

**Vergleichende
phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen zur Hemmung der
Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme
mit Arzneidrogen der chinesischen Medizin,
insbesondere Platycodi radix und Chaenomelis fructus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Eveline Reiningger
aus München

Düsseldorf, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Bauer

Korreferent: Prof. Dr. U. Kuckländer

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2001

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. R. Bauer

am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rudolf Bauer, für die großartige Unterstützung und ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. G. Willuhn und Herrn Prof. Dr. P. Proksch danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. U. Kuckländer danke ich weiterhin sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
B	PROSTAGLANDIN-H-SYNTASE –1 UND –2	3
1.	Molekularbiologie der PGHS-1 und –2	3
1.1.	Genetische Charakterisierung	3
1.2.	Struktur der beiden Isoenzyme	4
1.3.	Regulation der Expression von PGHS-1 und PGHS-2	6
1.4.	Das aktive Zentrum	7
2.	Hemmung der PGHS-Isoenzyme	12
2.1.	Hemmmechanismen	12
2.2.	Selektive Hemmung und selektive Hemmstoffe	13
2.3.	Charakterisierung der Hemmstärke und Selektivität von PGHS-Hemmstoffen	17
3.	Physiologische und pathologische Funktionen der PGHS-1 und –2	21
3.1.	Versuche mit PGHS-1/-2 Knock-out Mäusen	21
3.2.	PGHS-Effekte auf den Magen	21
3.3.	Beeinflussung der Lunge und PGHS-1/2 Gleichgewicht bei Asthma	23
3.4.	PGHS-Einfluss in der Niere	24
3.5.	Vorkommen von PGHS-1/-2 in Blutplättchen	24
3.6.	Funktionen der PGHS-1/-2 während Schwangerschaft und Geburt	24
3.7.	PGHS-1/-2 Einfluss im ZNS	25
3.8.	Einsatz von PGHS-Hemmstoffen bei Morbus Alzheimer	25
3.9.	PGHS-2 bei der Zellentwicklung und Krebsentstehung	25
3.10.	Einfluss der Isoenzyme im Entzündungsgeschehen - inflammatorische und anti-inflammatorische Wirkung der PGHS-2	26
3.11.	Problematik bei der Behandlung mit COX-2-präferentiellen und -selektiven Hemmstoffen	27
4.	Zukunftsvisionen für die Entwicklung neuer PGHS-Hemmstoffe	28
5.	Pflanzliche Drogen und Inhaltsstoffe als PGHS-2 (COX-2) Inhibitoren	30

C	ENTWICKLUNG NEUER PGHS-1 UND –2 SCREENINGTESTSYSTEME	32
1.	Vorgaben und Zielsetzung	32
1.1.	Zielsetzung für den neuen Prostaglandinsynthese-Screening-Assay	32
1.2.	Kurze Einführung in das bisherige Testsystem	33
1.3.	Herkunft, Isolierung und Identifizierung von PGHS-2 Isoenzym aus Schafcotyledonen	34
2.	Entwicklung der neuen Screeningtestsysteme	39
2.1.	Gereinigte PGHS-2 und PGHS-1	39
2.1.1.	Enzymstabilität	39
2.1.2.	Enzymaktivitätsberechnung	40
2.2.	Entwicklung eines PGHS-2 und PGHS-1 Testsystems mit Radioaktivitätsdetektion (Phase 1)	41
2.2.1.	Bestimmung der Enzymmenge	41
2.2.2.	Einfluss und Konzentration des Cofaktors Hematin [Hydroxy (protoporphyrinato) Eisen(III)]	42
2.2.3.	Einfluss und Konzentration des Cofaktors L-Adrenalin-D-hydrogentartrat	43
2.2.4.	Einfluss des Cofaktors EDTA (Di-Natrium-Ethyldiaminotetraacetat)	45
2.2.5.	Substratkonzentration	46
2.2.6.	Vergleichende Bestimmung von Hemmwerten	46
2.2.7.	Testdurchführung I	48
2.3.	Umsetzungsprodukte	48
2.3.1.	Einfluss des pH-Wertes des Assaymediums	49
2.3.2.	Einfluss von reduziertem Glutathion (GSH)	51
2.3.3.	Identifizierung der Umsetzungsprodukte mittels HPLC-MS	52
2.4.	Inkubationszeiten und Reaktionszeiten	59
2.5.	Umstellung des Testes für die Detektion mit Enzym-Immuno-Assay (EIA) (Phase 2)	61
2.6.	Detektion mit EIA	62
3.	Optimierung (Phase 3)	66
3.1.	Optimierung der Enzymmenge	66
3.2.	Optimierung des Substrates Arachidonsäure und der Cofaktoren	67
3.3.	Testdurchführung II	68
3.4.	Optimierung der Hematinkonzentration	69
3.5.	Optimierung der Detektion	69
3.6.	Durchführung des PGHS-1/-2 Screening-Assays, Plattendesign	70
3.7.	Hemmstärke der Positivkontrollen in den Screening-Assays	72

4.	Zusammenfassung und Diskussion	75
-----------	---------------------------------------	-----------

D	PHARMAKOLOGISCHES SCREENING VON ARZNEIDROGEN AUS DER TCM	78
----------	---	-----------

1.	Auswahl der entzündungshemmend wirkenden Drogen	78
1.1.	Drogen und ihre Inhaltsstoffe	78
1.2.	Anwendungen, bekannte und belegte Wirkungen	84
1.3.	Extraktion und Ausbeuten	87
2.	Pharmakologisches Screening von sukzessiv gewonnenen Extrakten	87
2.1.	Testvoraussetzungen und eigene Testergebnisse	87
2.2.	Gerichtete PGHS-1 oder -2 Wirkung	92
2.3.	Auswahl der Drogen für die direkte Extraktion mit Dichlormethan	94
3.	Screening-Untersuchungen von Dichlormethanextrakten	95
3.1.	Bestimmung der halbmaximalen Hemmwerte und der PGHS-1/-2 Ratio	97
3.2.	Fraktionierung ausgewählter Drogen und Testung der Fraktionen	100
3.2.1.	Clematidis radix	100
3.2.2.	Chaenomelis fructus	101
3.2.3.	Acori graminei rhizoma	101
3.2.4.	Cephalanoploris herba	102
3.2.5.	Taraxaci herba	103
4.	Screening-Untersuchungen von Extrakten und einzelnen lipophilen Inhaltsstoffen aus Angelicae dahuricae radix	104
4.1.	Vergleich der sukzessiv hergestellten Extrakte und IC ₅₀ -Bestimmung des Dichlormethanextraktes	104
4.2.	Testung von Einzelkomponenten aus Angelicae dahuricae radix	105
5.	Diskussion	107

E PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU PLATYCODI RADIX „JIEGENG“ 114

1. Allgemeine Übersicht	114
1.1. Beschreibung der Pflanze und der Droge	114
1.2. Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin	116
1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe und pharmakologische Untersuchungen	117
2. Ergebnisse eigener Untersuchungen	119
2.1. Chromatographische Untersuchungen	119
2.1.1. Dünnschichtchromatographischer Vergleich verschiedener Extrakte	119
2.1.2. HPLC-Fingerprintanalyse und Vergleich unterschiedlich lipophiler Extrakte	121
2.2. Extraktion mit Dichlormethan und Fraktionierung	121
2.3. Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus dem Dichlormethanextrakt	123
2.4. Quantifizierung der Fettsäuren	125
2.5. Pharmakologische Untersuchungen	127
2.5.1. Wirkung der Extrakte und Fraktionen in den PGHS-1/-2 Screening-Assays	127
2.5.2. Wirkung der Fettsäuren im PGHS-1/-2 Screening-Assay	129
2.5.3. Wirkung von Platycodin D und Platycodin D3	130
2.5.4. Korrelation zwischen Extraktwirkung und Linolsäuregehalt	131
3. Diskussion	133

F PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU CHAENOMELIS FRUCTUS („MUGUA“) 137

1. Allgemeine Einführung	137
1.1. Beschreibung der Pflanze und der Droge	137
1.2. Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin	139
1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe und pharmakologische Wirkungen	139
2. Ergebnisse eigener Untersuchungen	140
2.1. HPLC-Fingerprintanalyse	140
2.1.1. Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels	141
2.1.2. Vergleich verschiedener Drogenmuster	141

2.2.	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	144
2.2.1.	Fließmitteloptimierung	144
2.2.2.	Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Extrakte	147
2.2.3.	Vergleich der Dichlormethanextrakte verschiedener Drogenmuster	147
2.3.	Extraktion zur Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus dem Dichlormethanextrakt	148
2.4.	Fraktionierung des Dichlormethanextraktes	148
2.5.	Isolierung und Identifizierung der Triterpensäuren	149
2.5.1.	Allgemeines zum Vorkommen von Triterpensäuren in Rosaceen und deren Strukturaufklärung	149
2.5.2.	Identifizierung von TTS1: Oleanolsäure	152
2.5.3.	Identifizierung von TTS2: Pomolsäure	158
2.5.4.	Identifizierung von TTS3: Euscaphissäure und Tormentolsäure	167
2.5.5.	Identifizierung von TTS4: 2 α ,3 β -Dihydroxyoleanolsäure (Maslinsäure)	175
2.5.6.	Identifizierung von TTS5: 3 β -O-Acetylsolsäure	178
2.5.7.	Identifizierung von TTS6: 3 β -O-Acetylpomolsäure	183
2.5.8.	Identifizierung von TTS7: Pirolonsäure	189
2.6.	Weitere Verbindungen	191
2.6.1.	Identifizierung von A1: Nonacosan-10-ol	191
2.6.2.	Paraffine	193
2.6.3.	Phytosterole (β -Sitosterol, Campesterol)	194
2.7.	Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes	194
2.8.	Pharmakologische Untersuchungen	195
2.8.1.	Vergleichende Untersuchungen verschiedener Extrakte	195
2.8.2.	Untersuchungen der Fraktionen des Dichlormethanextraktes von <i>Chaenomelis fructus</i> (Drogenmuster B99)	197
2.8.3.	Untersuchung der Triterpensäuren aus dem Dichlormethanextrakt von <i>Chaenomelis fructus</i>	198
2.8.4.	Pharmakologische Testung weiterer Bestandteile des Dichlormethanextraktes	202
3.	Diskussion	203
G	ZUSAMMENFASSUNG	214

H	EXPERIMENTELLER TEIL	218
1.	Pharmakologische Untersuchungen	218
1.1.	Herstellung der Mikrosomenpräparationen	218
1.1.1.	Mikrosomengewinnung aus Schafsamenblasen	218
1.1.2.	Mikrosomengewinnung aus Schafcotyledonen	218
1.1.3.	Isolierung von Zellkernen aus Schafcotyledonen	220
1.2.	Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode	220
1.3.	Elektrophoretische Untersuchungen zur Identifizierung von PGHS-1 und PGHS-2	221
1.4.	Herstellung der Reagenzien für die Enzymassays	224
1.4.1.	Pufferherstellung	224
1.4.2.	Enzymverdünnung	224
1.4.3.	Herstellung und Einstellung der Konzentration der Hematinlösung	225
1.4.4.	Bereitung der Lösungen anderer Cofaktoren	226
1.4.5.	Behandlung des Substrates Arachidonsäure	227
1.4.6.	Probenvorbereitung	227
1.4.7.	Herkunft der Positivkontrollen und synthetischer Hemmstoffe	227
1.5.	Durchführung der PGHS-1 /PGHS-2 Screening-Assays	228
1.6.	Bestimmung der Arachidonsäuremetabolite	229
1.7.	Detektion von PGE ₂ mit EIA (Enzym-Immuno-Assay)	232
2.	Phytochemische Untersuchungen	234
2.1.	Herkunft des Drogenmaterials und der Referenzsubstanzen	234
2.1.1.	Drogenmaterial zum pharmakologischen Screening	234
2.1.2.	Drogenmaterial zur Isolierung von Inhaltsstoffen	234
2.1.3.	Referenzsubstanzen	235
2.2.	Extraktionsverfahren	236
2.2.1.	Soxhletextrakte für das pharmakologische Screening	236
2.2.2.	Soxhletextraktion für phytochemische Untersuchungen von Platycodi radix („Jiegeng“)	236
2.2.3.	Soxhletextraktion für phytochemische Untersuchungen von Chaenomelis fructus („Mugua“)	236
2.2.4.	Dekokte	237
2.3.	Chromatographische Arbeitsmethoden	237
2.3.1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	237
2.3.2.	High-Performance-Liquid Chromatographie (HPLC)	240
2.3.3.	Offene Säulenchromatographie (SC)	242
2.3.4.	Vakuumflüssigchromatographie (Vacuum Liquid Chromatography, VLC)	243
2.3.5.	Mitteldruck-Säulenchromatographie (MPLC)	244
2.3.6.	Gaschromatographie (GC)	245

2.4.	Spektroskopische und physikalische Arbeitsmethoden	247
2.4.1.	Schmelzpunktbestimmung	247
2.4.2.	UV-Spektroskopie	247
2.4.3.	IR-Spektroskopie	247
2.4.4.	Massenspektrometrie (MS)	247
2.4.5.	NMR-Spektroskopie	248
2.5.	Gekoppelte Analysenverfahren	249
2.6.	Gehaltsbestimmung von Fettsäuren	249
2.6.1.	Herstellung der Fettsäuremethylster	249
2.6.2.	GC-Gehaltsbestimmung	250
2.7.	Isolierung und Identifizierung der Inhaltsstoffe aus <i>Platycodi radix</i>	251
2.7.1.	Fraktionierung und Isolierung	251
2.7.2.	Prüfung auf Anwesenheit von Saponinen	252
2.8.	Isolierung der Inhaltsstoffe aus <i>Chaenomelis fructus</i>	253
2.9.	Physikalische und spektroskopische Daten	256
2.9.1.	Inhaltsstoffe aus <i>Platycodi radix</i>	256
2.9.2.	Inhaltsstoffe aus <i>Chaenomelis fructus</i>	259
I	ANHANG	264
J	LITERATUR	270

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
Api	Apiose
Ara	Arabinose
Arg	Arginin
ASS	Acetylsalicylsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CI	chemische Ionisation
COSY	correlated spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektion /-detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	Direkteinlass chemische Ionisation
DCM	Dichlormethan
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
EDTA	DiNatriummethyldiaminotetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EIA	Enzym-Immuno-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektion
GI	gastrointestinal
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
GSH	reduziertes Glutathion
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
Hex	n-Hexan
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence

HTS	High-Throuput-Screening
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IL-1	Interleukin-1
IR	Infrarot
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LC	Flüssigchromatographie
LD ₅₀	50 % der letalen Dosis
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MPLC	Mitteldruckflüssigchrmoatographie
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektroskopie
NF-κB	Nuclear Faktor-κB
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PG	Prostaglandin
PGHS	Prostaglandin-H-Synthase
Rf	Retentionsfaktor (DC)
Rha	Rhamnose
RP	reversed phase (Umkehrphase)
Rt	Retentionszeit (GC, HPLC)
Ser	Serin
TCM	traditionelle chinesische Medizin
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Licht
VLC	Vacuum-liquid-chromotography
v _{max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
vs.	versus
Xyl	Xylose
ZNS	zentrales Nervensystem



A Einleitung

Schmerzen, Entzündungen, Fieber und sonstige Symptome rheumatischer Erkrankungen sind Hauptindikationsgebiete für die Anwendung von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR). Die Langzeitbehandlung mit diesen Mitteln ist häufig verbunden mit schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Magenblutungen und -ulzera bis hin zu Perforationen oder auch Nierenschäden. Die Hospitalisierungsrate ist sehr hoch. Allein 1998 wurden deshalb in Deutschland 11000 Patienten ins Krankenhaus eingewiesen, 2000 starben schließlich (BOLTEN et al., 1999).

Durch die Entdeckung und Funktionserklärung der Prostaglandin-H-Synthase (PGHS) durch Sir John Vane (1971) wurden die Nebenwirkungen erklärbar und als unvermeidbar bei der Behandlung mit NSAR akzeptiert. Diese Arzneistoffgruppe hemmt das Enzym PGHS, das die ersten beiden Reaktionsschritte der Umwandlung von Arachidonsäure zu den verschiedenen Prostaglandinen katalysiert (Abbildung A.1). Prostaglandine sind Gewebeshormone, die lokale, auf verschiedene Zelltypen beschränkte Wirkungen besitzen. Sie erfüllen damit physiologische Funktionen wie den Schutz der Magenschleimhaut (PGI_2 / PGE_2) oder die Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes in der Niere. Andererseits werden ihre Spiegel temporär bei Verletzung, Infektion oder Entzündung erhöht, wo sie als Mediatoren des Entzündungsgeschehens fungieren.

Die Entdeckung einer zweiten Isoform der PGHS (PGHS-2) im Jahr 1990 revolutionierte das Denkschema der unausweichlichen Zweiseitigkeit der NSAR. PGHS-2 ist induzierbar und wird vor allem bei Entzündungen exprimiert, ist jedoch im Magen normalerweise nicht vorhanden. Selektive Hemmstoffe dieses Enzyms versprachen Entzündungen, Schmerzen, Fieber und rheumatische Leiden zu verhindern, während die unerwünschten Nebenwirkungen am Magen ausbleiben sollten. Innerhalb von vier Jahren wurde die Kristallstruktur aufgeklärt und mit Hilfe der Kombinatorik und Molecular Modelling wurden selektive Hemmstoffe entwickelt. Weitere fünf Jahre später waren die ersten selektiven PGHS-2 Inhibitoren zugelassen und als potente und nebenwirkungsarme Arzneimittel bei schmerzhaften, entzündlichen Gelenkerkrankungen akzeptiert.

In der traditionellen chinesischen Medizin werden eine Vielzahl pflanzlicher Drogen erfolgreich in der Therapie von Entzündungen, Schmerzen und Rheuma verabreicht. Ihr gastrointestinales Nebenwirkungspotential ist äußerst gering. Teilweise werden die Drogen sogar gegen Magenleiden zusätzlich eingesetzt. Vielfach sind dabei der Wirkmechanismus und die

wirksamen Inhaltsstoffe der Drogen nicht geklärt, und ihre Anwendung kann bisher oft auf keine westlichen, rationalen Überlegungen zurückgeführt werden.

In dieser Arbeit sollte in einem breit angelegten **Screening** die Wirkweise verschiedener Drogen aus den oben genannten Indikationsgebieten untersucht werden, und insbesondere ihre Wirkung auf die beiden PGHS-Isoenzyme verglichen werden. Dafür sollte ein schneller, durchsatzstarker, für die Isoenzyme vergleichbarer **Screeningassay** entwickelt werden. Aus der Pflanzenvielzahl sollten einige wirksame Drogen ausgewählt und bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität auf die PGHS-Isoenzyme näher charakterisiert werden. **Phytochemische Untersuchungen und Testungen von Einzelsubstanzen** sollten anhand einer Beispieldropfpflanze zur Rationalisierung der Wirkweise der Droge beitragen.

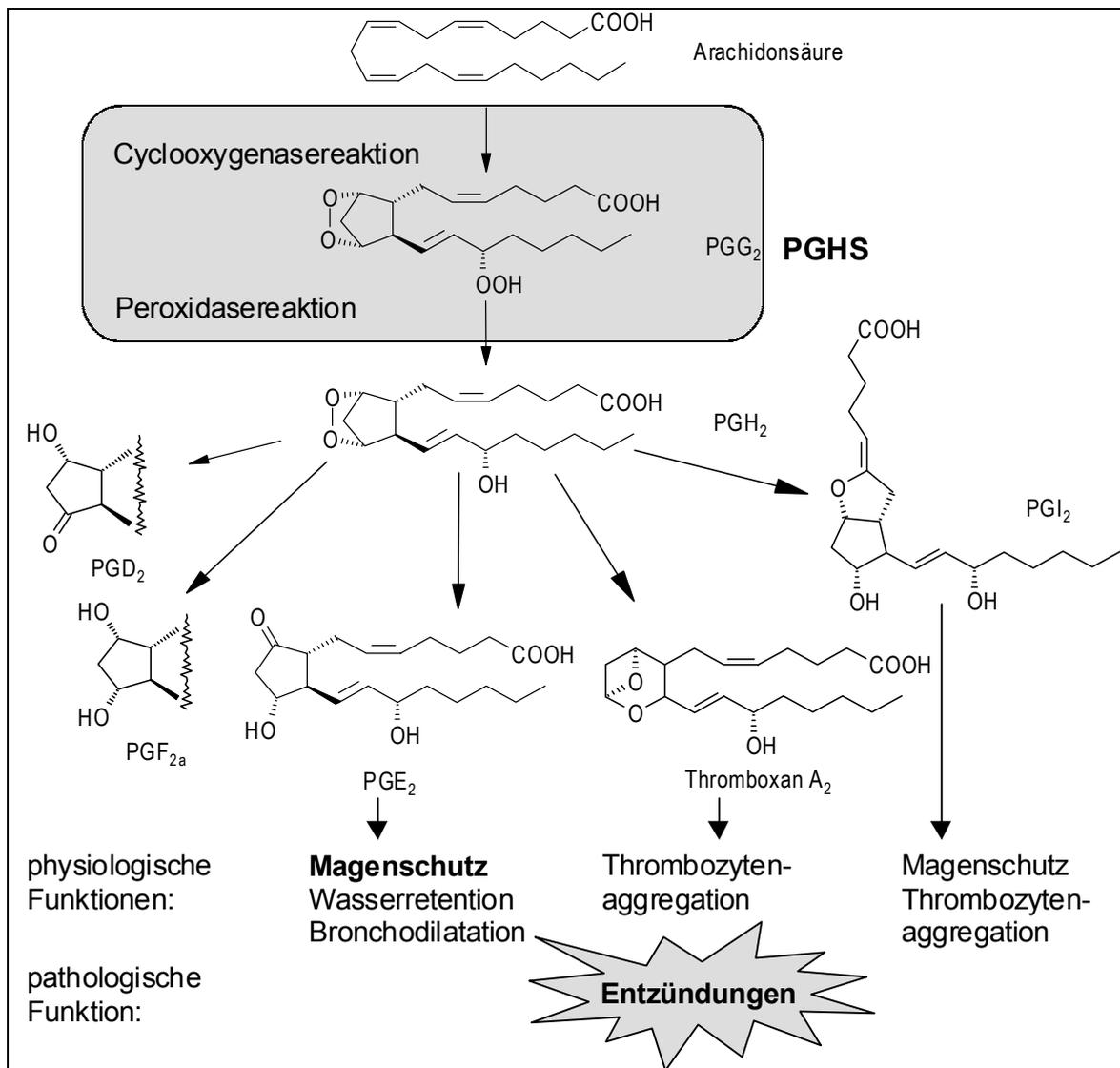


Abbildung A.1: Prostaglandinbiosynthese und Funktion einzelner Prostaglandine

B Prostaglandin-H-Synthase –1 und –2

Prostaglandin-H₂-Synthase (EC1.14.99.1; weitere Bezeichnungen sind: PGHS, Cyclooxygenase, COX, Prostaglandinendoperoxidsynthase) katalysiert die entscheidenden, ersten beiden Schritte in der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen aus Arachidonsäure (Abbildung A.1).

