cortex extract on human platelet aggregation. *Planta Med.* 67, 209-212.
- Kromidas, S., 1999. Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim.
- L
- Lang, R., Müller, C., Hofmann, T., 2008. Development of a stable isotope dilution analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection for the quantitative analysis of di- and trihydroxybenzenes in foods and model systems. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5755-5762.
- Lardos, A., Schmidlin, C.B., Fischer, M., Ferlas-Chlodny, E., Loniewski, I., Samochowiec, L., Musial, H.D., 2004. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines wässrig ausgezogenen Weidenrindenextraktes bei Patienten mit Knie- und Hüftarthrose. *Z. Phytother.* 25, 272-279.
- Lasswell, W.L.Jr., Hufford, C.D., 1977. Cytotoxic C-benzylated flavonoids from *Uvaria chamae*. *J. Org. Chem.* 42, 1295-1302.
- Lee, I.-K., Kim, C.-J., Song, K.-S., Kim, H.-M., Yoo, I.-D., Koshino, H., Esumi, Y., Uramoto, M., 1995. Two benzylated dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *J. Nat. Prod.* 58, 1614-1617.
- Lee, I.-K., Kim, C.-J., Song, K.-S., Kim, H.-M., Koshino, H., Uramoto, M., Yoo, I.-D., 1996. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 41, 213-216.

- Lee, J.K., Kim, S.Y., Kim, Y.S., Lee, W.H., Hwang, D.H., Lee, J.Y., 2009. Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by luteolin. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1391-1400.
- Lee, Y., Shin, D.-h., Kim, J.-H., Hong, S., Choi, D., Kim, Y.-J., Kwak, M.-K., Jung, Y., 2010. Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I_KB kinase inhibition are involved in NF_κB inhibitory effect: Structural analysis for NF_κB inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 643, 21-28.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678-689.
- Li, Q., Sai, Y., Kato, Y., Tamai, I., Tsuji, A., 2003. Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines. *Pharm. Res.* 20, 1119-1124.
- Lindroth, R.L., Pajutee, M.S., 1987. Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts. *Oecologia* 74 (1), 144-148.
- Lipinsky, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3-25.
- Lotito, S.B., Frei, B., 2006. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J. Biol. Chem.* 281, 37102-37110.
- Lu, X.-Y., Sun, D.-L., Chen, Z.-J., Chen, T., Li, L.-P., Xu, Z.-H., Jiang, H.-D., Zeng, S., 2010. Relative contribution of small and large intestine to deglycosylation and absorption of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* extract. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10661-10667.
- M**
- Ma, Q., Kineer, K., Ye, J., Chen, B.J., 2003. Inhibition of Nuclear Factor κB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol. Pharmacol.* 64, 211-219.
- Mahdi, J.G., Mahdi, A.J., Bowen, I.D., 2006. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell. Prolif.* 39, 147-155.
- Malerich, P., Elston, D.M., 2006. Introduction to TNF/pathophysiology of TNF. In: Weinberg, J.M., Buchholz, R. (Hrsg.), *TNF-alpha inhibitors*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Markham, K.R., Ternai, B., 1976. ¹³C-NMR of flavonoids-II, flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, 32, 2607-2612.
- Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Mabry, T.J., 1978a. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III, Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397.
- Markham, K.R., Zinsmeister, H.D., Mues R., 1978b. Luteolin 7-glucuronide-3'-mono(*trans*)ferulyl-glucoside and other unusual flavonoids in the aquatic liverwort complex, *Riccia fluitans*. *Phytochemistry* 17, 1601-1604.
- Markham, K.R., 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press Inc., London.
- Mattes, B.R., Clausen, T.P., Reichardt, P.B., 1987. Volatile constituents of balsam poplar: The phenol glycoside connection. *Phytochemistry* 26, 1361-1366.

Meier, B., Sticher, O., Brettschart, A., 1985. Weidenrinde-Qualität, Gesamtsalicinbestimmung in Weidenrinde und Weidenrindepräparaten mit HPLC. DAZ 7, 341-347.

Meier, B., Liebi, M., 1990. Salicinhaltige pflanzliche Arzneimittel. Z. Phytother. 11, 50-58.

Meier, B., 2001. Die Weidenrinde als Schmerz- und Rheumamittel-vor einer Renaissance? Phytotherapie 4, 3-8.

Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol. Rev. 52, 673-751.

Milde, J. 2004. Kooperative Wirkung pflanzlicher Antioxidantien in pathologisch relevanten Arteriosklerose- und Arthritismodellen. Dissertation, TU München.