VANE beschrieb 1971 erstmals den Wirkmechanismus von Aspirin-ähnlichen Medikamenten und erkannte damit die PGHS als wichtiges Enzym im Entzündungsgeschehen (VANE, 1971). Anfang der 90er Jahre entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander (FU et al., 1990; O'BANION, 1991), dass durch bestimmte Stimuli wie Lipopolysaccharide, Cytokine (TNF- α , Interleukin-1) die Prostaglandinsynthese erhöht wird. Diese Beobachtung machte die Entdeckung einer zweiten, induzierbaren Isoform der Prostaglandin-H-Synthase möglich. Sie wurde als PGHS-2 oder auch COX-2 bezeichnet, während das konstitutive Enzym die Bezeichnung PGHS-1 oder auch COX-1 erhielt.

1. Molekularbiologie der PGHS-1 und –2

Zum besseren Verständnis der Expression und Regulation der beiden Isoenzyme ist es notwendig, die molekularbiologischen Grundlagen der beiden Enzyme anhand ihrer genetischen Organisation und Charakterisierung zu betrachten.

1.1. Genetische Charakterisierung

Das Gen der PGHS-1 ist beim Menschen auf dem Chromosom 9 lokalisiert. Es ist 22 kb lang und besteht aus 11 Exons und 10 Introns (KRAEMER et al., 1992). Es wird in eine 2,8 kb *mRNA* transkribiert, deren Translation zu einem 72 kDa großen Protein führt. Der Promotor des Gens besitzt keine TATA-Box (Abbildung B.1). Dies ist ein Merkmal vieler „housekeeping“ Gene. Ebenso enthält er keine Transkriptionselemente wie z.B. eine Bindungsstelle für NF- κ B, die Voraussetzung sind, um in bedeutendem Ausmaß Transkription zu induzieren (CROFFORD, 1997).

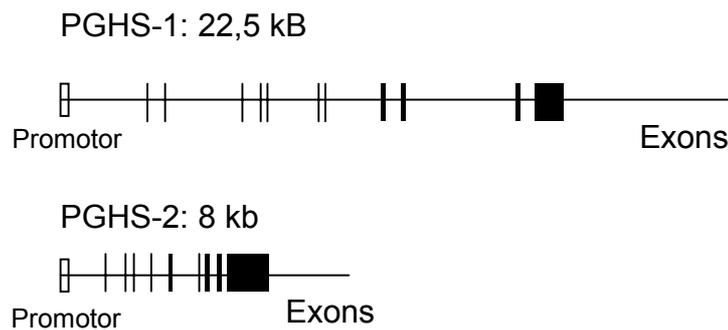


Abbildung B.1: Aufbau der Gene von PGHS-1 und PGHS-2 (CROFFORD, 1997)

Das Gen der humanen PGHS-2 ist dagegen auf Chromosom 1 lokalisiert. Die Anordnung der Exons und Introns entspricht denen der PGHS-1 mit dem Unterschied, dass Exon 1 und 2, die bei der PGHS-1 den Transkriptionsstart und das Signalpeptid enthalten, zu einem Exon verschmolzen sind. Die Introns der COX-2 sind kleiner, so dass das COX-2-Gen nur 8 kb lang ist. Daraus folgt die Möglichkeit der raschen Transkription der PGHS-2 (FLETCHER et al., 1992). Der Promotor der PGHS-2 besitzt eine TATA-Box und eine Reihe weiterer Bindungsstellen für Transkriptionselemente, die üblich für schnell hochregulierbare Gene sind. Dazu zählen beispielsweise Bindungsstellen für *cAMP*-, *NF-κB*- oder Glucocorticoide ebenso wie für andere im Entzündungsgeschehen wichtige Faktoren (HERSCHMAN et al., 1995; MITCHELL et al., 1999).

Im Gegensatz zur PGHS-1 enthält PGHS-2-*mRNA* ein lange 3' untranslatierte Region, an der verschiedene Polyadenylierungssignale und vermehrt „AUUUA“ Instabilitätssequenzen enthalten sind, die schnelle Degradation der *mRNA* vermitteln.

Damit unterscheidet sich die *mRNA* der PGHS-1 mit 2,8 kb von der *mRNA* von PGHS-2 mit 4,5 kb (VANE, 1998a).

Aus diesen Beobachtungen geht bereits hervor, dass PGHS-1 auf relativ konstantem Level konstitutiv unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben exprimiert wird. Man schreibt ihm „Housekeeping“-Funktionen zu, also Funktionen, die zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts im Organismus notwendig sind. PGHS-2 hat dagegen schon auf molekularbiologischer Ebene die optimalen Voraussetzungen für ein „immediate-early“ Gen, dessen Expression bei pathologischen Prozessen schnell hochreguliert werden kann und verschiedentlich induzierbar ist.

1.2. Struktur der beiden Isoenzyme

Obwohl die Gene der beiden Enzyme so verschieden sind, entsprechen sie sich sowohl in ihrer Proteinstruktur als auch in ihrer enzymatischen Funktion. Unterschiede tauchen am N-terminalen Ende in der Signalpeptidregion auf, an dem die PGHS-1 um 17 Aminosäuren

verlängert ist, und am C-terminalen Ende mit einer Erweiterung der PGHS-2 um 18 Aminosäuren gegenüber der PGHS-1. Der übrige Teil der Ketten beider Enzyme ist zu 75 % identisch. Alle Bereiche, die essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms sind, sind konserviert. Dies trifft auch bei den Prostaglandin-H-Synthasen verschiedener Tierarten zu. Die Proteinstruktur der menschlicher PGHS und der PGHS von Schafen, Mäusen und Hühnern ist zu ca. 60 % identisch (HLA, 1992). Dadurch wird ein interspezieller Vergleich der Enzyme möglich.

Beide Enzyme sind homodimere, Häm-abhängige, bifunktionelle Proteine (Abbildung B.1). Sie sind an drei bestimmten Punkten N-glykosyliert. Zusätzlich besteht am erweiterten C-terminalen Ende der PGHS-2 eine Glykosylierung.

Beide Enzyme sind monotopische, integrale Membranproteine, d.h. sie sind mit der Membran nicht über Transmembrandomänen, sondern über vier amphiphile α -Helices assoziiert. Ihre Struktur und Faltung sind wichtig für die Aktivität der Enzyme (SPENCER et al., 1999).

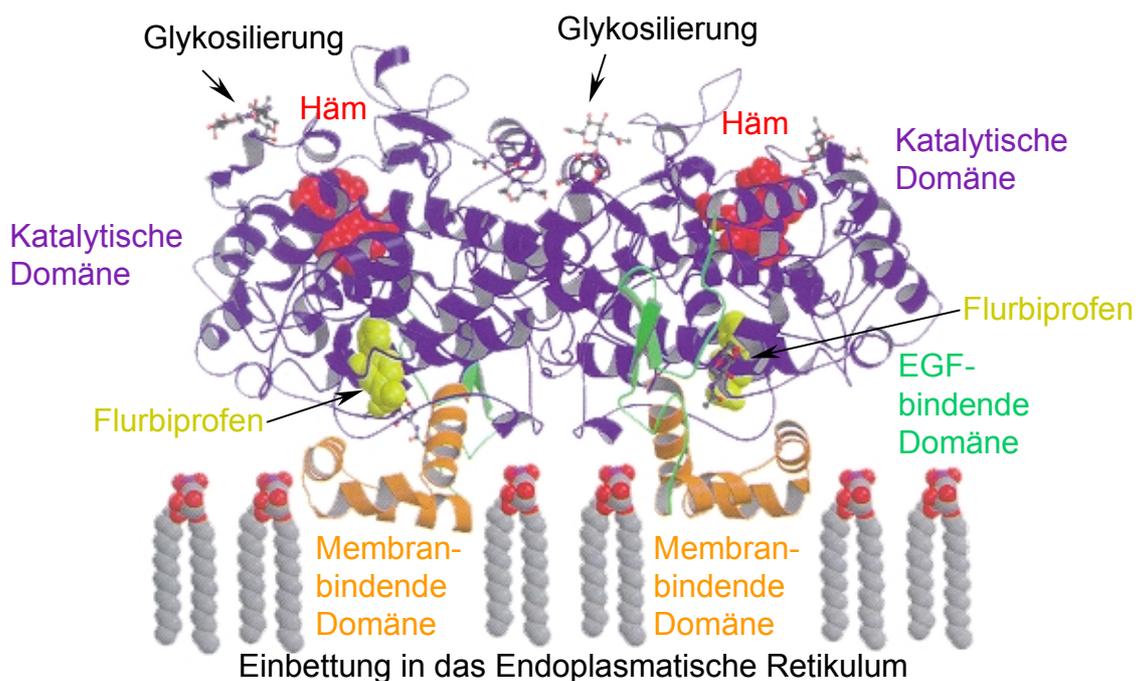


Abbildung B.1: Kristallstruktur eines Dimers der Schaf-PGHS-1 mit dem Hemmstoff Flurbiprofen (CROFFORD, 2000)

Die Polypeptidkette der humanen (h) PGHS-1 umfasst 599 Aminosäuren, die von hPGHS-2 604 Aminosäuren.

Die v_{\max} und K_m der Enzyme ist annähernd gleich groß für Arachidonsäure. PGHS-2 arbeitet jedoch weniger spezifisch als die PGHS-1 und setzt so effizienter auch andere Fettsäuresub-

strate wie z.B. Dihomo- γ -linolensäure oder Eicosapentaensäure um (LANEUVILLE et al., 1995).

PGHS-1 ist auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) und nur in Spuren an der Zellkernhülle lokalisiert (OTTO, 1994). PGHS-2 findet man dagegen cytoplasmaseitig am ER und in großem Ausmaß an der Zellkernhülle (MORITA et al., 1995). Aus dieser unterschiedlichen Verteilung der Enzyme in der Zelle wurde geschlossen, dass die beiden Isoenzyme unterschiedliche Arachidonsäurepools verwenden und PGHS-2 mit Zellkernrezeptoren interagiert und somit Einfluss auf die Zellentwicklung nimmt.

1.3. Regulation der Expression von PGHS-1 und PGHS-2

Die *mRNA* der PGHS-1 wird in beinahe allen Geweben gefunden, während nur einige differenzierte Zellen auch das PGHS-Protein exprimieren. In diesen Zellen sind die Enzymlevel beinahe immer konstant. Besonders hohe PGHS-1 Mengen werden in Samenblasen, Epithelzellen des Sammelrohrs der Niere, Intestinum, Endothelzellen der Gefäße, Blutplättchen, Monozyten und im Magen gefunden. Entwicklungsbedingt kommt es auch in einigen dieser Zellen zu einem starken Anstieg der PGHS-1 Menge. Beispielsweise finden sich in Schafsamenblasen kastrierter Böcke keine erhöhten Mengen PGHS-1. Diese Samenblasen werden auch höchstens 1/3 so groß wie die von unkastrierten Tieren (OTTO, 1995). Worauf diese Expression während der Zelldifferenzierung zurückgeht und welcher Teil des Genes aktiviert wird, ist noch nicht erforscht.

Das PGHS-2 Gen wird unter Normalbedingungen nur in sehr wenigen Zellen detektiert. Das aktive Enzym wird möglicherweise sogar unter physiologischen Bedingungen nicht gefunden (OTTO, 1995). Erst die Stimulation mit Wachstumsfaktoren, TPA (Tetradecanoylphorbolacetat), PMA (Phorbolmyristataacetat), entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-1 und Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Lipopolysacchariden (LPS) erhöht die PGHS-2 Expression gewaltig. PGHS-2 ist damit maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt. Diese Beobachtungen wurden in Fibroblasten, Synovialzellen, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen gemacht (siehe dazu Tabelle B.1 und weitere Übersicht in HERSCHMAN, 1996). Interessanterweise können nicht in allen Zellen die PGHS-2-Level mit den gleichen Stimuli heraufgesetzt werden. Je nach Zelltyp sind unterschiedliche Stimulanzen effektiv.

Glucocorticoide hemmen dagegen die Expression von PGHS-2. Der Mechanismus ist noch nicht erforscht, doch es werden sowohl transkriptionale als auch postskriptionale Einflussmöglichkeiten diskutiert (CROFFORD et al., 2000).

Tabelle B.1: Expression von PGHS-2 in verschiedenen Zelltypen

Zelltyp	Herkunft	Stimulus	Literatur
Makrophagen	Maus	LPS	LIANG et al., 1999
glatte Muskelzellen der Aorta	Ratte	Serum	PRITCHARD et al., 1993
Lungenadenokarzinomzelllinie	Mensch	IL-1 β	CROXTALL et al., 1996
Mesangialzellen	Ratte	IL-1	MARTIN et al., 1994
Makrophagen aus dem Bauchfell	Maus	Zymosan, LPS	TORDJMAN et al., 1995
Endothelzellen der Nabelvene	Mensch	PMA	CRÉMINON et al., 1995

Neuere Untersuchungen ergaben inzwischen, dass in einigen Geweben unter physiologischen Bedingungen PGHS-2 auch konstitutiv vorhanden ist. PGHS-2 wurde in Niere (vor allem in der Macula densa) (HARRIS et al., 1994; KOMHOFF et al., 1997), ZNS (BREDER et al., 1995), Ovar (JOHNSON et al., 1995), Plazenta (MACCHIA et al., 1997; ZHANG et al., 1996), Knochen, Knorpel und trachealen Epithelzellen (ASANO et al., 1996; WALENGA et al., 1996) konstitutiv exprimiert gefunden. Die PGHS-2 scheint deshalb ebenfalls eine wichtige Rolle in der physiologischen Funktion dieser Organe wie z.B. Regulation von Elektrolythaushalt, Blutvolumen und Blutdruckhomeostase zu spielen (HARRIS et al., 1994). Außerdem wurde eine basale Expression von COX-2-*mRNA* in Lunge, Uterus (WIMSATT et al., 1993), Leber, Prostata und Magen nachgewiesen (O'NEILL et al., 1993; ZIMMERMANN et al., 1998; HULL, 1999).

1.4. Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum des Enzyms besteht aus einem langen, engen Kanal (8 x 25 Å), welcher in der Mitte der membranassoziierten α -Helices liegt (Abbildung B.1). Dieser wird von hydrophoben Aminosäureresten gesäumt und ermöglicht dadurch den Zugang der hydrophoben Fettsäure-Substrate, ohne dass diese die Membran verlassen müssen. Der Kanal der PGHS-2 scheint etwas flexibler zu sein als der von PGHS-1, da die Akzeptanz verschiedener Substrate etwas größer ist als die der PGHS-1.

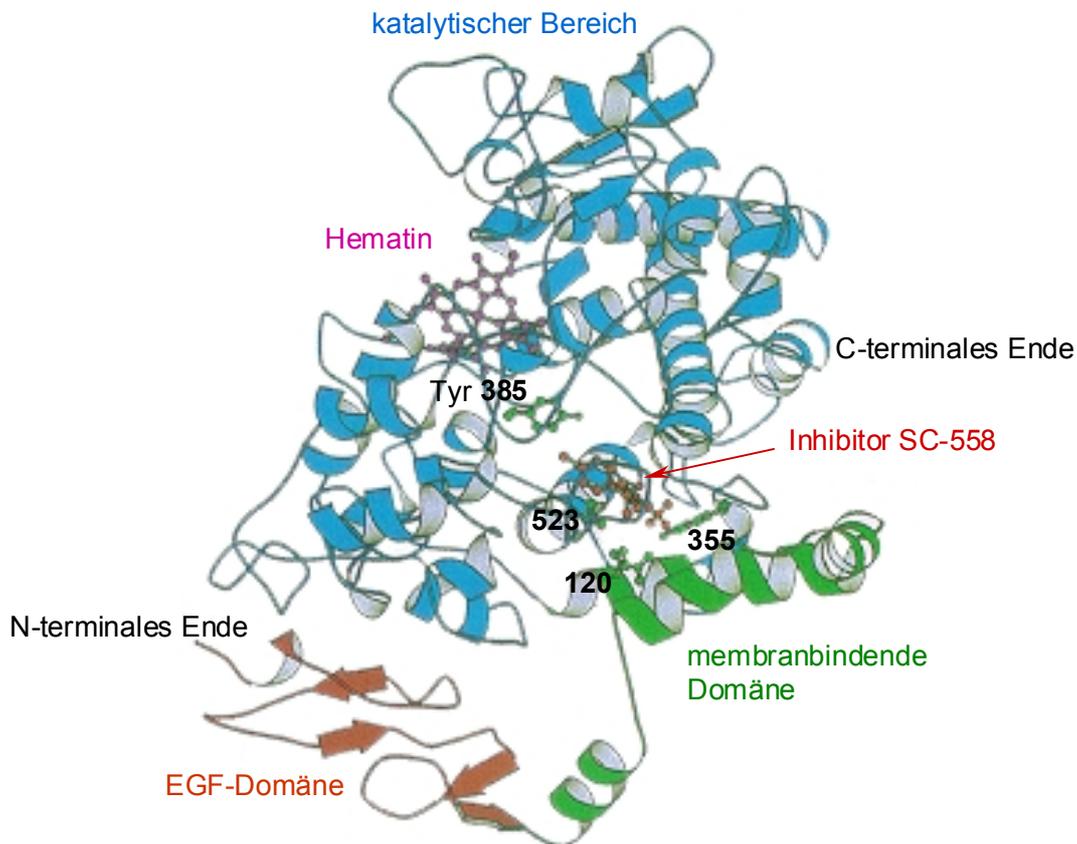


Abbildung B.1: Bandmodell des PGHS-2–SC558-Komplexes (selektiver PGHS-2 Hemmstoff); wichtige Aminosäuren und umliegende Domänen sind beschriftet (nach KURUMBAIL et al., 1996)

Am Ende des hydrophoben Kanals befindet sich mit Tyr 385 der katalytisch aktive Bereich des Enzyms (Abbildung B.2). Hier wird Arachidonsäure über eine Cyclooxygenase und eine Peroxidasereaktion zu Prostaglandin H_2 umgesetzt (vgl. Abbildung A.1). Die beiden Reaktionsschritte laufen nicht unabhängig voneinander ab (Abbildung B.3) (KULMACZ et al., 1994; TSAI et al., 1997). Cyclooxygenaseaktivität setzt das Vorhandensein eines Hydroperoxides und eine aktivierte Peroxidasefunktion voraus. Das Häm wird für beide Reaktionsschritte benötigt. Im ersten Schritt (1) geht dabei das Eisen des Hematins der PGHS in die höhere Oxidationsstufe über, was zugleich den Beginn der Peroxidasereaktion darstellt. Dabei wird dem Tyrosin 385 ein Elektron entrissen (2). Das entstandene Tyrosylradikal wird durch das 15-Peroxyradikal von PGG_2 regeneriert (7). Dies entsteht wiederum durch Anlagerung von O_2 an Position 13S (6) an ein Arachidonsäureradikal (5) (nach RUF, 1997

und TSAI et al., 1998). PGG₂ dient in dieser Reaktion sowohl als Initiator der Cyclooxygenasereaktion als auch als Substrat der Peroxidasereaktion.

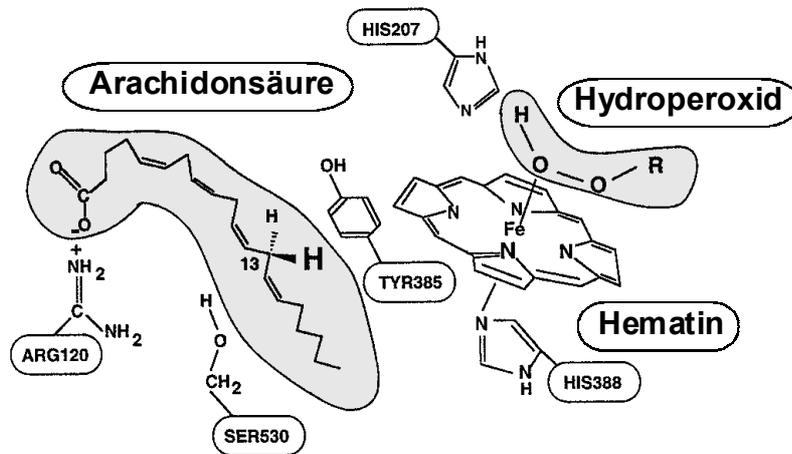


Abbildung B.2: Modell des aktiven Zentrums der PGHS mit wichtigen Aminosäuren (nach SMITH, 1996)

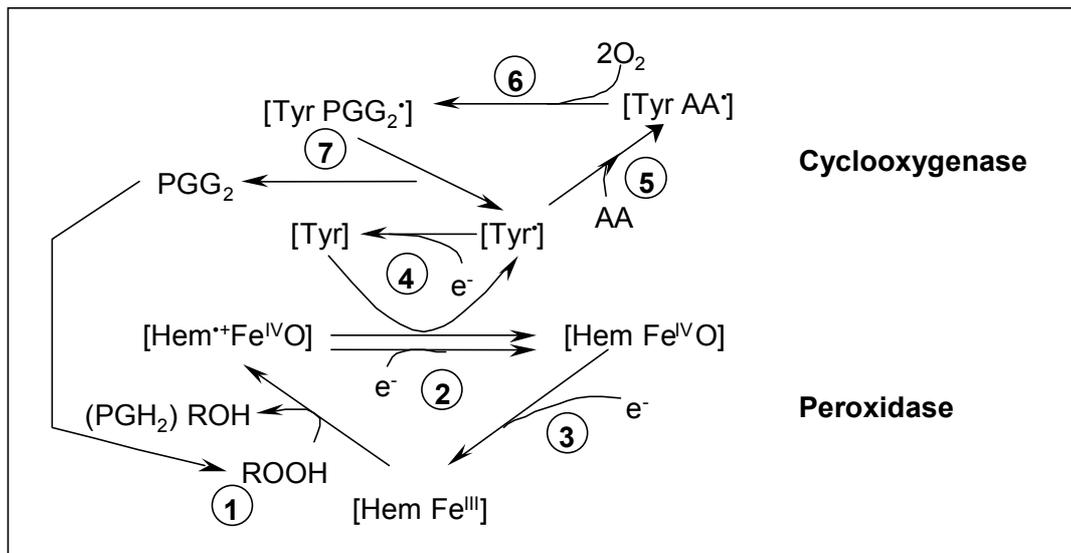


Abbildung B.3: Reaktionsmechanismus der Prostaglandin-H-Synthase nach RUF, 1997 (Tyr: Tyrosin; Hem Fe O: Oxoferrylporphyrin aus Hematin gebildet; Hem Fe: Hematin mit Zentralatom extra)

Auf einen Überschuss an Hydroperoxyden reagiert die PGHS durch Selbstinaktivierung (MARKEY et al., 1987), was physiologisch sinnvoll erscheint, da in der Zelle so die Überproduktion von Prostaglandinen vermieden wird.

Da die Kristallstruktur beider Isoenzyme bekannt ist (PICOT et al., 1994; KURUMBAIL et al., 1996), konnten auch weitere wichtige Aminosäuren im katalytischen Zentrum charakterisiert und ihr Einfluss auf die PGHS-Aktivität bzw. ihre Hemmung erforscht werden.

In Nachbarschaft zu Tyrosin befinden sich zwei Histidine. Einerseits wird hier das Hämoglobin gebunden (His 388), andererseits die Einlagerung des Substrates Arachidonsäure gerichtet (His 207) (GASPARD et al., 1996) und die Spaltung der O-O Bindung der Hydroperoxide in Zusammenspiel mit Glutamin (Gln 203) erleichtert (RUF, 1997).

Eine wichtige Position nimmt Arginin 120 im hydrophoben Kanal ein. Arg 120 liegt am Anfang des Tunnels und fungiert mit seiner positiv geladenen Guanidinium-Gruppe als Gegenion für die negativ geladene Carboxylgruppe der Arachidonsäure und der sauren NSAR. Dadurch sorgt es für die richtige Ausrichtung des Substrates zum aktiven Zentrum der PGHS (MANCINI et al., 1995; PICOT et al., 1994; RIEKE et al., 1999). Auf der Gegenseite liegt Tyr 355. Es beeinflusst die Stereospezifität der PGHS gegenüber NSAR (MARKEY et al., 1987).

Serin 530 ist die Aminosäure im katalytischen Bereich, die von Acetylsalicylsäure acetyliert wird. Serin ist nicht direkt an der Enzymaktivität beteiligt, jedoch ragt nach Acetylierung die Acetylgruppe dann so weit in den Kanal, dass die Bindung von Arachidonsäure unterbrochen wird. Durch die entstandene kovalente Bindung hemmt ASS PGHS irreversibel. In PGHS-1 wird die Aktivität des Enzyms komplett zerstört. Bei PGHS-2 jedoch ist der Kanal etwas offener, so dass eine Restaktivität bleibt, mit der PGHS-2 Arachidonsäure zu 15-HETE (15-Hydroxyeicosatetraensäure) oxidiert (LOLL et al., 1995; MEADE et al., 1993).

Der größere Kanal der PGHS-2 kommt durch den Austausch einer einzigen Aminosäure zustande. Während an Position 509 bei PGHS-1 sich das voluminöse Isoleucin befindet, nimmt statt dessen bei PGHS-2 Valin diese Position ein (GIERSE et al., 1996). Dies führt dazu, dass eine Seitentasche („side pocket“), die vom hydrophoben Tunnel abzweigt, bei PGHS-2 leichter zugänglich ist. Bei der PGHS-1 existiert diese Seitentasche ebenfalls, jedoch ist sie aufgrund der größeren Seitenkette des Isoleucins nicht gut zugänglich. Der kleine Unterschied einer einzigen Aminosäure und die damit entstandene größere Seitentasche im Enzym ermöglicht eine selektive Hemmung der PGHS-2 (GUO et al., 1996). So besitzen viele der entwickelten spezifischen COX-2 Hemmer einen Arylsulfonrest, der sich nur in die offene Seitentasche der PGHS-2 einlagern kann.

In der gleichen Region besteht noch ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Isoenzymen. An Position 513 steht bei PGHS-1 Histidin, bei PGHS-2 Arginin. Weil die Seitenkette von Arginin zum aktiven Zentrum gerichtet steht, bleibt der Kanal offener und Arachidonsäure kann in anderer Konformation als bei PGHS-1 binden. Dadurch kann auch die veränderte Aktivität von acetylierter PGHS-2 erklärt werden: Arachidonsäure erreicht in

geänderter Konformation das aktive Zentrum und wird deshalb nicht zu PGH₂, sondern zu 15-HETE umgesetzt (ROWLINSON et al., 2000).

Eine Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften von PGHS-1 und -2 gibt Tabelle B.1:

Tabelle B.1: Übersicht über die biochemischen Eigenschaften der PGHS-Isoenzyme nach HINZ et al., 1999

	PGHS-1	PGHS-2
Molekulargewicht	71 kDa	71 kDa
Aminosäuren	599	604
DNA-Codierung	22 kb	8,3 kb
		„immediate response“ Gen
Exon / Intron	11 E / 10 I	10 E / 9 I
mRNA	2,8 kb	4,5 kb
Homologität	ca. 60 %	
Lokalisation in der Zelle	Endoplasmatisches Retikulum (cytoplasmaseitig)	Endoplasmatisches Retikulum, Kernmembran
Funktion in der Zelle	autocrin oder paracrin	intracrin
Substratumsetzung	K _m und v _{max} sind für Arachidonsäure ähnlich	
Substrate	Arachidonsäure 20 : 4 > 30 : 3 Dihomo- γ -linolensäure	18 C und 20 C: Arachidonsäure, Dihomo- γ -linolensäure, Eicosapentaensäure, γ -Linolensäure, α -Linolensäure, Linolsäure
Expression	konstitutiv induzierbar /hoch-reguliert (z.B. durch Hormone)	induzierbar konstitutiv in Gehirn, Lunge, Niere, u.a.
Hemmung der Expression		Glucocorticoide, IL-4, IL-10, IL13
Aspirin	Acetylierung von Ser 530; komplette Blockade	Acetylierung von Ser 516; teilweise Blockade, 15-HETE Produktion

2. Hemmung der PGHS-Isoenzyme

2.1. Hemmmechanismen

Bei Enzymhemmung unterscheidet man zwischen verschiedenen Hemmtypen:

a) Irreversible Hemmung

Der Inhibitor geht mit dem Enzym einen irreversiblen Komplex ein, der die Aktivität des Enzyms herabsetzt und sich aber nicht wieder trennen lässt. Diese Art der Hemmung findet durch die Acetylierung von PGHS durch Acetylsalicylsäure statt (siehe oben) (LOLL et al., 1995; MEADE et al., 1993; GARAVITO, 1999).

b) Reversible, kompetitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung liegt eine Konkurrenzreaktion zwischen Substrat und Inhibitor am aktiven Zentrum vor. Diese Hemmung ist konzentrationsabhängig bzgl. des Substrates bzw. des Inhibitors.

Typische Vertreter dieses Hemmtypes bei PGHS ist beispielsweise Ibuprofen (LANEUVILLE et al., 1994). Auch verschiedene ungesättigte Fettsäuren agieren als kompetitive Substrate der PGHS.

c) Reversible, nicht-kompetitive Hemmstoffe

Nicht-kompetitive Hemmstoffe hemmen das Enzym außerhalb des aktiven Zentrums. Tyr 385 wird hierbei nicht beeinflusst. Dieser Hemmmechanismus wird bei einigen Antioxidantien mit Radikalfängereigenschaften beobachtet. Sind sie in hoher Konzentration im Assaymedium vorhanden, fangen sie die zur Aktivierung der Cyclooxygenaseaktivität notwendigen Radikale ab und bedingen dadurch eine Enzymhemmung. Apigenin, Quercetin und andere phenolische Substanzen, von denen topisch auch einige gegen Entzündungen eingesetzt werden, gehören diesem Hemmtypus an (ALANKO et al., 1993; AMMON et al., 1996)

Einige Inhibitoren wie beispielsweise Indometacin, Flurbiprofen und Meclofenamat zeigen eine Zwischenform der Hemmtypen. Ihre Hemmung wird als „time-dependent, reversibel“ bezeichnet. Die Inhibitoren bilden zwar den typischen Komplex zwischen Enzym und reversiblen, kompetitivem Inhibitor, jedoch kann der Hemmstoff erst nach Ausrichtung einer Seitenkette langsam wieder abdissoziieren.

Über kristallographische Analyse konnte festgestellt werden, dass Flurbiprofen im langen hydrophoben Kanal bindet. Es bildet dabei mit Arg 120 am Carboxylende eine Salzbrücke. Van der Waalkräfte binden die Arylringe. Indometacin bindet nach dem selben Mechanismus, ragt aber besonders weit in den hydrophoben Kanal. Diese beiden unspezifischen Hemmstoffe besetzen die „side-pocket“ nicht (WU, 1998). Interessanterweise interagiert ASS nicht nur mit

Ser 530 durch Acetylierung, sondern die Salicylsäure bindet zusätzlich über eine Salzbrücke zu Arg 120 und Glutaminsäure 524, das sich auf der Gegenseite befindet (MITCHELL et al., 1997).

2.2. Selektive Hemmung und selektive Hemmstoffe

Die gebräuchlichen nichtsteroidalen Antirheumatika wie ASS, Ibuprofen, Indometacin und Diclofenac hemmen verstärkt die PGHS-1. Dieser Hemmung werden auch die schwerwiegenden Nebenwirkungen am Gastrointestinaltrakt mit Ulzeration, Blutungen und Perforationen sowie an den Nieren und im ZNS zugeschrieben.

„Selective inhibitors of COX-2 will be antiinflammatory but cause less harm to the stomach“ (Sir John Vane, 16th William Harvey Research Conference, London, October 1995). Diese Annahme führte zur Entwicklung zahlreicher präferenzzieller und einiger selektiver PGHS-2 Hemmstoffe.

Der Hemmmechanismus der meisten bisher bekannten selektiven PGHS-2 Hemmstoffe wie Meloxicam, NS-398, Celecoxib und Rofecoxib ist „reversibel, time-dependent“ wie oben beschrieben (Abschnitt 2.1), jedoch kann ihre Sulfongruppe die größere Seitentasche von PGHS-2 besetzen. Die Selektivität ist dabei abhängig vom Oxidationsgrad des Schwefels. Sulfide und Sulfoxide sind nicht selektiv oder unwirksam (MARNETT et al., 1999).

Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen jedoch, dass nicht allein eine Sulfonamidgruppe PGHS-2 Selektivität bewirkt, sondern bei Diarylheterozyklen verschiedene Möglichkeiten für selektive Bindung bestehen (KURUMBAIL et al., 1996; LOLL et al., 1996).

Feine Strukturänderungen nicht-selektiver Stoffe wie Indometacin oder ASS (vgl. unten, Punkt d)) führen aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den beiden Enzymen oft schon zu deutlicher Präferenz für eines der Isoenzyme (KALGUTKAR et al., 1998; BHATTACHARYYA et al., 1995). Das Salicylsäurederivat APHS (*o*-(Acetoxyphenyl)-hept-2-ynylsulfid) wirkt beispielsweise PGHS-2 selektiv, Valerylsalicylsäure dagegen hemmt verstärkt die PGHS-1 (vgl. unten Punkt d)).

Selektive Hemmstoffe lassen sich chemisch in vier Gruppen einteilen (nach TALLEY, 1999):

a) Methansulfonamidanderivate:

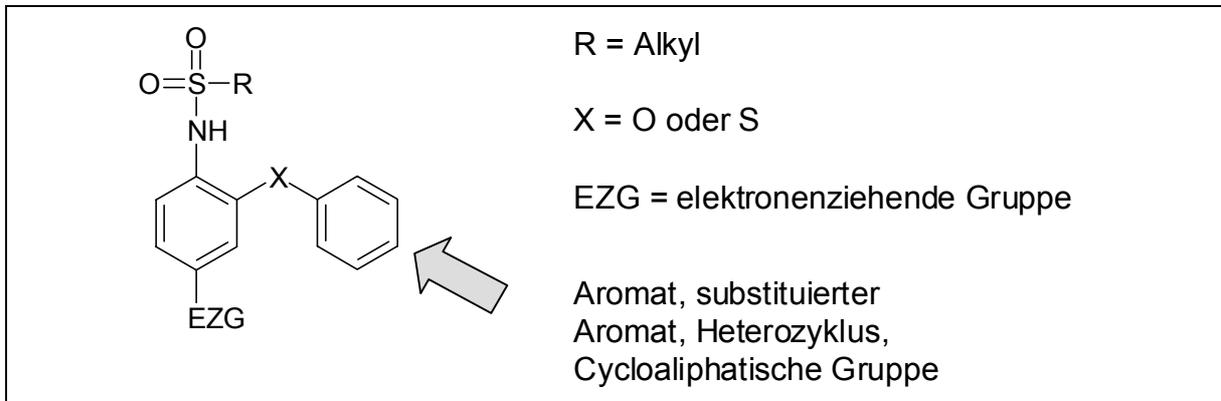
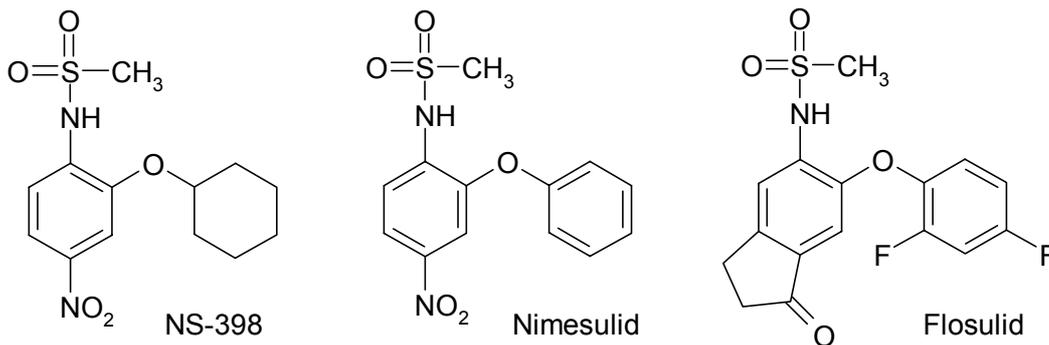


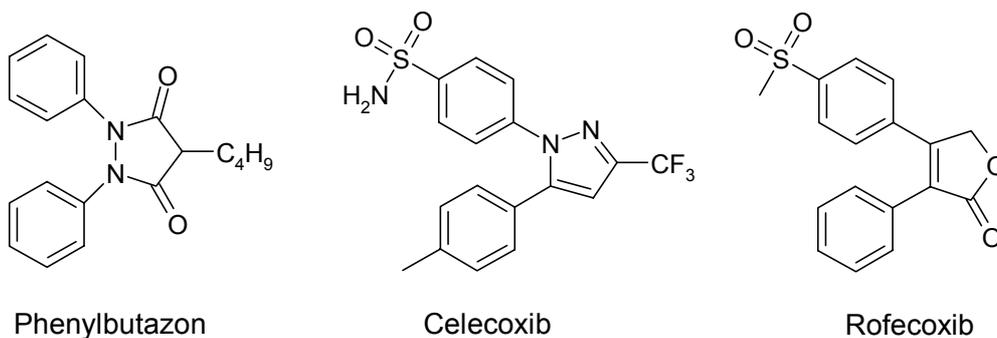
Abbildung B.1: Allgemeine Struktur der Sulfonanilin-PGHS-Inhibitoren

Zu dieser Gruppe gehört z.B. Nimesulid (CULLEN et al., 1998; TAVARES et al., 1995), NS-398 (FUTAKI et al., 1994; HUFF et al., 1995; OUELLET et al., 1995) und Flosulid.



Der gemeinsame Grundkörper leitet sich vom Alkylsulfonanilin ab. Wichtig für die selektive Wirkung ist dabei die Sulfonamidgruppe, welche die größere Seitentasche der PGHS-2 besetzt. Die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe beeinflusst vor allem die Hemmstärke (LI et al., 1995). Bessere orale Bioverfügbarkeit wird in vielen Fällen durch Austausch des Ethers durch einen Thioether erreicht (z.B. L-745337; BOYCE et al., 1994)

b) Diarylheterozyklen

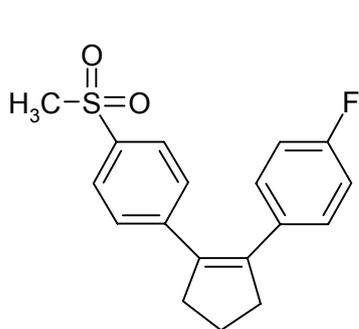


In dieser Gruppe wurden die größten Fortschritte erzielt. Inzwischen sind Rofecoxib und Celecoxib als Vertreter dieser Gruppe am Arzneimittelmarkt zugelassen.

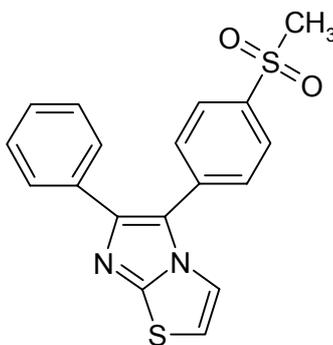
Als erster Hemmstoff dieser Klasse kann Phenylbutazon gelten. Coxibe zeichnen sich durch einen zentralen Zyklus aus. Dieser ist essentiell, da er als Abstandhalter zwischen den beiden Aromaten dient (TALLEY, 1999).

Selektive Wirkung zeigen in dieser Stoffklasse

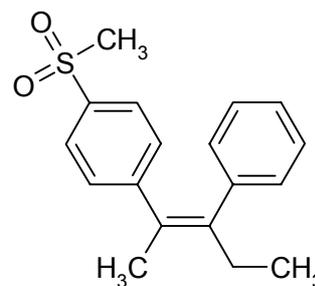
- 4-Ringsysteme (Cyclobutenderivate, FRIESEN, 1998)
- 5-Ringcarbozyklen (Cyclopentenderivate, z.B. SC-57666, LI, 1995)
- 5-Ringheterozyklen: Pyrrole, Furane (Rofecoxib), Oxazole, Isoxazole, Thiazole, Isothiazole, Imidazole, Pyrazole (Celecoxib) u.a.
- 6-Ringcarbo-und Heterozyklen sowie zentrale Bicyclen: z.B. L-766112 (RIENDEAU et al., 1997)



SC-57666



L-766112

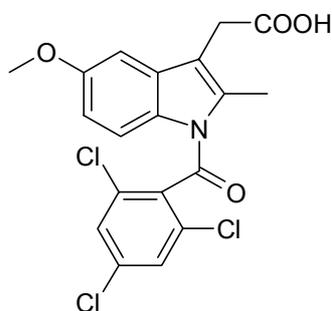


cis-Stilbenderivat

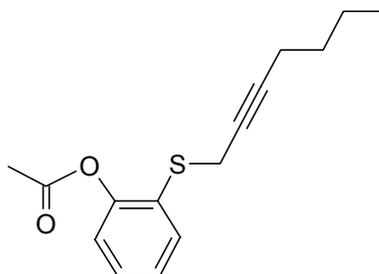
c) 1,2 Diarylethylenderivate (Stilbene)

Nur *cis*-Stilbenderivate besitzen PGHS-2 selektive Wirkung.