Miles, C.O., Main, L., 1988. The kinetics and mechanism, and the equilibrium position as a function of pH, of the isomerisation of naringin and the 4'-rhamnoglucoside of 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 195-198.

Mo, S.Y., He, W.Y., Yang, Y.C., Shi, J.G., 2003. Two benzyl dihydroflavones from *Phellinus igniarius*. Chin. Chem. Lett. 14, 810-813.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

N

Nahrstedt, A., Schmidt, M., Jäggi, R., Metz, J., Khayyal, M.T., 2007. Willow bark extract: The contribution of polyphenols to the overall effect. Wien. Med. Wochenschr. 157, 348-351.

Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.-G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A., 2003. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur. J. Nutr. 42, 29-42.

Noe, C.R., Freiسمuth, J., 1995. Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: Separation after derivatization with S-(-)-1-phenylethylamine. J. Chromatogr. A 704, 503-512.

P

Pan, J., Zhang, S., Yan, L., Tai, J., Xiao, Q., Zou, K., Zhou, Y., Wu, J., 2008. Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucrata* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C₁₈ column. J. Chromatogr. A 1185, 117-129.

Pearl, I.A., Darling, S.F., 1962. Studies on the barks of the family Salicaceae. V.1 Grandidentatin, a new glucoside from the bark of *Populus grandidentata*. J. Org. Chem. 27, 1806-1809.

Pearl, A.I., Darling, S.F., 1963. Studies on the leaves of the family Salicaceae. III. Migration of acyl groups during isolation of glycosides from *Populus grandidentata* leaves. Arch. Biochem. Biophys. 102, 33-38.

- Pearl, A.I., Darling, S.F., 1970a. Phenolic extractives of *Salix purpurea* bark. *Phytochemistry* 9, 1277-1281.
- Pearl, A.I., Darling, S.F., 1970b. Purpurein, a new glucoside from the bark of *Salix purpurea*. *Phytochemistry* 9, 853-856.
- Pearl, I.A., Darling, S.F., 1971. The structures of salicortin and tremulacin. *Phytochemistry* 10, 3161-3166.
- Pelzer, L., Guardia, T., Juarez, A.O., Guerreiro, E., 1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. II *Farmaco* 53, 421-424.
- Ph. Eur. 5 und 6 (Pharmacopoea Europaea), Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart/Govi Verlag Eschborn.
- Prasad, S., Phromnoi, K., Yadav, V., Chaturvedi, M., Aggarwal, B., 2010. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med.* 76, 1044-1063.

R

Ruuhola, T., Julkunen-Tiitto, R., Vainiotalo, P., 2003. In vitro degradation of willow salicylates. *J. Chem. Ecol.* 29, 1083-1097.

S

Sasaki, N., Toda, T., Kaneko, T., Baba, N., Matsuo, M., 2003. Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem. Biol. Interact.* 145, 101-116.

Schmid, B., Lüdtke, R., Selbmann, H.-K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., Heide, L., 2000. Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes bei Arthrose-Patienten: Randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie. *Z. Rheumatol.* 59, 314-320.

Schmid, B., Lüdtke, R., Selbmann, H.K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., Heide, L., 2001a. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. *Phytother. Res.* 15, 344-350.

Schmid, B., Kötter, I., Heide, L., 2001b. Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57, 387-391.

Schmidth, R.F., Lang, F., Heckmann, M., 2010. Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 31. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.

Schütt, C., Bröker, B., 2011. Grundwissen Immunologie, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Schweigert, N., Zehnder, A.J., Eggen, R.I., 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 3, 81-91.

Sell, I., 2008. Taxonomy of the species in the *Phellinus igniarius* group. *Mycotaxon* 104, 337-347

Serra, H., Mendes, T., Bronze, M., Simplício, A.L., 2008. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 4009-4018.

Shao, Y., 1991. Phytochemischer Atlas der Schweizer Weiden. Dissertation, ETH Zürich, Schweiz.

Si, C.-L., Kim, J.-K., Bae, Y.-S., Li, S.-M, 2009. Phenolic compounds in the leaves of *Populus ussuriensis* and their antioxidant activities. *Planta Med.* 75, 1165-1167.

Smith, W.B., Proulx, T.W., 1976. The ^{13}C NMR spectra of nine *ortho*-substituted phenols. *Org. Magn. Reson.* 8, 205-207.

Suzuki, H., Sugiyama, Y., 2000. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 3-12.

T

Takahashi, Y., Kondo, H., Yasuda, T., Watanabe, T., Kobayashi, S.-I., Yokohama, S., 2002. Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 246, 85-94.

Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Yamaki, K., 2003. Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytother. Res.* 17, 1224-1227.

Thews, G., Vaupel, P., 2005. *Vegetative Physiologie*. 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Tian, X.-J., Yang, X.-W., Yang, X., Wang, K., 2009. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics* 367, 58-64.

Tomšovský, M., Vampola, P., Sedlák, P., Byrtusová, Z., Jankovský, L., 2010. Delimitation of central and northern European species of the *Phellinus igniarius* group (Basidiomycota, Hymenochaetales) based on analysis of ITS and translation elongation factor 1 alpha DNA sequences. *Mycol. Progress* 9, 431-445.

Tyukavkina, M.A., Dem'yanovich, V.M., Kolesnik, Yu.A., Ruchkin, V.E., Rulenko, I.A., Litvinenko, V.I., 1989. Configuration of stereoisomers of naringenin 5-glucoside present in flamin. *Chem. Nat. Compd.* 2, 157-160.

U

Ulrich-Merzenich, G., Kelber, O., Freischmidt, A., Heilmann, J., Müller, J., Zeitler, H., Panek, D., Winterhoff, H., 2010a. Evidences for an antidepressant effect of willow bark in the Porsolt swimming test. *Eur. J. Integr. Med.* 2, 188.

Ulrich-Merzenich, G., Panek, D., Zeitler, H., Vetter, H., Wagner, H., 2010b. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J. Exp. Biol.* 48, 208-219.

V

Vinokurov, I.I., Skrigan, A.I., 1969. Properties of a flavanone glucoside from the bark of the sharp-leaved willow. *Ser. Khim. Navuk* 6, 116-118.

Vlachojannis, J.E., Cameron, M., Chrubasik, S., 2009. A systematic review on the effectiveness of willow bark for musculoskeletal pain. *Phytother. Res.* 23, 897-900.

Volpe, D.A. 2008. Drug Permeability Studies in Regulatory Biowaiver Applications. In: Ehrhardt, C., Kim, K.-J., *Drug absorption studies. In situ, in vitro and in silico models*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

W

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97-110.

Wagner, I., 2003. Pharmakologische und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit eines standardisierten Weidenrindenextraktes. Dissertation, Universität Tübingen.

Wagner, I., Biegert, C., Heide, L., 2003. Phytoanalgetika. Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharm. Ztg.* 143, 1153-1164

Walgren, R., Walle, U., Walle, T., 1998. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1721-1727.

Walle, T., 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 829-837.

Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., Walle, U.K., 2005. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* 135, 48-52.

Walter, E., Janich, S., Roessler, B.J., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L., 1996. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: In vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *J. Pharm. Sci.* 85, 1070-1076.

Wegener, T., 2009. Zur Studienlage von Weidenrindenextrakten. *Z. Phytother.* 30, 232-237.

WHO, 1999. WHO monographs on selected medicinal plants (Vol. 1).
<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2200e/s2200e.pdf>

WHO, 2009. WHO monographs on selected medicinal plants (Vol. 4).
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16713e/s16713e.pdf>

Wichtl, M. (Hrsg.), 2008. Teedrogen und Phytopharmaaka; 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Y

Yang, L., 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106, 584-592.

Z

van Zanden, J.J., Geraets, L., Wortelboer, H.M., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M., Cnubben, N.H., 2004. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1607-1617.

Zander, M., 2000. Untersuchungen zur Identifizierung ausgewählter Vertreter der Gattung *Salix* L. im NO-deutschen Tiefland, unter besonderer Berücksichtigung des *Salix-repens*-Komplexes. Mitteilungen zur floristischen Kartierung in Sachsen-Anhalt, Band 5, Ampyx-Verlag, Halle.

Zapesochnaya, G.G., Kurkin, V.A., Braslavskii, V.B., Filatova, N.V., 2002. Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chem. Nat. Compd.* 4, 314-318.

Zhang, X., Thuong, P.T., Min, B.S., Ngoc, T.M., Hung, T.M., Lee, I.S., Na, M., Seong, Y.H., Song, K.S., Bae, K., 2006a. Phenolic glucosides with antioxidant activity from the stem bark of *Populus davidiana*. *J. Nat. Prod.* 69, 1370-1373.

Zhang, X., Hung T.M., Phuong, P.T., Ngoc, T.M., Min, B.S., Song, K.S., Seong, Y.H., Bae, K., 2006b. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. Arch. Pharm. Res. 12, 1102-1108.

Zheng, L.T., Ryu, G.-M., Kwon, B.-M., Lee, W.-H., Suk, K., 2008. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. Eur. J. Pharmacol. 588, 106-113.