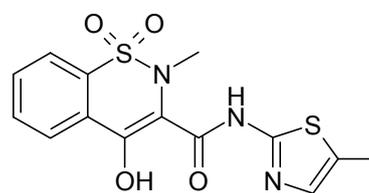
d) Modifikationen bekannter NSAR



L-748780



APHS



Meloxicam

Das Trichlorphenylanaloge von Indometacin (L-748780) und APHS = *o*-(Acetoxyphenyl)-hept-2-ynylsulfid (KALGUTKAR et al., 1998), dem ASS als Leitstruktur diene, zeigen verstärkte PGHS-2 Selektivität. Auch Meloxicam als Weiterentwicklung des Piroxicams zeigt leichte Präferenz für das induzierbare Enzym.

Im Laborversuch sind weitere Hemmstoffe mit Diaryl- und Aryl- bzw. Heteroarylketonstruktur und mit antioxidativer Komponente getestet worden, die besser die PGHS-2 als die PGHS-1 hemmen (DANNHARDT et al., 2000).

Üblicherweise wird die Einteilung der NSAR nicht nach chemischen Gesichtspunkten, sondern nach den pharmakologischen Eigenschaften der Stoffe vorgenommen (Abbildung B.2) (FRÖLICH, 1997; LIPSKY et al., 1998; STICHTENOTH et al., 1998):

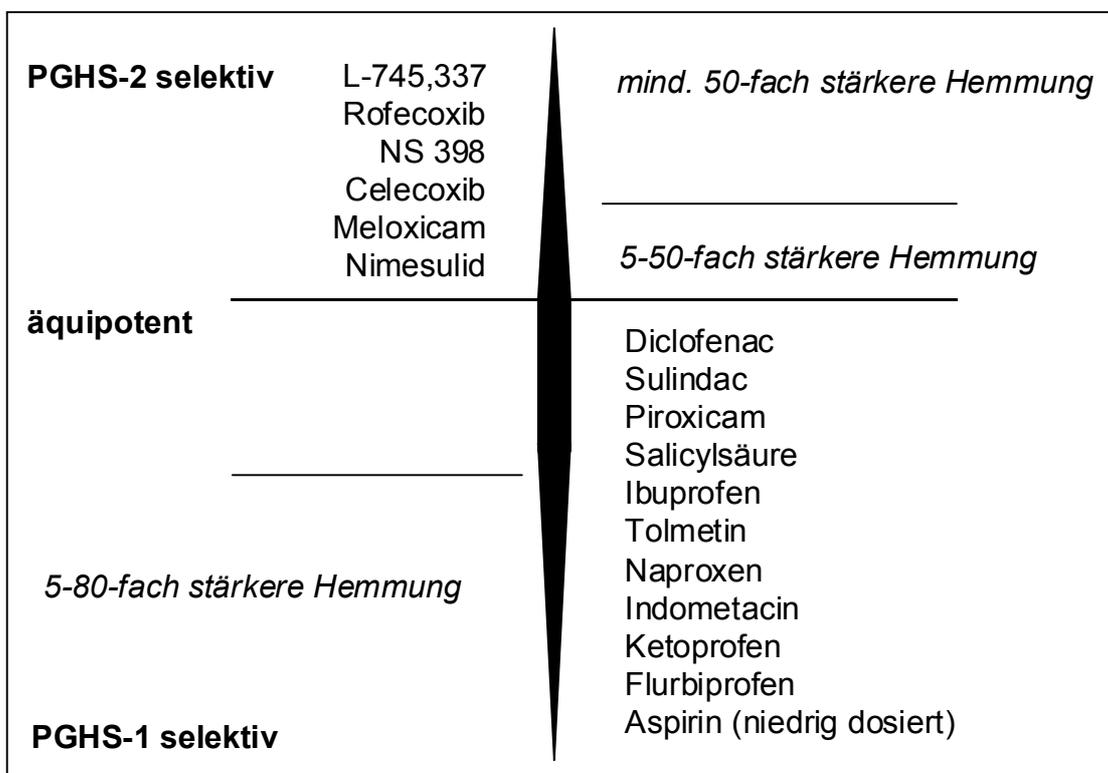


Abbildung B.2: Zuordnung einzelner Wirkstoffe nach ihrem pharmakologischen Wirkprofil (nach WARNER et al., 1999, und CROMLISH et al., 1996); Hemmstärke nach IC_{80} -Ratio

a) Selektive COX-1-Inhibitoren

Zu dieser Gruppe wird bisher nur die niedrig dosierte ASS gerechnet. Sie hemmt die COX-1 in den Blutplättchen.

b) Nicht-selektive COX-Inhibitoren

Sie zeigen geringe Unterschiede in ihren Dosis-Wirkungsbeziehungen und hemmen in gleicher Intensität PGHS-1 und PGHS-2 (z.B. Diclofenac, Ibuprofen).

c) Präferentielle COX-2-Inhibitoren

In höherer Dosierung wird nicht nur PGHS-1, sondern auch PGHS-2 gehemmt. Diese Inhibitoren hemmen normalerweise PGHS-2 2-10fach stärker (z.B. Meloxicam, Nimesulid).

d) Selektive COX-2-Inhibitoren

Auch in maximaler Dosierung wird die Aktivität der PGHS-1 von diesen Stoffen noch nicht beeinflusst. Sie hemmen bis zu 100mal besser das induzierbare Enzym (z.B. Rofecoxib, Celecoxib, NS 398).

2.3. Charakterisierung der Hemmstärke und Selektivität von PGHS-Hemmstoffen

Ob ein Arzneistoff Selektivität für eines der beiden Enzyme besitzt oder äquipotent hemmt, muss a) enzymatisch und biochemisch, b) pharmakologisch und c) klinisch getestet werden.

Zur Bestimmung der **enzymatischen und biochemischen** Charakteristik eines Inhibitors bzgl. seiner Hemmstärke und Selektivität eignen sich *in vitro* Testsysteme.

Seit Entdeckung der PGHS-2 wurden viele verschiedene Testsysteme entwickelt (vgl. Tabelle B.1). Sie unterscheiden sich in der Herkunft der verwendeten Enzyme, in den Inkubationszeiten, den Reaktionsbedingungen, in ihrer Detektion und Auswertung. Dadurch liefern sie für einzelne Inhibitoren verschiedene Resultate hinsichtlich der Wirkstärken sowie unterschiedliche Hemmwertverhältnisse (Ratio $IC_{50\text{ PGHS-2}}/IC_{50\text{ PGHS-1}}$).

In den ersten Testsystemen wurde mit isolierten Mikrosomen aus Schafsamenblasen oder Stierhoden gearbeitet, welche ein reiches Reservoir für PGHS-1 darstellen. Da PGHS-2 ein induzierbares Enzym ist, stellt sich seine Gewinnung deutlich komplizierter dar. Als einzige Quelle, aus der PGHS-2 ohne künstliche Induktion isoliert wird, sind Schafcotyledonen zu nennen. Es werden Mikrosomenpräparation eingesetzt oder es wird natives Reinenzym daraus isoliert. Rekombinante PGHS-2 kann in *sf9* oder *cos-1*-Insektenzellen exprimiert werden und dann als Mikrosomenpräparation oder als Isolat zum Test dienen. Vielfach werden aber auch induzierte Zellen, ganz oder gebrochen, oder speziell entwickelte Zelllinien als Quelle für PGHS-2 verwendet (vgl. Tabelle B.1).

Ein direkter Vergleich der Wirkung eines Hemmstoffes von PGHS-1 und PGHS-2 in den verschiedenen Systemen gestaltet sich äußerst problematisch. In den Testsystemen werden PGHS-Isoenzyme sowohl tierischen wie menschlichen Ursprungs genutzt und einige vergleichende Tests kombinieren sogar verschiedene Spezies. Die Enzyme der verschiedenen Spezies sind allerdings untereinander nicht vollkommen identisch, sondern nur zu ca. 60 % homolog.

Tabelle B.1: In vitro Assays für vergleichende Untersuchung von PGHS-1/PGHS-2 Aktivitäten

PGHS-1 Quelle	PGHS-2 Quelle	Versuchsbedingung/ Detektion	Literatur
Mikrosomen aus Stiersamenblasen	-	radioaktive AA, Trennung der Metabolite nach SC	WHITE et al. 1974; MIZUNO et al., 1982 FLOWER et al., 1973 GRYGLEWSKI, 1978
murines gereinigtes Enzym aus <i>cos-1</i> Zellen	murines gereinigtes Enzym aus <i>cos-1</i> Zellen	radioaktive AA, DC-Detektion nach SC	MEADE et al., 1993
Mikrosomen aus Schafsamenblasen	-	radioaktive AA, HPLC-Detektion	REDL et al., 1994 WIERERER, 1988
gereinigtes Enzym aus Schafsamenblasen	gereinigtes Enzym aus Schafcotyledonen	Radioimmunoassay für PGE ₂	FUTAKI et al., 1994
humanes rekombinantes gereinigtes Enzym aus <i>cos-1</i> Zellen	humanes rekombinantes gereinigtes Enzym aus <i>cos-1</i> Zellen	Messung des O ₂ -Verbrauchs	LANEUVILLE et al., 1994
humanes rekombinantes gereinigtes Enzym	humanes rekombinantes gereinigtes Enzym	Auswertung über DC, HPLC-Trennung und O ₂ -Messung	BARNETT et al., 1994
humanes rekombinantes gereinigtes Enzym aus Insektenzellen	humanes rekombinantes gereinigtes Enzym aus Insektenzellen	Messung über Oxidation von TMPD (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin)	COPELAND et al., 1994; GIERSE et al., 1995
Stier-Aortaendothelzellen; gereinigtes Enzym aus Schafcotyledonen	LPS-stimulierte Mausmakrophagen; gereinigtes Enzym aus Schafplazenta	Radioimmunoassay für PGE ₂ -Messung	MITCHELL et al., 1994; VANE et al., 1995
Vollblut; Blutplättchen	Vollblut; LPS-stimulierte Monozyten	Radioimmunoassay für PGE ₂ -Messung	PATRIGNANI et al., 1994
humane frische Magenschleimhaut	humane LPS stimulierte Leukozyten	Radioimmunoassay für PGE ₂ -Messung	TAVARES et al., 1995
rekombinantes humanes Enzym	rekombinantes humanes Enzym	fluorimetrischer Immunoassay	QUELLET et al., 1995
mikrosomale Fraktion mit rekombinantem humanen Enzym	mikrosomale Fraktion mit re-kombinantem humanen Enzym	Enzymimmunoassay für PGE ₂	CHURCHILL et al., 1996
rekombinantes humanes Enzym aus <i>sf9</i> -Zellen, gebrochene Zellen	rekombinantes humanes Enzym aus <i>sf9</i> -Zellen, gebrochene Zellen	Radioimmunoassay für PGE ₂	CROMLISH et al., 1996
unstimulierte Makrophagen aus Meerschweinchen	mit LPS stimulierte Makrophagen aus Meerschweinchen	Radioimmunoassay für PGE ₂	ENGELHARDT et al., 1996
Mikrosomenfraktion aus Schafsamenblasen	gereinigtes Enzym aus Schafcotyledonen	Radiochemische Messung der Metabolite nach SC	NOREEN et al., 1998

Fortsetzung Tabelle B.1

humane Blutplättchen	IL-1 stimulierte humane Synovialzellen	Enzymimmunoassay, Messung von TXB ₂ bzw. PGE ₂	KAWAI et al., 1998
humanes Vollblut	IL-1 stimulierte humane Luftröhrenepithelzellen	Radioimmunoassay für TXB ₂ bzw. PGE ₂	WARNER et al., 1999
humanes Vollblut, Blutplättchen	humanes Vollblut, LPS induzierte Lympho-monozyten	ELISA; Messung von PGE ₂	LAUFER et al., 1999
humane Blutplättchen	IL-1β stimulierte humane Epithelkarzinomzellen	Radioimmunoassay	GIULIANO et al., 1999

Weiterhin ist es entscheidend, ob ein Enzym mit intakten Zellen, Mikrosomen oder gereinigtem Enzym durchgeführt wird. Bei intakten Zellen muss der Wirkstoff zunächst die Zellmembran durchdringen und kann durch unspezifische Proteinbindung inaktiviert werden. Dies geschieht ebenso bei Mikrosomenpräparationen, die neben der PGHS weitere Enzyme enthalten. Um Plasmabindungen im Testsystem zu berücksichtigen, müssten deshalb immer gleiche Proteinkonzentrationen eingehalten werden.

Als Substrat wird sowohl endogene als auch exogene Arachidonsäure genutzt. Bei intakten Zellen dienen als Substrat beide Arachidonsäurepools.

Die Induktionszeiten und die Stimulationsmittel zur Induktion von PGHS-2 sind uneinheitlich. Konstitutiv exprimierte PGHS-2 z.B. aus Insektenzellen reagiert anders als induzierte, und eventuell kann der Test auch durch die Stimuli gestört werden.

Die Zugabe und Konzentration von Cofaktoren in der Testlösung beeinflussen die Ergebnisse. Da die meisten Inhibitoren zeitabhängig wirken, ist die Inkubationszeit sehr entscheidend für die gemessene Wirkstärke (VAGO et al., 1995).

Um Daten aus *in vitro* Versuchen mit Daten aus *in vivo* Experimenten vergleichen zu können, sind Vollblutassays entwickelt worden, welche die PGHS-1 Aktivität in den Blutplättchen und die PGHS-2 Aktivität in stimulierten Monozyten messen.

PAIRET et al., 1998, vergleicht die Testsysteme, die üblicherweise verwendet werden und nennt folgende Voraussetzungen, um *in vitro* Daten auf *in vivo* Experimente übertragen zu können:

- natives menschliches Enzym in ganzen Zellen,
- induzierte PGHS-2 (Simulierung eines Entzündungsprozesses),
- endogene Arachidonsäure,
- Proteinkonzentration nahe am physiologischen Wert.

In der Forschergruppe um PATRONO (PATRIGNANI et al., 1994) wurde ein Vollblutassay entwickelt, dessen Werte PAIRET für Standardisierungen vorschlägt.

Dennoch sind auch die anderen oben aufgeführten Testsysteme von Bedeutung, denn vielfach beeinflussen sehr spezielle Fragestellungen die Wahl des Assays (Screening, Testung von Struktur-Wirkungsbeziehungen). „Absolutwerte“ für die Hemmwirkungen der verschiedenen Inhibitoren sind daher in der Literatur nicht zu finden. Abbildung B.1 zeigt im Vergleich unterschiedliche Angaben (Ratio PGHS-2/PGHS-1) für zwei Hemmstoffe aus der Literatur.

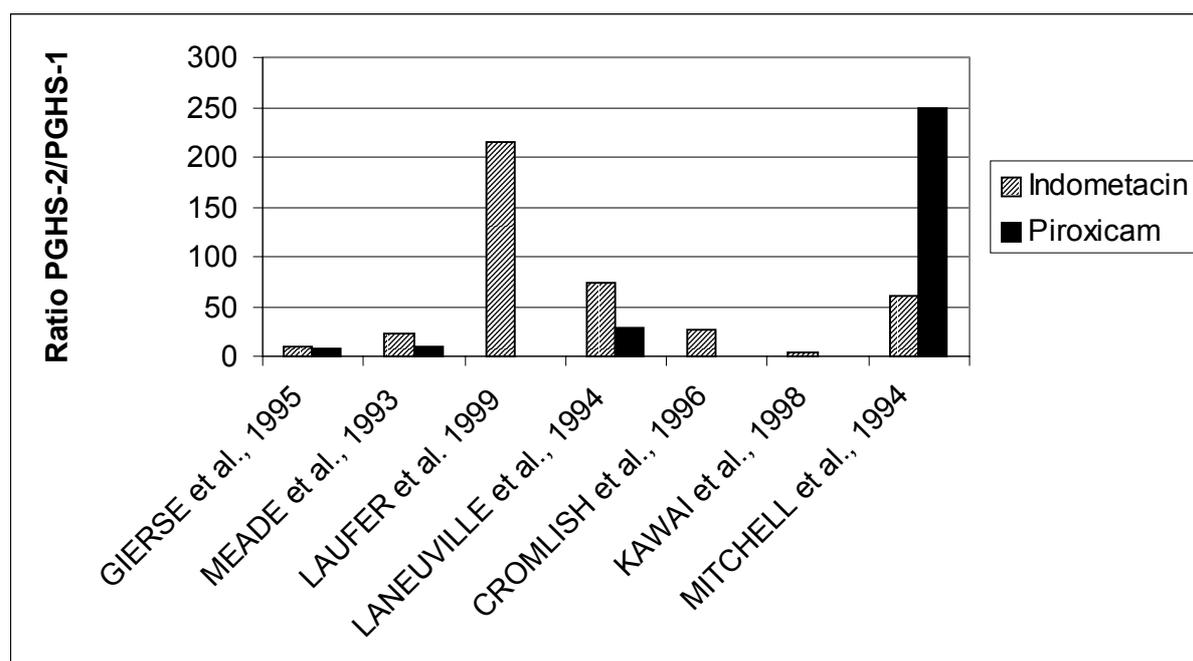


Abbildung B.1: PGHS-2/PGHS-1 Hemmwertverhältnisse von Indometacin und Piroxicam in unterschiedlichen Testsystemen (lt. Literaturangabe)

Die Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Untersuchungen stellt die zweite Stufe in der Bewertung eines selektiven PGHS-2 Inhibitors dar. Seine **pharmakologische** Beurteilung erfolgt vielfach am Rattenpfotenödem, Ratten-Arthritis-Modell (z.B. ANDERSON et al., 1996) sowie anhand weiterer pharmakokinetischer und pharmakologischer Parameter wie Resorption, Metabolisierung, Ausscheidung u.a..

Dazu werden *ex vivo* Daten herangezogen, wie Plättchenaggregation und Serum TXB₂-Konzentration für PGHS-1 Hemmung, renale PGE₂-Ausscheidung und Hemmung synovialen PGE₂ für PGHS-2 Hemmung. Die Daten werden im Vergleich mit bekannten unspezifischen Antiphlogistika erhoben (GIULIANO et al., 1999; DEGNER et al., 1998; NOBLE et al. 1996; ENGELHARDT, 1996; FRIES, 1996).

Inzwischen haben Meloxicam als präferenzieller PGHS-2 Hemmstoff, Celecoxib und Rofecoxib als selektive PGHS-2 Inhibitoren die Zulassung in Deutschland erhalten. Ihre **klinischen** Studien geben wieder, dass gastrointestinale Nebenwirkungen deutlich herabgesetzt sind. Jedoch reicht der bisherige Einsatzzeitraum noch nicht aus, um alle anderen Komplikationen zu erfassen (MELISSA: HAWKEY et al., 1998; SELECT: DEQUEKER et al., 1998 beide Meloxicam; VANE, 1996; WOJTULEWSKI et al., 1996; Satelliten-Symposium, 28. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 1998).

3. Physiologische und pathologische Funktionen der PGHS-1 und -2

3.1. Versuche mit PGHS-1/-2 Knock-out Mäusen

Wichtige physiologische Funktionen können heute über sogenannte Knock-out Versuche geklärt werden. Dabei wird das entscheidende Gen für die Exprimierung des zu untersuchenden Angriffspunktes entfernt. DINCHUK et al. gelang es 1995, sowohl Mäuse mit PGHS-1 als auch mit PGHS-2 Gendefekt zu züchten. Dabei zeigte sich, dass PGHS-2 wichtige physiologische Funktionen besitzt. COX-2 -/- Mäuse kommen lebend zur Welt. Sie sind jedoch unfruchtbar und zeigen Entwicklungsschwächen in den Nieren, am Herzmuskel und den Eierstöcken. Sie sterben schließlich an Nierenversagen. Entzündungsreaktionen, die künstlich durch LPS oder TNF- α hervorgerufen werden, lassen keinen Unterschied zwischen normalen und PGHS-2 negativen Mäusen erkennen. Der Autor schließt daraus, dass Entzündungsreaktionen nicht allein mit PGHS-2 in Zusammenhang stehen (DINCHUK et al., 1995).

Vergleichende Untersuchungen von PGHS-1 negativen mit PGHS-2 negativen Mäusen zeigten, dass PGHS-2 das physiologisch wichtigere Enzym darstellt. Tabelle B.1 gibt die Ergebnisse der Studie von LANGENBACH et al. (1999) wieder.

Er züchtete auch zweifach negative Mäuse (ohne PGHS-1 und -2). Diese waren jedoch nicht lebensfähig, obwohl ihre fetale Entwicklung keine Besonderheiten aufwies.

3.2. PGHS-Effekte auf den Magen

Im Magen findet sich vor allem PGHS-1, die zytoprotektive Prostaglandine produziert (z.B. Prostacyclin = PGI₂). Es sind aber auch kleinste Mengen konstitutiver PGHS-2 detektierbar (ZIMMERMANN et al., 1998). Die zytoprotektive Wirkung basiert auf einem vierteiligen Effekt, der z.B. die Hemmung der Säureproduktion, die Steigerung der Durchblutung der Mukosa durch Vasodilatation, eine Erhöhung der Hydrophobie des Mukosaepithels, Stimulierung der alkalischen Bikarbonat-Sekretion u.v.m. beinhaltet (HAWKEY, 2000).

Tabelle B.1: Vergleich der Phenotypen PGHS negativer Mäuse nach LANGENBACH et al., 1999

Phenotyp	PGHS-1 fehlend	PGHS-2 fehlend
Überlebenschancen	hohe Geburtensterberate, normal	60 % Lebendgeburten, 75% > 1 Jahr
Expression	PGHS-2 induzierbar	PGHS-2 und PGHS-1 nicht hochregulierbar
Blutplättchen	fehlende Aggregation	-
Fortpflanzung	♀: normal, Probleme bei der Geburt, (fehlendes PGF _{2α}) ♂: fertil	♀: unfruchtbar; fehlende Ovulation und Eieinnistung; Störung der Plazentaentwicklung (fehlendes PGE ₂) ♂: fertil
Nieren	normal	unterentwickelt (postnatal)
Krebsentwicklung	Adenome und Papillome vermindert (Haut, GI)	Adenome und Papillome vermindert (Haut, GI)
Entzündungsgeschehen	ungestört mit TPA, 70% vermindert mit AA 75% Induktion vs. Wildtyp; leicht verminderter Makrophageneinstrom, wenig verlangsamte Auflösung	ungestört 25% Induktion vs. Wildtyp 50 % verminderter Makrophageneinstrom; verlangsamte Auflösung; kein Fieber in Folge von Entzündungen
Magen	keine spontane Ulzeration (PG-Reduktion im Magen 99%); Kompensation über PGHS-2 und NO-Bildung pH = 1,5	Ulzeration mit Indometacin, verminderte Geschwürheilung pH = 3,5

Die herkömmlichen NSAR, die hauptsächlich PGHS-1 inhibieren, verursachen damit schwere Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt). Dies führt bei Langzeitgabe häufig zu Hospitalisierung und endet in fast 20 % der Fälle sogar mit dem Tod. Wichtiger Parameter für die Einteilung von NSAR ist deshalb neben den oben genannten chemischen und pharmakologischen Zuordnungen auch ihre Einteilung nach ihrer GI-Verträglichkeit. Etodolac als präferenzzieller Inhibitor erhielt bei der Bewertung durch KAWAI (1998) einen Faktor von 0 ($\hat{=}$ Zahl schwerer GI-Erkrankungen/100 Patienten/Jahr) während der unspezifische Hemmer Indometacin mit einem Faktor von 2,96 im Vergleich mit den anderen getesteten Medikamenten eine sehr schlechte Wertung erhielt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den *in vitro* Ergebnissen in einem von KAWAI et al. (1998) durchgeführten Assay mit ganzen Zellen.

Interessanterweise ließen sich in Magenadenokarzinomen größere Mengen an PGHS-2 mRNA im Vergleich zum gesunden Magengewebe finden. Der PGHS-1-Level war dagegen nicht erhöht (HULL et al., 1999).

3.3. Beeinflussung der Lunge und PGHS-1/2 Gleichgewicht bei Asthma

PGHS-2 wird in Lungenepithelzellen konstitutiv exprimiert und ist dort auch die vorherrschende Isoform (ASANO et al., 1996; WALENGA et al., 1996). CHARETTE et al. (1995) fanden, dass auch in der Luftröhre konstitutive PGHS-2 die vorwiegende Isoform ist. Da das Enzym zur Selbstinaktivierung neigt und seine Aktivität durch O₂ oder O₃ zerstört wird, erscheint es physiologisch sinnvoll, nötiges PGE₂ durch *de novo* exprimiertes Enzym zu synthetisieren.

Dies hätte für die Therapie mit selektiven Hemmern zur Folge, dass die PG Produktion in der Lunge unterbunden wird. PGE₂ ist als Hauptmetabolit wichtiger Mediator zur Abwehr von Krankheitskeimen, fungiert als Vasodilatator, vermindert die Schleimsekretion und unterdrückt die zelluläre Immunreaktion. Bisherige Studien mit PGHS-2-selektiven Hemmstoffen zeigen, dass Infektionen der oberen Atemwege als Nebenwirkung beobachtet werden, doch konnte bisher kein signifikanter Unterschied zu unselektiven NSAR gefunden werden (vgl. MARTIN et al., 2000; CANNON et al., 2000). Aspirin-sensitive Asthmatiker wären damit auch für selektive COX-2-Inhibitoren sensitiv. Weiterhin können Glucocorticoide die konstitutive PGHS Expression in der Lunge nicht vermindern, wodurch deren Einsatz auch bei Asthma gerechtfertigt bleibt. Trotzdem kann bisher nicht beurteilt werden, ob nicht COX-2 selektive NSAR einen positiven Einfluss auf Asthma besitzen, da sie nicht nur protektives PGE₂, sondern auch die Bildung proinflammatorischer PGs hemmen (PANG et al., 1998).

3.4. PGHS-Einfluss in der Niere

Die gesunde Niere zeigt relativ hohe Toleranz bzgl. Prostaglandinen. An Bedeutung gewinnen sie in der geschwächten Niere, die altersbedingt, bei Herzschwäche, Leberzirrhose, durch Infektionen oder bei sonstigen Nierenerkrankungen auftreten kann. Hier kommt den Prostaglandinen die Aufgabe zu, den renalen Blutfluss zu regulieren, die Natrium- und Wasserretention und die Reninfreisetzung zu steuern. Bei Patienten, die dauerhaft NSAR einnehmen müssen, können leicht schwerwiegende Schäden entstehen. Bisherige Studien konnten weder Vorteile noch Nachteile der selektiven PGHS-2 Hemmstoffe belegen (BREYER et al., 1999), jedoch sprechen die Ergebnisse von SCHNEIDER et al. (1999) dafür, dass die Hemmung durch Indometacin als unselektiver Inhibitor, stärkere Entzündungsreaktionen in der Niere mit sich bringt als die selektiven PGHS-2 Hemmstoffe.

3.5. Vorkommen von PGHS-1/-2 in Blutplättchen

Blutplättchen besitzen hauptsächlich PGHS-1. Die Menge des gebildeten TXA_2 und TXB_2 ist damit ein guter Indikator zur Messung von PGHS-1 Hemmung. Die Nebenwirkung der älteren NSAR, die Plättchenaggregation zu hemmen, wird gleichzeitig als Therapie zur Blutverdünnung eingesetzt (niedrig dosierte ASS). WEBER et al., 1999, untersuchten Blutplättchen bzgl. des Vorhandenseins von PGHS-2 mRNA und konnten diese in gewaschenen Plättchen nachweisen. Ihre These ist, dass PGHS-2 die mögliche Ursache für Aspirin-Resistenzen darstellt.

3.6. Funktionen der PGHS-1/-2 während Schwangerschaft und Geburt

Schon zur Befruchtung und Eieinnistung spielen Prostaglandine eine wichtige Rolle. Die fetale Entwicklung wird vor allem über PGHS-1 hochregulierte Prostaglandinlevel gesteuert. Induktion von PGHS-2 andererseits leitet die Wehen und die Geburt ein (WIMSATT et al., 1993; ZHANG et al., 1996). Die postnatale Entwicklung wird ebenfalls über PGHS-2 Induktion beeinflusst (vgl. Kap. B 3.1). Nicht-selektive NSAR können zur Verzögerung der Wehen verwendet werden, sie führen aber zugleich zu einem vorzeitigen Verschluss des Arteriosus Botalli und setzen die Urinproduktion des Fötus herab. Während die erwünschte Wehenverzögerung durch die Hemmung der PGHS-2 bei der Mutter erreicht wird, kommt es zu den unerwünschten Begleiterscheinungen durch Hemmung der PGHS-1 beim Fötus. Selektive PGHS-2 Hemmstoffe könnten deshalb therapeutisch sicherer angewandt werden, um frühzeitige Wehen zu verhindern (VANE et al., 1998b).

3.7. PGHS-1/-2 Einfluss im ZNS

Im ZNS wird PGHS-2 konstitutiv exprimiert, jedoch nicht im gesamten Gehirn, sondern besonders im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und im Rückenmark. Auch bestehen quantitative Unterschiede in der PGHS-1/-2 Expression zwischen den verschiedenen Spezies. Während im Rückenmark der Ratte hauptsächlich PGHS-2 gefunden wird (BREDEER et al., 1995), ist beim Menschen die Menge an mRNA der Isoenzyme jeweils gleich groß.

PGHS-2 wird hochreguliert bei normaler und krampfhafter Nervenerregung. Das produzierte PGH₂ wird für die nervale Weiterleitung gebraucht (VANE et al., 1998a).

PGHS-2 kann durch LPS im Gehirn induziert werden (BRIAN et al., 1998). Durch diese Induktion wird die Blutzirkulation beschleunigt, wodurch das Krankheitsbild „Fieber“ entsteht. Auch in der Schmerzforschung wurde PGHS-2 als Produzent von schmerzförderndem PGE₂ im Gehirn gefunden. Selektive PGHS-2 Inhibitoren wirken schmerzstillend (SEIBERT et al., 1994).

3.8. Einsatz von PGHS-Hemmstoffen bei Morbus Alzheimer

Epidemiologische Studien ergaben Hinweise, dass NSAR auch das Risiko herabsetzen, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Als möglicher Wirkmechanismus wird postuliert, dass die Entzündungszeichen, die in der Nähe der β-Amyloid-Plaques entstehen, herabgesetzt werden (YASOJIMA et al., 1999). Hier finden sich vor allem Mikrogliazellen, die COX-2 verstärkt exprimieren. Die Amyloidbildung wird durch die NSAR nicht reduziert, jedoch wird angenommen, dass die Krankheit durch die entzündungsinduzierten neuronalen Defekte entsteht. Selektive PGHS-2 Hemmer könnten damit prophylaktisch eingenommen, als Schutz gegen Morbus Alzheimer dienen (VANE et al., 1998a).

3.9. PGHS-2 bei der Zellentwicklung und Krebsentstehung

COX-2 ist an der Kernmembran zu finden. Es liegt damit nahe zu postulieren, dass sie die Zellentwicklung beeinflusst. Ein Zusammenspiel in der Apoptose und in der Krebsentstehung wurde bisher beobachtet, konnte aber nicht ausreichend geklärt werden.

Obwohl die Therapie mit älteren NSAR schwere GI-Komplikationen mit sich bringen kann, wurde auch ein protektiver Effekt auf die Entstehung von Dickdarmkrebs beobachtet (KARMALI, 1980). Geringe Mengen an NSAR verhindern bei genetisch prädisponierten Personen die Entstehung von Polypen und deren Tumorgenese. Versuche an Knockout/ FAP (familial adenomatous polyposis)-Mäusen zeigten, dass selektive PGHS-2 Hemmstoffe besonders wirksam gegen die Krebsentstehung wirken (TAKETO, 1998a). PGHS-2 ist das

vorwiegende Enzym in den Tumorzellen. Erhöhte PGE₂ Mengen bewirken den Verlust des *Apc*-Genes, das wichtig für die Apoptose einer Zelle ist (RUSTGI, 1998).

Auch in anderen Tumorgeweben wie Lungen- (WOLFF et al., 1998), Haut- und Magenkrebs (FISCHER, 1997; TAKETO, 1998b) wurden erhöhte PGHS-2 Level gemessen. PGHS-2 scheint dabei hauptsächlich im Frühstadium des Tumors Einfluss zu nehmen und die Tumorgenese zu fördern.

3.10. Einfluss der Isoenzyme im Entzündungsgeschehen - inflammatorische und anti-inflammatorische Wirkung der PGHS-2

Entzündungen haben für den Körper schützende Funktion. Er kann sich damit gegen Noxen zur Wehr setzen. Diese Fähigkeit bedarf einer schnell einsetzenden Reaktion. PGHS-2 mit einem „immediate-response“-Gen zeigt dafür sehr gute Voraussetzungen. Nach Freisetzung von Arachidonsäure, kann das Enzym sofort nötige Prostaglandine produzieren (MITCHELL et al., 1995). Auch chronische Entzündungen wie rheumatoide Arthritis zeigen Symptome einer akuten Entzündung und einhergehend starke Induktion der PGHS-2. Sie ist beteiligt an der Granulombildung, der Knochenresorption und am Schmerz im Zusammenhang mit dieser rheumatischen Erkrankung (KATORI et al., 1998). PGHS-2 ruft maßgeblich die Reaktionen einer Entzündung hervor. Ihre Hemmung ist damit wichtiger Angriffspunkt für anti-entzündliche Medikamente. Im Mittelpunkt derzeitiger Forschung stehen selektive PGHS-2-Hemmstoffe, die effektiv Entzündungen bekämpfen, aber weniger Nebenwirkungen als die konventionellen NSAR besitzen.

Leider werden von der PGHS-2 nicht nur entzündungsfördernde Prostaglandine gebildet. Als Nebenwirkung der neuen selektiven PGHS-2 Hemmstoffe wurde eine verminderte Wundheilung beobachtet. Werden von PGHS-1 keine protektiven Prostaglandine freigesetzt, kann PGHS-2 dieses Defizit ausgleichen und damit die Entzündungsreaktion herabsetzen. PGHS-2 wirkt dabei antiinflammatorisch auf Basis der Zellproliferation, der Rezeptorexpression zur Zelladhäsion und der Cytokinfreisetzung (MITCHELL et al., 1998). In einem Modellversuch zeigten GILROY et al. (1999), dass im akuten Entzündungsstadium ca. 2h nach Schädigung PGHS-2 induziert wird und große Mengen PGE₂ freigesetzt werden. Nach 48h ist die Expression von PGHS-2 nochmals 350 % höher, doch jetzt wird PGD₂ und 15-Deoxy- Δ^{12-14} prostaglandin J₂ produziert. Dieser zweite Anstieg geht mit Auflösung der Entzündung einher. Die Hemmung mit selektiven NSAR setzt die Menge PGs nach zwei Stunden und nach 48h herab. Damit wird zwar die Entzündung bekämpft, aber gleichzeitig auch ihr Abklingen und eine Heilung verhindert.

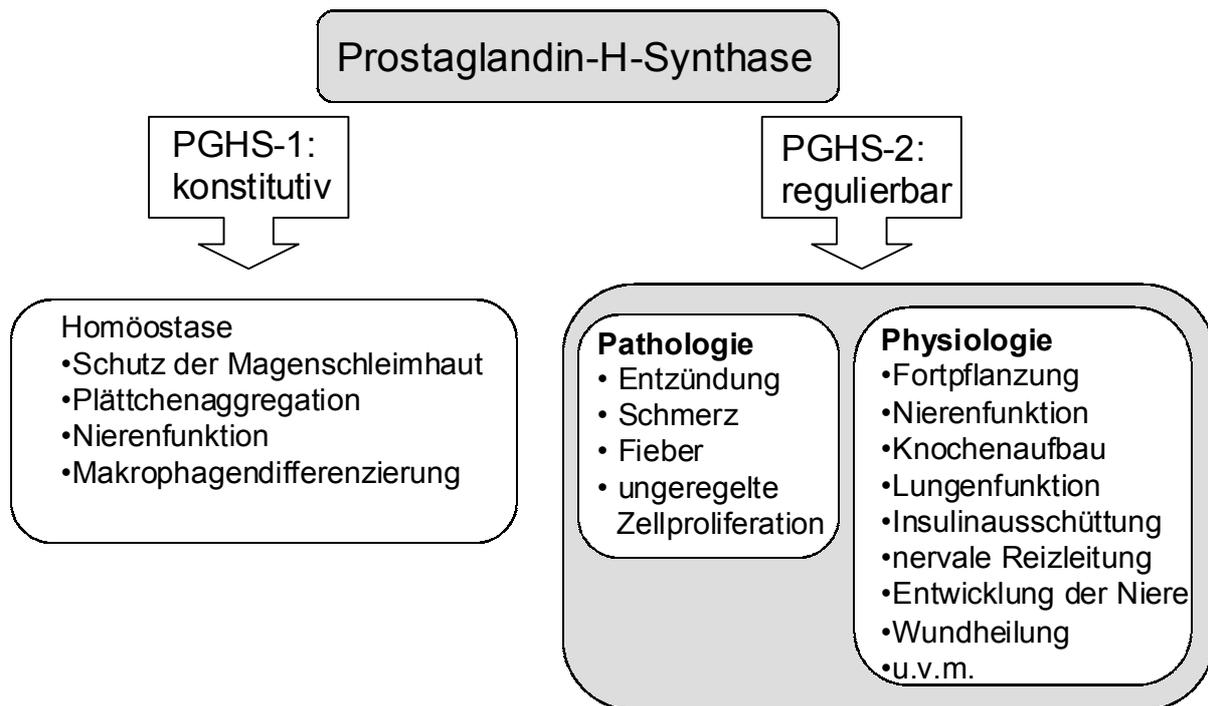


Abbildung B.1: Übersichtsschema zur physiologischen Bedeutung der PGHS-Isoenzyme nach Crofford et al. (2000)

3.11. Problematik bei der Behandlung mit COX-2-präferentiellen und -selektiven Hemmstoffen

„The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.“

(Thomas Henry Huxley; engl. Zoologe)

Der erste neu zugelassene Hemmstoff, dessen Wirkung bzgl. seiner PGHS-2 Hemmung untersucht worden war, ist Meloxicam. Seine Wirkweise wurde stark beworben (MMV, 34/1996), und es wurde suggeriert, dass kaum Nebenwirkungen bestehen. Der erste Rückschlag war, als Irritationen an Haut und Magen gemeldet wurden (Arzneimittel-Schnellinformation BfArM 3/98; WICK et al., 1998). Doch diese wurden auf die Hemmung der PGHS-1 zurückgeführt, denn Meloxicam hatte sich nach weiteren Tests nicht als selektiver, sondern als präferenzialer COX-2-Hemmer erwiesen. Die Coxibe, Rofecoxib und Celecoxib, sollten diese Nebenwirkungen nicht mehr zeigen. Jedoch fehlen bisher Langzeituntersuchungen, aber ganz ohne Nebenwirkungen sind die neuen Medikamente ebenfalls nicht. Einflüsse auf die Nieren und Ödembildungen kommen im selben Ausmaß wie bei älteren NSAR vor.

Nachdem erforscht worden war, dass PGHS-2 nicht nur während Entzündungsreaktionen induziert wird, sondern in einigen Geweben konstitutiv exprimiert wird und auch

physiologische Funktionen übernimmt, sowie eine besondere Aufgabe während des Auflöses von Entzündungsreaktionen übernimmt, konnte das bisherige Modell einer „guten“ COX-1 und einer „bösen“ COX-2 nicht mehr aufrechterhalten werden (vgl. Abbildung B.1, HAWKEY, 1999; BRUNE, 1999). Längere Untersuchungen mit selektiven COX-2-Hemmstoffen schließen nicht aus, dass Arteriosklerose über die Hemmung der Zellproliferation gefördert wird, thrombotische Ereignisse sich häufen, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und die glomeruläre Filtrationsrate beeinträchtigt werden, die weibliche Fertilität und die fetale Entwicklung beeinflusst werden, die Infektabwehr in der Lunge geschwächt, sowie die Wundheilung verzögert wird (HEINZL, 1999; DANNHARDT, 2000). Eine Behandlung müsste damit für Schwangere, Herzschwache, Nierenkranke und bei postoperativen Schmerzen ausgeschlossen werden. Patienten mit bereits vorgeschädigtem GI-Trakt sind ebenfalls ausgeschlossen, da sonst keine Heilung zu erwarten ist (WALLACE, 1999).

Die Daten aus den Tierversuchen zur anti-inflammatorischen und analgetischen Wirkung konnten noch nicht vollständig auf den Menschen übertragen werden (SEIBERT, 1999). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch PGHS-1 am Entzündungsgeschehen beteiligt ist. Damit wären duale Hemmstoffe effektiver als selektive (WALLACE et al., 1998, im Widerspruch mit SMITH et al., 1998), der mit Hilfe des selektiven COX-1 Hemmstoffs SC-560 zwar periphere Beteiligung von PGHS-1 an der PG-Produktion bestätigt, zentral aber nur PGHS-2 für Schmerz und Fiebersymptome verantwortlich macht).

Zu euphorisch sollte die klinische Relevanz der gefundenen Selektivität bei den getesteten Hemmstoffen nicht gesehen werden. Meloxicam wurde bereits als präferenzialer Hemmstoff eingestuft, aber auch Coxibe hemmen noch immer gleichzeitig PGHS-1. Im Vollblutassay nach WARNER et al. (1999) wurde nachgewiesen, dass z.B. Celecoxib PGHS-1 immerhin noch zu 60 % inhibiert, wenn PGHS-2 zu 80 % gehemmt wird. Meloxicam schneidet nach diesem Test deutlich besser ab (ca. 25 % PGHS-1 vs. 80 % PGHS-2 Hemmung). Rofecoxib zeigt nach diesem Test die selektivsten Eigenschaften der getesteten Substanzen.

Bisher sind die Kosten für die neuen NSAR sehr hoch, so dass sich die Therapie finanziell nicht rechnet. Die Zahl der Erkrankungen, die durch Nebenwirkungen von PGHS-1 Hemmung hervorgerufen wird, kann durch die gleichzeitige Gabe von Misoprostol so weit reduziert werden, dass sie mit den selektiven NSAR vergleichbar ist, und die zusätzlichen Kosten geringer sind als eine Therapie mit neuen PGHS-2 Hemmstoffen (PETERSON et al., 1999).

4. Zukunftsvisionen für die Entwicklung neuer PGHS-Hemmstoffe

Der Wunsch nach neuen Antiphlogistika und Antiinflammatorika ohne Nebenwirkungen ist bisher nicht erfüllt worden. So suchen Forscher weiter nach neuen Konzepten für sichere Arzneimittel.

- Ein Ansatzpunkt sind NO-freisetzende NSAR. NO hat im GI-Trakt vergleichbare Funktionen wie protektive Prostaglandine. Seine Freisetzung könnte damit schützende Eigenschaften auf den Magen haben, während die PGHS-Isoenzyme gehemmt werden. Da an Entzündungen wahrscheinlich beide Isoformen beteiligt sind, könnte damit eine optimale entzündungs- und schmerzhemmende Wirkung ohne GI-Schäden erreicht werden (WALLACE et al., 1997; DAZ, 137, 1997).
- Die Säurefunktion vieler NSAR trägt zu besonders hohem GI-Risiko bei. Sie setzt die Hydrophobizität der Magenschleimhaut herab. Durch eine Kopplung von Aspirin an Phospholipide kann dieser Effekt vermieden werden, während die antipyretischen und antiinflammatorischen Eigenschaften erhalten bleiben (LICHTENBERGER et al., 1995). Ebenso soll ein Ansatz arbeiten, bei dem NSAR mit protektiven Peptiden (TREfoil) zusammen verabreicht werden (WOLFE, 1998). Die Kopplung von herkömmlichen NSAR mit Cysteinamin führt zu reduziertem Säurecharakter und zugleich antioxidativen Eigenschaften. Die reaktiven, schädigenden Sauerstoffspezies können damit abgefangen werden, die Mucosa wird somit doppelt geschützt (KOUROUNAKIS et al., 2000).
- Zwischen den Enantiomeren besteht auch bei NSAR ein Wirkunterschied. S-Enantiomere zeigen dabei oft größere PGHS-2 Wirksamkeit als die R-Form (CARABAZA et al., 1996). Die sogenannte eudismische Ratio zwischen dem wirksameren (Eutomer) und dem weniger wirksamen (Distomer) Enantiomer liegt bei Ibuprofen bei 160, bei Naproxen bei 133 und bei Flurbiprofen bei 878 (MANTRI et al., 1994). R-Flurbiprofen zeigt zwar geringere PGHS-Hemmung, jedoch auch weniger Ulzerogenität. Weitere Untersuchungen fanden nun, dass R-Flurbiprofen die Aktivierung von NF- κ B herabsetzt und damit die Expression von PGHS-2 und iNOS hemmt (GEISLINGER, 1999). Auch für Acetylsalicylsäure wurde ein alternativer Mechanismus gefunden: ASS bzw. Salicylat hemmt das Enzym I κ B-Kinase- β (IKK β), welches das Protein I κ B phosphoryliert. I κ B wird abgebaut und setzt den Transkriptionsfaktor NF- κ B frei, der entzündungsfördernd wirkt (YIN, 1998). Derartig gekoppelte Wirkmechanismen, die neben einer selektiven PGHS-2 Hemmung, die Expression von PGHS-2 herabsetzen oder die Menge verfügbaren Substrats durch Hemmung der Phospholipase A₂ vermindern, werden als zukunftsweisend betrachtet (PENNISI, 1998; RAGUENES-NICOL et al., 1999)

Einige Forscher gehen soweit zu behaupten, dass eine 3. Form der PGHS existieren muss (COX-3). Ihre These stützen sie auf die Differenzierung zwischen inflammatorischer Expression von PGHS-2 und anti-inflammatorischer Expression. Ein neuartiger Ansatz wäre dann, die Expression der antiinflammatorischen PGHS zu fördern, um Entzündungen nicht zu unterdrücken, sondern zu heilen (WILLOUGHBY, 2000).

5. Pflanzliche Drogen und Inhaltsstoffe als PGHS-2 (COX-2) Inhibitoren

Oftmals wird der reiche Schatz an Erfahrungen übersehen, der bei der Anwendung pflanzlicher Drogen für eine sinnvolle Therapie von Entzündungen, Fieber und Schmerzen existiert. Bei einigen Drogen konnte als Wirkmechanismus auch eine Hemmung der PGHS-2 nachgewiesen werden.

Weidenrinde und andere salicinhaltige Pflanzen werden bei entzündlichen und rheumatischen Beschwerden erfolgreich seit Alters eingesetzt (Erwähnung im *Corpus Hippocraticum*, Alexandria, 300 v.Chr.). Die Aufklärung des Wirkmechanismus dauert bis heute an. In der Rheumatherapie feiert Weidenrinde (*Salicis cortex*) inzwischen ein Comeback. Salicylsäure hemmt schwach und unspezifisch die Prostaglandin-H-Synthase, Gentisinsäure als Metabolit der Salicylsäure ist genauso ein unspezifischer Hemmstoff der PGHS, wodurch sich die Wirkung der Salicylsäure verstärkt. PGHS-2 wird sowohl direkt von Salicylsäure wie von seinen Metaboliten gehemmt, jedoch wird bei hoher Dosierung zusätzlich eine Hemmung der PGHS-2 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B erzielt. Der duale Wirkmechanismus von Salicin über einen direkten und einen indirekten Angriff der PGHS-2 wird als zukunftsweisend betrachtet. Bei der Gabe von Weidenrinde liegen die Wirksubstanzen nicht als freie Säure, sondern in Form der Glykoside im Magen vor. Sie werden erst durch Zuckerabspaltung im GI-Trakt und Metabolisierung nach Resorption aktiviert. Dadurch wird die Verträglichkeit im Vergleich zu reiner Salicylsäure und ASS deutlich verbessert (CHRUBASIK et al., 2000). Auch antioxidativ wirkende Flavonoide, kondensierte Tannine und Tremulacin als Lipoxygenasehemmstoff beteiligen sich vermutlich an der antiinflammatorischen Gesamtwirkung.

Eine weitere vielverwendete und -erforschte Droge ist die südafrikanische Teufelskralle (*Harpagophyti radix*, *Harpagophytum procumbens* DC., Pedaliaceae). Die wichtigsten Inhaltsstoffe sind Iridoide und Iridoidglycoside (Harpagid, Harpagosid). Die beiden Hauptinhaltsstoffe sind jedoch im Gegensatz zum Gesamtextrakt nicht wirksam gegenüber der PGHS-2 und TNF- α Synthese (eigene Testung und FIEBICH et al., 2000). Der Extrakt blockiert die Lipoxygenase und reduziert die Zytokinfreisetzung. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen der Teufelskralle und ihrer Hauptinhaltsstoffe sind bisher sehr widersprüchlich. Eine Erklärung der Wirksamkeit der Droge ist, dass sie zu einer Normalisierung humoraler Faktoren zur Entlastung der Regenerierung der Mesenchymfunktion beiträgt (REGLIN, 1995). Unbestritten ist jedoch, dass die Wirkung sich auf einen vielschichtiger Wirkmechanismus zurückführen lässt.

Plantago major L. (Plantaginaceae) wird traditionell bei Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhaut, zur Reizlinderung von Katarrhen der oberen Atemwege, bei entzündlichen Veränderungen der Haut und zur Vermeidung von Pustelbildung nach

Mückenstichen verwendet. Das anti-entzündliche Potential wurde zurückgeführt auf Triterpensäuren, die durch wirkungsorientierte Isolierung identifiziert wurden. Die Triterpensäuren Ursolsäure und Oleanolsäure zeigten selektive COX-2 Wirkung (RINGBOM et al., 1998). Auch andere Wirkstoffe wie das Iridoidglycosid Aucubin und die Flavone Apigenin und Luteolin hatten positive anti-inflammatorische Wirkung bei Carrageen-induzierten Entzündungsprozessen gezeigt, die Wirkung auf die PGHS-2 wurde allerdings noch nicht erforscht (RECIO et al., 1994; MASCOLO et al., 1988).

Von vielen weiteren Pflanzen wird antiinflammatorisches Potential über eine Hemmung der Prostaglandinbiosynthese beschrieben (siehe dazu: WAGNER, 1989; BAUER, 1998; LEE et al., 1998, *Carex humilis*; TAO et al., 1999, *Tripterygium wilfordii* Hook F). Untersuchungen über präferentielle Wirkungen auf die PGHS-2 bzw. vergleichende Untersuchungen bezüglich PGHS-1 und PGHS-2 Hemmung fehlen allerdings meist noch. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb dieser Aspekt näher untersucht werden.

C Entwicklung neuer PGHS-1 und -2 Screeningtestsysteme

1. Vorgaben und Zielsetzung

1.1. Zielsetzung für den neuen Prostaglandinsynthase-Screening-Assay

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu entwickeln, um Extrakte von Arzneipflanzen aus der traditionellen chinesischen Medizin vergleichend hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die beiden Isoenzyme der Prostaglandin-H-Synthase zu untersuchen und eine „aktivitätsgelenkte“ Isolierung („bioassay-guided isolation“) durch Untersuchungen der Fraktionen und isolierten Reinstoffe durchzuführen. Mit dem bisher verwendeten Testsystem (Abschnitt 1.2) war es nur möglich, COX-1 Hemmung zu bestimmen. Das System war zudem in seiner Kapazität beschränkt, da mit radioaktiv markierter Arachidonsäure als Substrat und Evaluierung nach HPLC-Trennung der Metabolite gearbeitet werden mußte und so für jede Probe ca. 30 min Evaluationszeit veranschlagt werden musste.

Der neue Test sollte einen wesentlich **höheren Probendurchsatz** aufweisen. Eine gute Voraussetzung dafür bietet das Arbeiten mit einem Mikrotitersystem. Außerdem musste die **Zeit** der Auswertung stark **verkürzt** werden. Eine günstige Alternative zur Methode mit HPLC und Radioaktivitätsmessung war die **Detektion** von PGE₂ mit **EIA**-Technik. Mit ihr konnte auf Mikrotiterplatten gearbeitet werden. Als Substrat konnte kalte Arachidonsäure verwendet werden, da **keine Radioaktivität** mehr nötig war, um Metabolite mit ausreichender Selektivität und Empfindlichkeit zu detektieren. Voraussetzung für die Detektion mit EIA war, dass bei der Umsetzung möglichst quantitativ ein einziges Produkt entstand. Störungen durch das Testen von komplexen Gemischen, wie sie in Pflanzenextrakten enthalten sind, mussten ausgeschlossen werden. Die Auswertung konnte dann **sehr schnell** mit Geräten durchgeführt werden, die für High-Throughput-Screening-Verfahren (HTS) üblich sind.

Um die Hemmwirkung genau zu charakterisieren, musste der Test **spezifisch** für jeweils eines der Isoenzyme sein. Die Ergebnisse sollten gut **vergleichbar** sein. Aus diesem Grund war es sinnvoll, mit gereinigtem Enzym zu arbeiten (vgl. Abschnitt 1.3).

Da die Testsysteme vor allem für Screeninguntersuchungen dienen sollten und es wichtig erschien, den Hemmmechanismus zuzuordnen zu können, war der Einsatz von gereinigten Enzymen vorteilhaft.

1.2. Kurze Einführung in das bisherige Testsystem

In unserer Arbeitsgruppe wurden bisher Pflanzenextrakte, Fraktionen und isolierte Reinsubstanzen mit dem von REDL et al. (1994) optimierten *in vitro* Testsystem auf COX-1 Hemmung getestet (Abbildung C.1). Dieser Test beruhte auf der Messung der Hemmung der Umsetzung von exogen zugesetzter radioaktiv markierter Arachidonsäure durch eine aus Schafsamenblasen isolierte **Mikrosomenfraktion** mit COX-1-Aktivität. Die Auswertung erfolgte durch quantitative Bestimmung der radioaktiven Metabolite (PGE₂) mit Hilfe von Umkehrphasen-HPLC und Radioaktivitätsdetektion. Der Inkubationsansatz enthielt neben der COX-1 Präparation radioaktiv markierte **Arachidonsäure** (1-¹⁴C-Arachidonsäure) als Substrat, Testsubstanz bzw. Inhibitor oder reines Lösungsmittel als Referenz und verschiedene Cofaktoren.

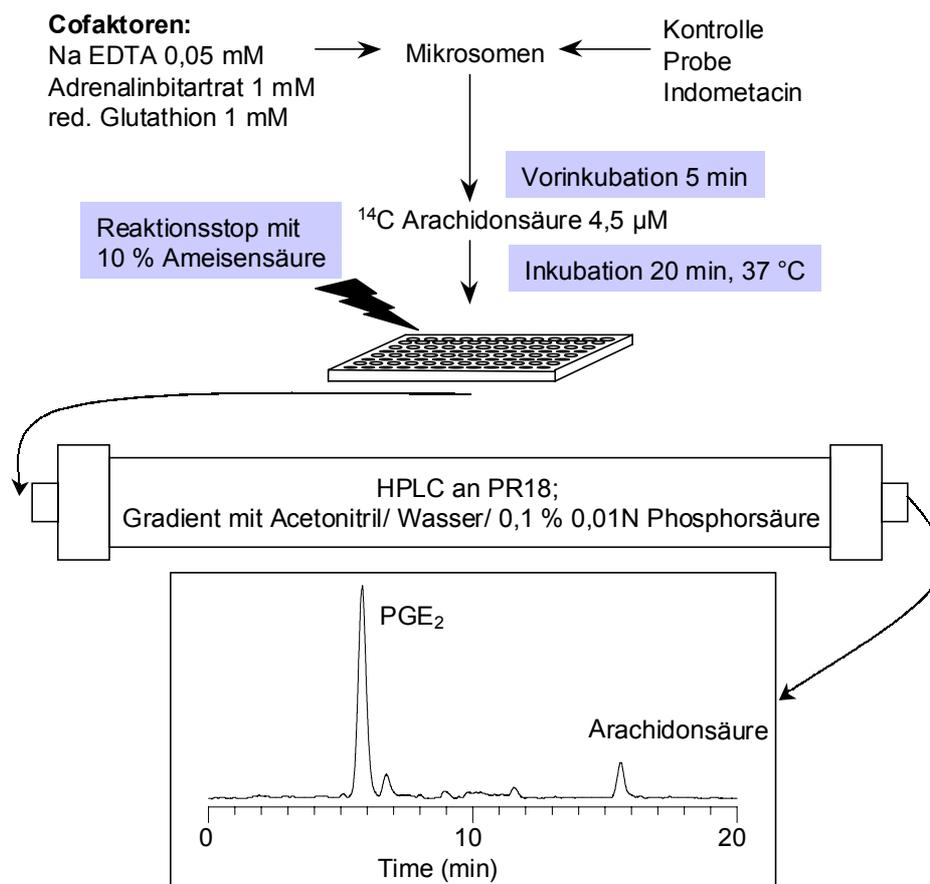


Abbildung C.1: Schematische Darstellung des bisher verwendeten COX-1 Testsystems mit einer Mikrosomenfraktion

PGE_2 war das Hauptumsetzungsprodukt, welches auch quantifiziert wurde. Die Hemmwerte waren jeweils Relativwerte. Sie errechneten sich aus dem prozentualen Anteil der Metabolite gegenüber nicht umgesetzter Arachidonsäure in einer Probe mit Inhibitor im Vergleich zu einer Kontrolle mit reinem Lösungsmittel (Gleichung C.1). Um die Umsetzung zu kontrollieren, wurde stets ein bekannter Hemmstoff mitgetestet, welcher als Positivkontrolle diente.

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{PGE}_2 (\text{Probe/Inhibitor}) * 100}{\text{PGE}_2 (\text{Kontrolle/ Lösungsmittel})}$$

Gleichung C.1: Berechnung der Hemmwerte im COX-1 Test

Enzym und Inhibitor wurden 5 min vorinkubiert, bevor die radioaktiv markierte Arachidonsäure zugesetzt wurde. Die Reaktionszeit betrug 20 min. In dieser Zeit erreichte das Enzym maximale Umsetzung. Da jedoch der reversible-zeitabhängige Inhibitor **Indometacin** als Positivkontrolle verwendet wurde, wurde nicht seine maximale prozentuale Hemmung erfaßt, die nach ca. 15 min eintritt, sondern seine Umsetzungsminderung nach genau 20 min (vgl. SMITH et al., 1971).

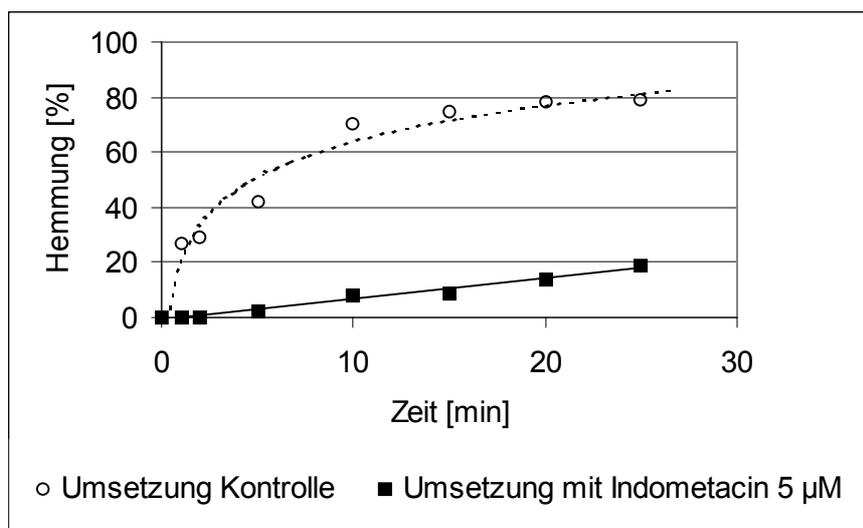


Abbildung C.2: Zeitliches Profil der prozentualen Umsetzung von ^{14}C -Arachidonsäure zu PGE_2 im COX-1 Test bei einer Kontrolle (Ethanol) und bei Zugabe eines Inhibitors (5 μM Indometacin)

1.3. Herkunft, Isolierung und Identifizierung von PGHS-2 Isoenzym aus Schafcotyledonen

Samenblasen des Schafes oder des Rindes sind hormonell bedingt reiche Quellen von COX-1 (MIYAMOTO et al., 1976; VAN DER OUDERAA et al., 1977; YAMAMOTO und VAN

DER OUDERAA et al., 1982). Die größte Induktion zur Bildung von COX-1 erfolgt in Samenblasen von Jungböcken. Ihre Samenblasen haben die Größe eines Fünfmärkstücker. Hieraus kann relativ einfach PGHS-1 zur Testung isoliert werden.

PGHS-2 wird unter physiologischen Bedingungen nur in sehr wenigen Zellen konstitutiv exprimiert, weshalb es schwierig ist, sie aus Gewebe zu isolieren (vgl. Kapitel B.2.4). Ein vielversprechender Ansatz war der Befund von WIMSATT et al. (1993), der das Vorhandensein von großen Mengen PGHS-2 in den Cotyledonen der Plazenta von Schafen beschrieb (zur Erläuterung: siehe unten). Das Maximum an PGHS-2 Induktion wird kurz vor der Geburt erreicht. WIMSATT gewann deshalb seine Proben bereits vor der Geburt der Lämmer operativ. WIMSATT und auch ZHANG et al. (1996) werteten ihre Versuche über Western-Blot oder Northern-Blot Analyse aus und bestimmten PGHS-2 nicht über Enzymaktivitätsmessung.

Zur Erläuterung: Die Plazenta dient als fetomaternales Austauschorgan. Sie ist aus mütterlichem (Endometrium, Uterus) und fetalem Gewebe (Chorion) aufgebaut. Die äußere Form und Ausdehnung wird weitgehend von der Verteilung und Anordnung der Chorionzotten bestimmt. Danach lassen sich verschiedene Plazentationstypen unterscheiden (SCHNORR, 1996):

- *Placenta diffusa*: die Zotten sind gleichmäßig über das gesamte bzw. nahezu gesamte Chorion verteilt (z.B. Pferd oder Schwein);
- *Placenta zonaria*: ein gürtelförmiger Bereich ist mit Zotten besetzt (z.B. Fleischfresser, Hund);
- *Placenta discoidalis*: ein scheibenförmiger Bereich ist mit Zotten besetzt (z.B. Primaten und Nager);
- *Placenta multiplex*: auf dem Chorion bilden sich Zottenfelder (Cotyledonen) heraus, die sich mit den Uteruskarunkeln zu Plazentomen vereinigen. Die übrigen Chorionteile sind zottenfrei (z.B. Wiederkäuer, Schafe, Ziegen) (Abbildung C.1).

Die Plazenta eines Schafes besitzt ca. 100 Cotyledonen. Sie sind napfförmig gestaltet (Abbildung C.1) und stark durchblutet. Bei der Geburt löst sich mütterliches vom fetalen Gewebe. Die Nachgeburt als Ausstoß des Chorions trägt damit die Cotyledonen der Plazenta (GRUNERT et al., 1993; RÜSSE et al., 1991).

Wir sammelten für unsere Versuche Schafscotyledonen direkt nach der Geburt des Lammes. Die präparierten Cotyledonen hatten etwa die Größe eines Zehnpfennigstückes, die größten maßen mehr als ein Fünfmärkstück.

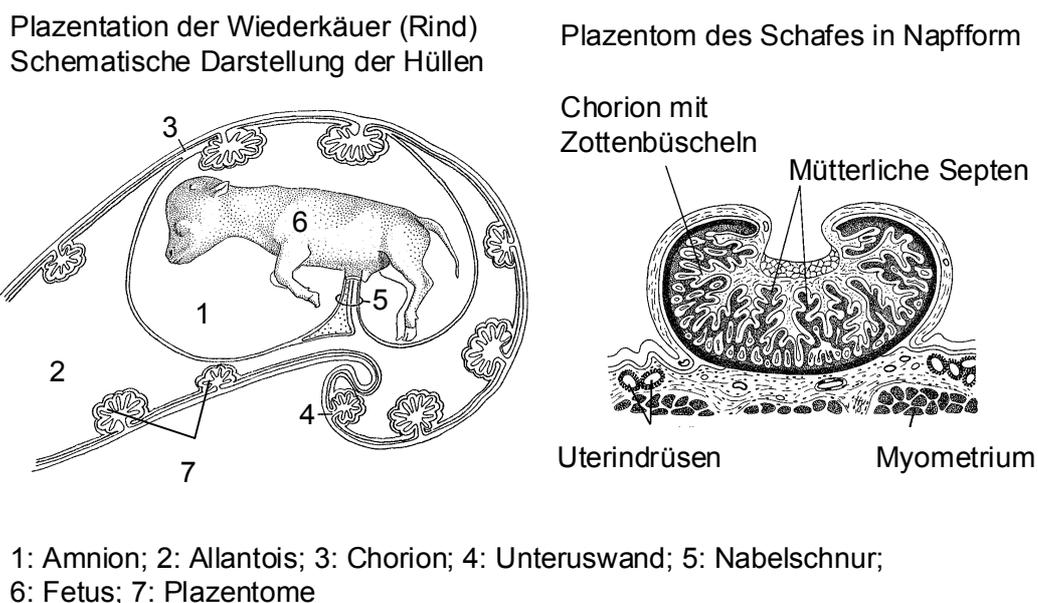


Abbildung C.1: Plazentation des Wiederkäuers (Rind) in schematischer Darstellung nach RÜSSE et al., 1991 und Karunkelform des Schafes

Aus der Literatur lagen für Cotyledonen, die nach der Geburt gesammelt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden waren, keine Enzymaktivitätsmessungen vor. Damit war bei der großen Labilität des Enzyms nicht klar, ob noch genügend Aktivität zur Durchführung von pharmakologischen Tests meßbar sein könnte und ob sich das Protein damit für unsere Zwecke eignete. Aus den eigenen gesammelten Cotyledonen isolierten wir die Mikrosomenfraktion nach abgewandelter Methode von JOHNSON et al. (1995). Alle während der Isolierungsschritte anfallenden Fraktionen wurden gesammelt und bei -80°C aufbewahrt. Abbildung C.2 gibt den groben Ablauf der Isolierung wieder.

Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf ihre Aktivität im COX-1 Test (Kapitel B.1.1, jedoch $50\ \mu\text{l}$ Cotyledonenfraktion), ihren Proteingehalt nach der Methode nach Biuret (Kapitel H; Abschnitt 1.2.) und schließlich auf ihre Spezifität bzgl. der Isoenzyme mit elektrophoretischen Techniken und Antikörpern geprüft.

Tabelle C.1 faßt die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen. Daraus ergibt sich, dass der Rohextrakt PGHS-Aktivität besaß (1,81 % Umsetzung/mg Protein) und das Enzym durch Aufreinigung während der Mikrosomenisolierung weiter konzentriert werden konnte (bis 5,95 % Umsetzung/mg Protein). Die aktivsten Fraktionen waren diejenigen, die Zellkerne enthielten (Fraktion Rst 4700 und Fraktion 1). Die Aktivität in der Mikrosomenpräparation (M) und im mikrosomenhaltigen Anteil (Üst 4700) war hingegen sehr mäßig. Das aktive Enzym befand sich also hauptsächlich an der Kernmembran, was den Ergebnissen von MORITA et al. (1995) hinsichtlich des PGHS-2 Vorkommens entsprach.

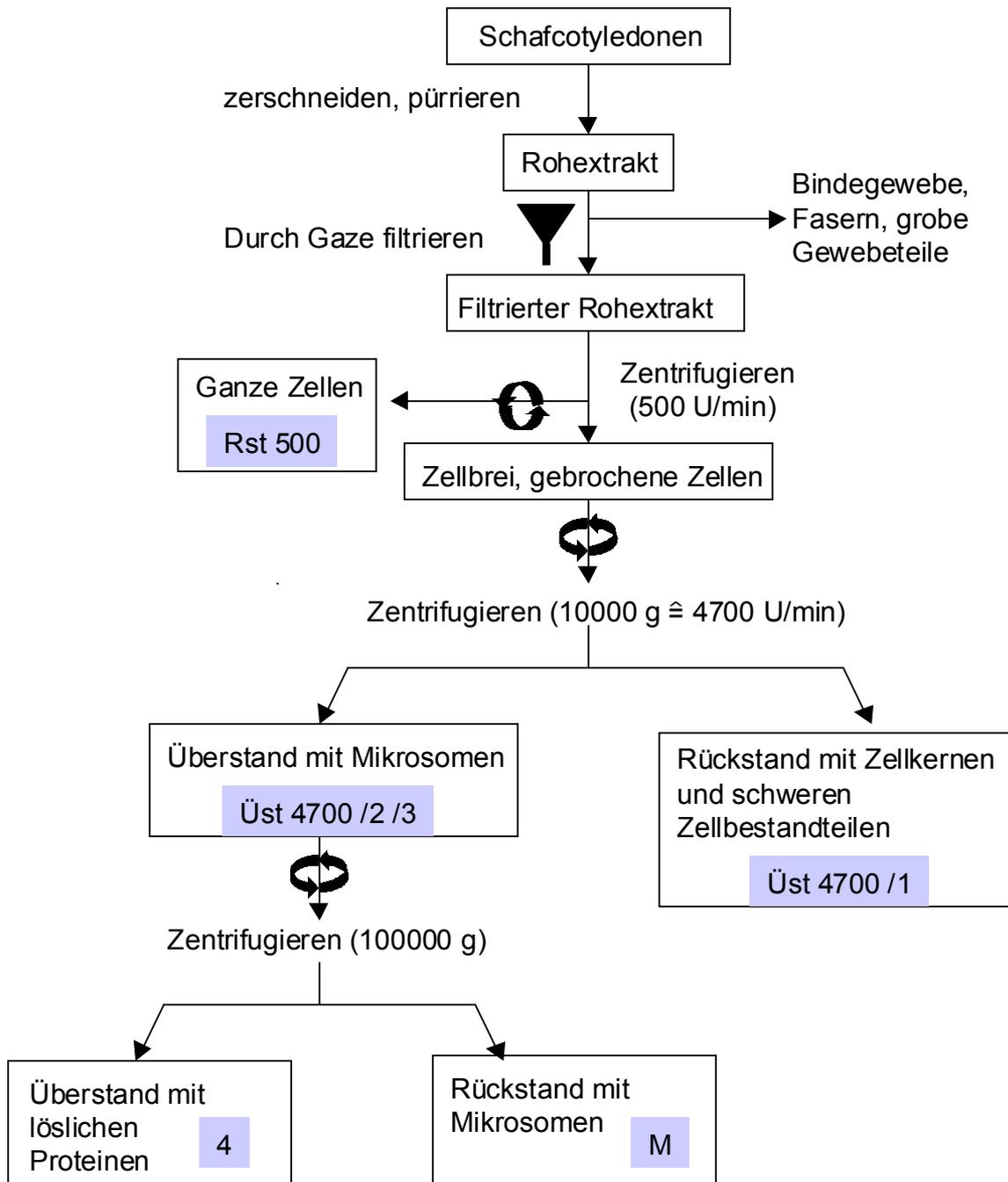


Abbildung C.2: Isolierungsschema der Mikrosomen aus Schafcotyledonen

Nach SDS-Gelelektrophorese auf Polyamidgel wurden alle enthaltenen Proteine mit Silbernitratlösung angefärbt. Von besonderem Interesse waren Proteine mit einem Molekulargewicht von 66 kDa und einer verbreiterten Bande bei 72 - 74 kDa, die typisch für PGHS-2 waren. PGHS-2 zeigt in der SDS-Gelelektrophorese im Bereich von 72-74 kDa eine Doppelbande, da bei 50 % aller Moleküle eine zusätzliche N-Glycosylierung beobachtet wird (PATRIGNANI et al., 1994). 70 kDa Proteingröße war bezeichnend für PGHS-1.

Zwar konnte nachgewiesen werden, dass PGHS-2 im Gewebe zu finden war, aber es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass PGHS-1 ebenfalls vorhanden war.

Die nach Western-Blot durchgeführten Antikörperreaktionen auf PGHS-1 und PGHS-2 detektierten PGHS-2 in allen Fraktionen, die Aktivität gezeigt hatten. Der PGHS-1 Antikörper erkannte selbst in den Mikrosomen aus Schafsamenblasen nur schwach Isoform-1. In anderen Fraktionen jedoch ließ sich auch durch ihn PGHS-2 nachweisen, erkennbar an der Doppelbande. Geringe Mengen PGHS-1 waren damit nicht sichtbar zu machen. Es wurde außerdem deutlich, dass die Gesamtproteinmenge im Vergleich zur aktiven Enzymmenge zu groß war. Eine Abtrennung des inaktiven Proteins schien sinnvoll. Solubilisierungsversuche mit TWEEN 20[®] nach FINDLAY (1990) konnten jedoch die Umsetzungsrate nicht steigern, was vermutlich an der Instabilität des Enzyms lag. Die meisten Fraktionen waren, sobald sie aufgetaut und wieder eingefroren wurden (-80°C), nicht mehr aktiv.

Tabelle C.1: Proteingehalt, Aktivität und Identitätsprüfung auf PGHS-1 und -2 von den isolierten Fraktionen

Fraktion	Protein- gehalt	Umset- zung	Umsetzung /mg Protein	Protein- nachweis 72, 70, 66 kDa	Vorhan- densein von	Vorhan- densein von
	[mg/ml]	[%/50 µl]	[% / mg]	AgNO ₃ - färbung	PGHS-1	PGHS-2
Rohextrakt	5,6	50,7	1,81	n.g.	n.g.	n.g.
filtrierter Rohextrakt	5,0	48,9	1,96	+	-	(+)
Rst 500	4,1	44,4	2,17	+	-	n.d.
Üst 4700	3,6	<5	< 0,28	n.d.	-	-
Rst 4700	2,9	86,3	5,95	+	-	+
1	3,2	25,4	1,59	+	*	+
2	5,4	4,1	0,51	+	*	-
3	2,0	5,6	0,56	+	-	-
4	3,6	-	-	n.g.	n.g.	n.g.
M	2,8	8,7	0,62	+	*	(+)
Mikrosomen COX-1	0,51	ca. 80	>100 (19000)	+	+	-

* Antikörper findet PGHS-2; n.g.: nicht getestet; n.d.: nicht detektierbar; (+): undeutlich

Die gewonnenen Mikrosomen aus Schafcotyledonen waren nach diesen Ergebnissen nicht geeignet, um auf eine selektive Hemmung von PGHS-2 Inhibitoren zu testen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessene Aktivität zumindest teilweise von mitenthaltener und hochaktiver PGHS-1 (100 % Umsetzung / mg Protein vs. max. 5,95 % Umsetzung / mg Protein) herrührte.

Auch erschwerte die in den Proben enthaltene hohe Konzentration an Protein die Detektion mittels HPLC. Arachidonsäure und ihre Metabolite wurden anscheinend an den enthaltenen Zellbestandteilen adsorbiert. Bei der Detektion war trotz der gleich großen Einspritzmenge wie im COX-1 Test nach REDL (1994) die Intensität der detektierten Signale stark vermindert.

Die Verwendung eines gereinigten Enzyms schien damit unumgänglich. Entsprechende Präparationen sind kommerziell erhältlich.

2. Entwicklung der neuen Screeningtestsysteme

2.1. Gereinigte PGHS-2 und PGHS-1

Das gereinigte Enzym Prostaglandin-H-Synthase 2 (Cyclooxygenase 2) aus Schafcotyledonen (isoliert nach der Methode von JOHNSON et al. (1995) aus der Mikrosomenfraktion) wurde von der Fa. Cayman Chemical Company bezogen. Die angegebene Reinheit betrug ≥ 70 %.

PGHS-1 (Prostaglandin-H-Synthase; Cyclooxygenase; EC 1.14.99.1; Prostaglandin endoperoxide synthase) – ebenfalls von Cayman Chemical Company - war aus Schafsamenblasen isoliert. Hier wurde eine Reinheit von ≥ 95 % angegeben.

2.1.1. Enzymstabilität

Beide Enzyme sind extrem instabil. Als Lagerungstemperatur wird -80°C vorgegeben. Durch Luftsauerstoff kann es leicht zu Autoinaktivierung kommen (vgl. Kapitel B), was durch den Zusatz des Reduktionsmittels DDC (Natrium-Diethyldithiocarbamat) in einer Konzentration von $300\ \mu\text{M}$ verhindert werden soll. In der Produktbeschreibung von Cayman wird darauf hingewiesen, dass das Enzym ohne DDC nicht länger als eine Stunde verwendbar ist.

PGHS-2 ist bei -80°C ein Jahr ohne Aktivitätsverlust lagerbar, PGHS-1 zwei Jahre.

Wichtig ist dabei, dass die Enzyme so selten wie möglich aufgetaut werden. Beobachtungen über mehrere Monate ergaben folgendes:

- a) PGHS-2 verlor bei jedem Auftauen des Originalbatches ca. 6 % seiner Aktivität, PGHS-1 verlor dabei ca. 8 % seiner Aktivität (vgl. Abbildung C.1).

- b) Wurden die Enzyme zuerst in Enzypuffer verdünnt, war mit jedem Auftauen ein Aktivitätsverlust von 10-20 % verbunden.

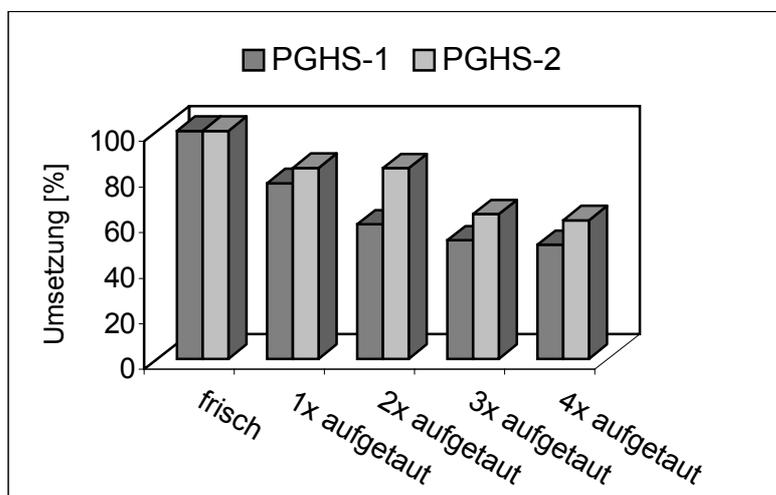


Abbildung C.1: Umsetzung von 5 μM Arachidonsäure mit 2,5 U Enzym (optimierte Bedingungen nach Abschnitt 2.2.7) jeweils gleiche μl -Anzahl nach mehrmaligem Auftauen der Originallieferung entnommen

Es war daher sinnvoll, aus dem Originalbatch, einzelne Enzymportionen zu entnehmen und vorab schon für den Test zu verdünnen. Eine Portion wurde dann jeweils bei der Durchführung eines Tests aufgebraucht. Diese Verdünnungen waren 3-6 Monate ohne Aktivitätsverlust bei -80°C lagerbar. Das Enzym, das in dieser Zeit nicht verbraucht wurde, wurde weiterhin im Originalbatch bei -80°C gelagert, um die Aktivität bestmöglich zu erhalten.

Jedes Auftauen und Einfrieren mußte langsam und ohne zusätzliche Wärmezufuhr geschehen. Der Transport wurde deshalb auf Trockeneis vom Lagerort zum Verarbeitungsort vorgenommen. Alle Verdünnungsschritte wurden bei höchstens 4°C durchgeführt.

2.1.2. Enzymaktivitätsberechnung

Um in den Tests einheitlich die Enzymkonzentration anzugeben, wurde die Menge mit Hilfe der angegebenen Units des Enzyms berechnet. Dabei wurde von der „Activity concentration“ ausgegangen.

Das bedeutete, dass bei einer Einsatzmenge von 2,5 U/Probe 0,12 μl /Probe von PGHS-1 und 0,3 μl /Probe von PGHS-2 Enzym aus der Originallieferung zugegeben wurden.

Tabelle C.1: Charakteristische Daten der verwendeten PGHS-Lieferungen: Enzymaktivität und Proteinmenge

	PGHS-1	PGHS-2 (4/ 97)	PGHS-2 (10/ 97)
Protein concentration	222 µg/ml	1274 µg/ml	1,25 mg/ml
Activity concentration	21700 U/ml (15 µl)	8395 U/ml (20 µl)	12200 U/ml (20 µl)
Specific activity	977000 U/mg	6590 U/mg	9760 U/mg

Aufgrund der Instabilität des Enzyms und der schwierigen Handhabung von derart kleinen Mengen Enzymlösung, wurden die Enzymportionen mit Enzympuffer so verdünnt, dass jeweils 1 µl für eine Probe ausreichte, und die Anzahl der Mikroliter an Enzymverdünnung der Anzahl der Proben im Test entsprach.

$$n [\mu\text{l}] = \frac{n * 2,5 \text{ U}}{\text{AC} [\text{U}/\mu\text{l}]} + x [\mu\text{l}]$$

n: Anzahl der Proben
x: Menge an Puffer zur Verdünnung
AC: Activity concentration
2,5 U: Eingesetzte Enzymmenge je Probe

Gleichung C.1: Berechnung der Enzymverdünnung für eine Portion Enzymlösung zum Einsatz im PGHS-Test

2.2. Entwicklung eines PGHS-2 und PGHS-1 Testsystems mit Radioaktivitätsdetektion (Phase 1)

2.2.1. Bestimmung der Enzymmenge

Im bisherigen Testsystem mit Radioaktivitätsdetektion wurde die Konzentration der Mikrosomenpräparation so eingestellt, dass von 4,5 µM ¹⁴C-Arachidonsäure (≅ 0,05 µCi abs.) ca. 80 % zu PGE₂ umgesetzt wurden. Dies diente als Vorgabe, die Enzymmenge im neuen Testsystem entsprechend zu wählen und die Bedingungen daraufhin zu optimieren. Um eine entsprechende Umsetzung von 75 – 85 % der Arachidonsäure in PGE₂ zu erreichen, war für den Test mit radioaktiver Arachidonsäure eine Konzentration von 2,5 U reines Enzym je Probe nötig (Abbildung C.1).

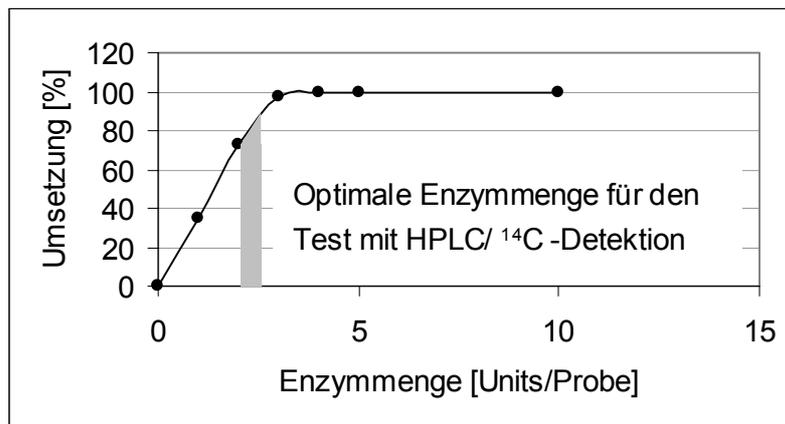
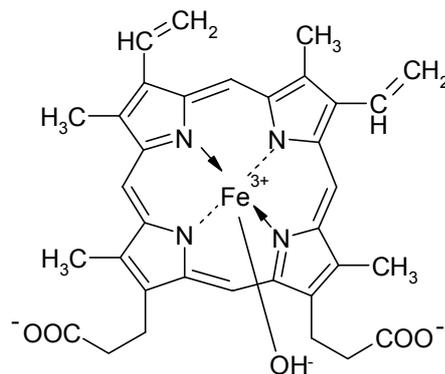


Abbildung C.1: Umsetzung verschiedener Enzymmengen PGHS-2 [Units] bei optimierten Bedingungen; optimale Enzymmenge bei Umsetzung zwischen 75-85 %

2.2.2. Einfluss und Konzentration des Cofaktors Häm [Hydroxy (protoporphyrinato) Eisen(III)]



Prostaglandin-H-Synthase ist ein Häm-abhängiges Enzym. Bei der Reinigung des Enzyms verlieren die Proteinmoleküle diese notwendige prosthetische Gruppe (Apoenzym), so dass sie nachträglich zugesetzt werden muss, um die Aktivität wiederherzustellen (Holoenzym). In Mikrosomenpräparationen ist Häm in ausreichender Menge genuin vorhanden.

Die zuzugebende Menge sollte laut Hersteller 1 μM Endkonzentration im Ansatz sein. Mit einer höheren Konzentration konnte jedoch noch eine leichte Umsetzungssteigerung erreicht werden. (1 μM \rightarrow 60 % PGE_2 ; 10 μM \rightarrow 80 % PGE_2). Hämatin wurde deshalb in einer Konzentration von **10 μM** zugegeben.

Da Hämatin sehr schwer löslich ist, musste für die Herstellung einer Lösung von Hämatin eine besondere Methode angewandt werden. Es wurde eine 10 mM Stammlösung bereitet, bei

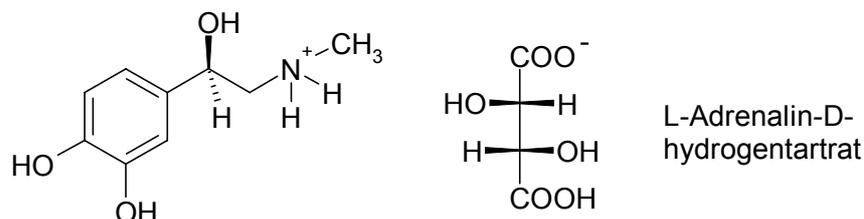
der Hematin mit 0,01 N Natronlauge in einem Volumen von 10 % des Ansatzes gelöst wurde. Anschließend wurde die Stammlösung auf ihr Endvolumen mit Assaypuffer verdünnt.

Hematin konnte ebenfalls mit gutem Lösungserfolg in 100 mM TRIS-Base gelöst werden und anschließend mit Salzsäure auf pH 8,5 eingestellt werden, bevor es wie oben beschrieben weiterbehandelt wurde. Dafür mußten allerdings große Mengen bereitet werden, da sonst volumenbedingte Probleme mit der Glaselektrode des pH-Meters auftraten.

Der Gehalt der Stammlösung von Hematin wurde mit Hilfe des Pyridin-Hemochromogentests (siehe Kapitel H 1.4.3.) geprüft und auf eine Endkonzentration von 1 mM mit Assaypuffer verdünnt. Die Lösung konnte in Portionen geteilt bei -20°C gelagert ca. ein Jahr verwendet werden.

Die Lösung von Hematin war reduktionsempfindlich. Wurde es zu früh zum Testansatz zupipettiert, sank die Umsetzungsrate, und die Umsetzungswerte schwankten stark. Dies konnte vermieden werden, wenn Hematin erst **nach Zugabe des Enzyms** in den Ansatz pipettiert wurde.

2.2.3. Einfluss und Konzentration des Cofaktors L-Adrenalin-D-hydrogentartrat



Die Tertiärstruktur der katalytischen Bereiche von PGHS ähnelt denen von Myeloperoxidasen und anderen tierischen Peroxidasen. LI et al. (1998) vermuten sogar aufgrund dieser Homologitäten, dass PGHS aus einer löslichen, angestammten Peroxidase entstand, die membranbindende Fähigkeiten erlangt hat. So konnten katalytische Korrelationen zwischen der Meerrettichperoxidase und der Peroxidaseaktivität der Prostaglandin-H-Synthase festgestellt werden (MARKEY et al., 1987).

Zur Aufrechterhaltung der Peroxidasereaktion benötigt die PGHS einen reduzierenden Cofaktor, da das Enzym sich sonst durch die entstehenden Radikale selbst inaktivieren würde. MARKEY et al. (1987) gaben an, dass das Enzym ohne Schutz durch reduzierende Substanzen durch die Radikalbildung bei der Umsetzung von $0,6 \mu\text{M}$ Arachidonsäure bereits halbmaximal gehemmt wird. Dabei korrelierten die schützenden Eigenschaften einer Substanz direkt mit ihrem Reduktionspotential. Dagegen gab es keine Korrelation zwischen der Fähigkeit von Substanzen die Peroxidaseprodukte zu reduzieren und die Cyclooxygenase-

reaktion zu hemmen. Da jedoch die Cyclooxygenasereaktion nicht unabhängig von der Peroxidasereaktion arbeitet, ist der Schutz dieser Funktion essentiell für die maximale Aktivität des Enzyms.

Als reduzierende Cofaktoren werden laut Literatur sehr unterschiedliche Stoffe verwendet. Diese besaßen unterschiedlich gute Reduktionspotentiale für die Peroxidase. Hydrochinon war besonders potent, während Phenol ein schwächeres Reduktionsmittel darstellte. Diese Fähigkeit wirkte sich auch direkt auf die Cyclooxygenasereaktion aus, wie in eigenen Versuchen nochmals belegt wurde.

Tabelle C.1: Umsetzung von 4,5 μM ^{14}C -Arachidonsäure in Anwesenheit verschiedener reduzierender Cofaktoren

		PGHS-1	PGHS-2
	Enzymmenge	Umsetzung von 4,5 μM Arachidonsäure zu PGE_2	
Phenol 2 mM	10 U	-	20 - 30 %
Adrenalin 100 μM	10 U	-	100 %
Tryptophan 1mM	2,5 U	9 %	-
Adrenalin 2 mM	2,5 U	14 - 65 %	12 - 42 %
Adrenalin 18 mM	2,5 U	54 - 79 %	64 - 85 %

Da auch die Löslichkeit der Stoffe im Assaypuffer wichtig war, wurde für den Screening-Assay Adrenalinhydrogentartrat als Reduktionsmittel gewählt. Alle andere Stoffe stießen an ihre Löslichkeitsgrenze, bevor die maximale Umsetzung erreicht worden war.

Die geeignete Menge Cofaktor wurde durch gleichzeitiges Verringern der Enzymmenge optimiert.

Der Screening-Assay sollte für beide Enzyme möglichst gleichmäßig pipettiert werden, um einfache Pipettierschemata für hohen Durchsatz zu erhalten. Deshalb wurde die zuzugebende Menge im Bereich des gemeinsamen Umsetzungsmaximums bei **18 mM Adrenalinhydrogentartrat** bestimmt. Bei höheren Konzentrationen wird die Aktivität des Enzyms von phenolischen Reduktionsmitteln nicht mehr gesteigert, sondern gehemmt (ELING et al., 1990).

Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit, wurde die Lösung von Adrenalinhydrogentartrat in Assaypuffer für jeden Assay frisch hergestellt.

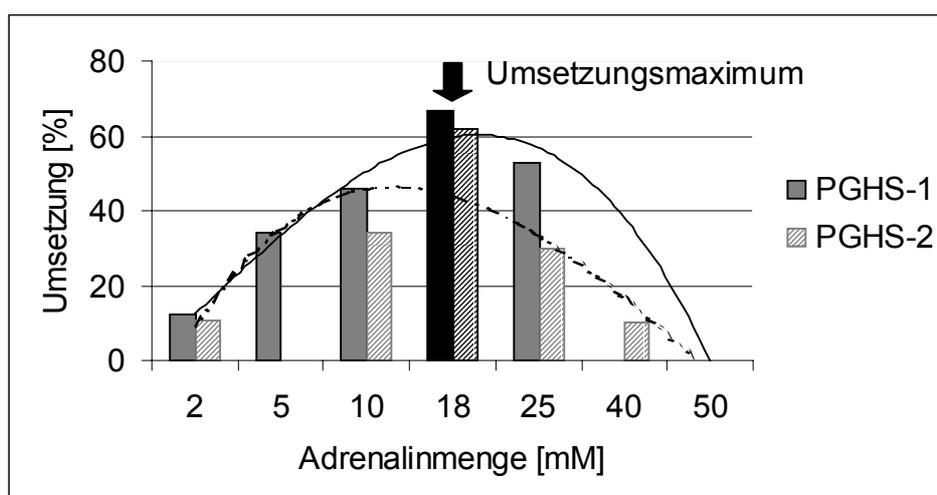


Abbildung C.1: Umsetzung von 4,5 µM ¹⁴C-Arachidonsäure zu PGE₂ mit je 2,5 U Enzym bei verschiedenen Mengen Adrenalinhydrogentartrat

2.2.4. Einfluss des Cofaktors EDTA (Di-Natrium-Ethyldiaminotetraacetat)

Sehr viele Proteasen enthalten Schwermetalle wie Zink oder Mangan. Durch Komplexieren der Metalle wird ihre Aktivität gehemmt. So wurde bei der Isolierung und bei der Arbeit mit Mikrosomen zum Schutz des Enzyms vor Metalloproteasen EDTA zugesetzt. Da die Reinheit des **PGHS-2** Enzyms nur ≥ 70 % betrug, wurden **2 mM EDTA** als Schutz zugegeben. Bei reibungslosem Versuchsablauf konnte weder in höherer noch in niedrigerer Konzentration ein Einfluß des Komplexbildners auf die Umsetzung oder Hemmung beobachtet werden, weshalb der EDTA Zusatz für PGHS-2 aus der alten Versuchsdurchführung übernommen wurde. Bei der sehr reinen PGHS-1 schien er hingegen nicht notwendig.

Tabelle C.1: Einfluß verschiedener Mengen EDTA auf die Umsetzung von 4,5 µM ¹⁴C-Arachidonsäure durch PGHS-2 bei optimierten Bedingungen

EDTA - Menge	Umsetzung von 4,5 µM Arachidonsäure zu Metaboliten (insgesamt)	Rel. Anteil PGE ₂ an den Metaboliten
5 mM	78 %	82 %
2 mM	80 %	83 %
0,5 mM	78 %	79 %
0,05 mM	74 %	86 %

2.2.5. Substratkonzentration

Als Substrat für beide Isoenzyme dient Arachidonsäure (AA). Die K_m und v_{Max} sind für beide Enzyme annähernd gleich groß (GIERSE et al., 1995). Die Substratkonzentration sollte damit für beide Enzyme gleich hoch gewählt werden. Sie beeinflusst bei kompetitiver Hemmung die halbmaximale Hemmkonzentration der Inhibitoren, so dass sie ein wichtiges Kriterium zur Bewertung von Testergebnissen darstellt (WIERER, 1988).

Der COX-1 Test mit einer Mikrosomenpräparation aus Schafsamenblasen arbeitete mit 4,5 μM Arachidonsäure. JOHNSON et al. (1994) hatten den Aktivitätstest ihres Enzyms mit 100 μM AA durchgeführt. Andere Autoren arbeiteten meist mit Mengen die zwischen diesen Werten liegen.

Es schien sinnvoll für den PGHS-Test, bei dem radioaktive Metabolite erfaßt wurden, die **Arachidonsäuremenge von 4,5 μM** aus dem alten Test beizubehalten. Damit blieben Ergebnisse, die mit der Mikrosomenpräparation gemessen worden waren mit denen vergleichbar, die mit Reinenzym vermessen wurden. Die Enzymkonzentration und die Versuchsbedingungen wie beispielsweise HPLC-Methode, Injektionsvolumen u.s.w. konnten dann auch übernommen werden.

2.2.6. Vergleichende Bestimmung von Hemmwerten

Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Testsysteme sollte gewährleistet sein, dass bekannte Hemmstoffe im neu entwickelten Screening-Assay ungefähr wieder die Hemmwerte erreichten, die aus dem bekannten COX-1 Test mit Mikrosomen aus Schafsamenblasen (REDL et al., 1994) gemessen worden waren. Die Bedingungen bei optimaler Umsetzung wurden deshalb immer zugleich geprüft, ob sie die Hemmwirkung nicht unterdrückten oder verstärkten. Vergleichende Untersuchungen von bekannten Stoffen im COX-1 Test, mit PGHS-1 und -2 Reinenzym bei optimierten Bedingungen, ließen gute Übereinstimmung erkennen.

Tabelle C.1: Vergleich von IC_{50} -Werten verschiedener Inhibitoren in den drei verwendeten Testsystemen

Substanz		COX-1 (Mikrosomen)	PGHS-1	PGHS-2
Indometacin	IC_{50}	1,9 μM	1,2 μM	1,4 μM
Phenethylferulat	IC_{50}	4,4 μM	1,8 μM	2,8 μM
Phenethylcaffeat	IC_{50}	6,2 μM	5,8 μM	4,2 μM

Tabelle C.2: Vergleich der Hemmstärke verschiedener Inhibitoren in den drei verwendeten Testsystemen

Substanz	Konzentration	Hemmung in %		
NS-398	5 µM	8,5	-	43,7
	10 µM	16,7	28,2	52,2
	50 µM	23,9	15,7	95,8
Meloxicam	10 µM	9,9	12,5	25,8
	50 µM	14,1	-	36,9
Nimesulid	50 µM	12	4,6	64,7
	100 µM	28,3	45,6	85,1
	250 µM	55,8	35,4	78,2
ASS	1 mM	80,1	100	71,5
Valerylsalicylsäure	1 mM	85,9	42,6	57,4

Einige Hemmwerte schwankten bei der Detektion sehr stark, so dass hier Mittelwerte aus mind. drei Messungen angegeben sind. IC_{50} -Werte wurden nur berechnet, wenn die Hemmstärken von verschiedenen Konzentrationen bei semilogarithmischer Auftragung über 90 % Korrelation zu einer Geraden zeigten.

Im PGHS-2 Testsystem konnten die IC_{50} -Werte von NS-398 und Nimesulid mit 7,1 µM bzw. 32 µM berechnet werden. Der Test zeigte deutlich, dass diese Substanzen selektiv PGHS-2 hemmen.

Interessanterweise zeigte Meloxicam als präferenzierter Hemmstoff nur sehr schwache Wirkung in allen Testsystemen. Die Vermutung, dass die Löslichkeit des Stoffes nicht ausreichte, konnte durch Verwendung von Meloxicam-Megluminat als wasserlösliches Salz nicht belegt werden. Die Hemmung ließ sich damit nicht steigern.

2.2.7. Testdurchführung I

Der Test mit ^{14}C -markierter Arachidonsäure wurde - wie Abbildung C.1 zeigt - durchgeführt.

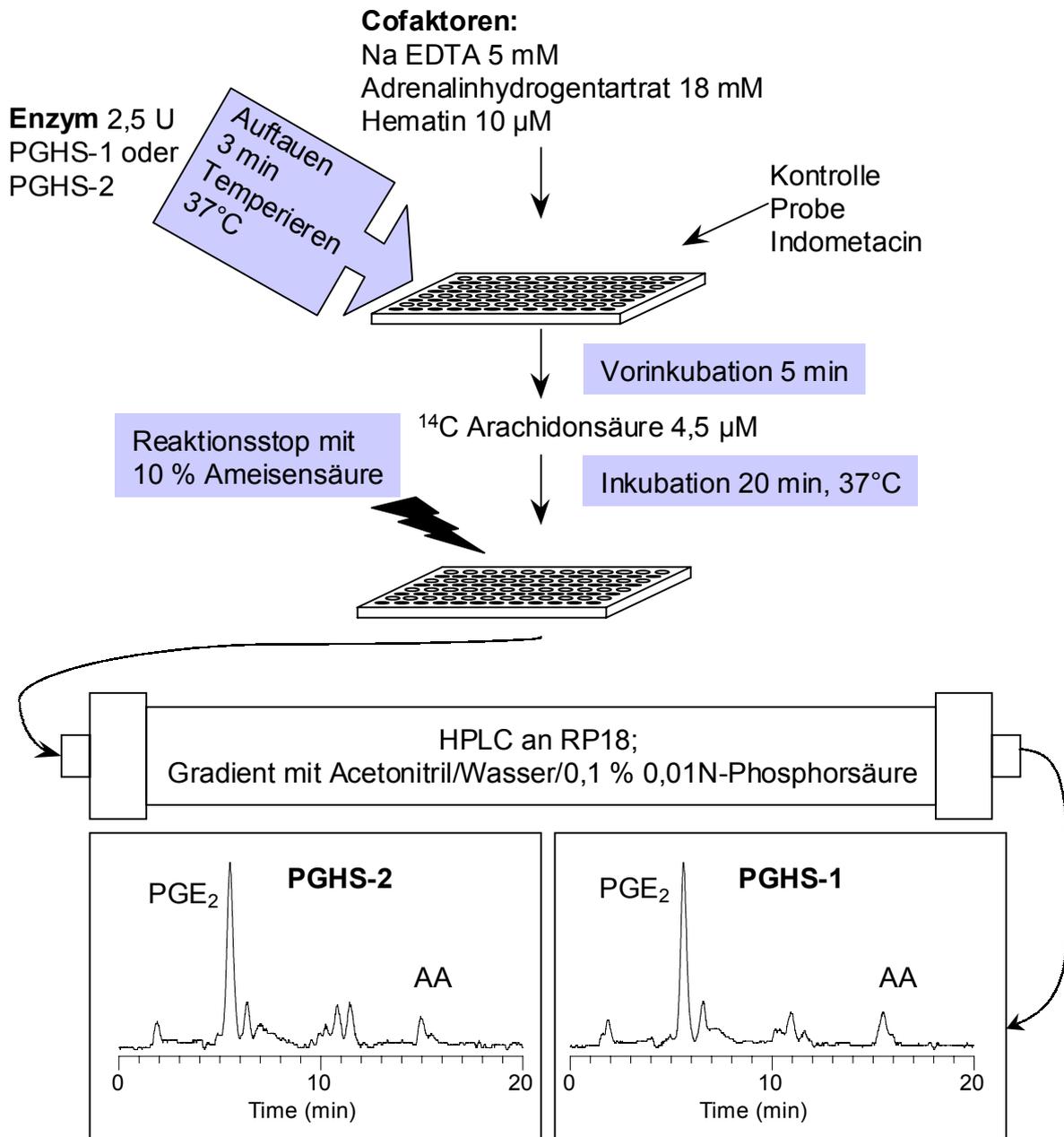


Abbildung C.1: Durchführung des PGHS-1 und PGHS-2 Tests mit radioaktiv markierter Arachidonsäure und Detektion mit Radioaktivitätsmonitor nach HPLC-Trennung

2.3. Umsetzungsprodukte

Die Umsetzungsprodukte aus der Reaktion der radioaktiv markierten Arachidonsäure mit Prostaglandin-H-Synthase konnten nach HPLC-Trennung auf RP18-Material mit Radioaktivitätsdetektor sichtbar gemacht werden. Der COX-1 Test mit der

Mikrosomenpräparation aus Schafsamenblasen lieferte überwiegend PGE₂. Nur geringe Mengen HETE, PGD₂ und PGF_{2α} wurden detektiert. Dies wurde vor allem durch die nachfolgende Reaktion der Prostaglandin-E-Synthase gewährleistet. Sie ist ein mikrosomales, Glutathion-abhängiges, induzierbares Enzym (MOONEN et al., 1982; JAKOBSSON, 1999), das neben PGHS-1 in dieser Präparation enthalten war. Die löslichen Synthetasen wie PGF_{2α}-Synthase sollten weitgehend durch die Ultrazentrifugation bei der Mikrosomenisolierung in den Überstand gelangt und dadurch entfernt worden sein.

In der gereinigten Prostaglandin-H-Synthase waren keine zusätzlichen Synthetasen für die weitere Umwandlung von PGH₂ vorhanden. Damit war die anschließende Umwandlung des instabilen PGH₂ sehr viel ungerichteter und es erschienen deutlich mehr Reaktionsprodukte (vgl. Abbildung C.1 A und B).

Um die Detektion auf EIA umstellen zu können, war es allerdings sehr wichtig, eine **einheitliche Umsetzung** mit möglichst **wenig unterschiedlichen Metaboliten** zu erhalten. Günstig schien es, die Umsetzung zu PGE₂ zu forcieren, da es zu diesem Produkt bekannte EIA-Detektionsverfahren gab und physiologisch PGE₂ ein wichtiger Mediator im Entzündungsgeschehen ist.

Das eigentliche Produkt der PGHS ist PGH₂, das **enzymatisch** und **chemisch** weiter zu den verschiedenen Prostaglandinen wie PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} umgewandelt werden kann (RAZ et al., 1976). Radikalische katalysierte Umsetzung führt verstärkt zu PGF₂ (GRANSTRÖM et al., 1990), während unter physiologischen Bedingungen PGE₂ und Prostacyclin Hauptumsetzungsprodukte der COX-2 sind (BROCK et al., 1999). PGE₂ ist dabei wiederum das chemisch stabilere Produkt (STEHLE, 1982). Durch die Zusammensetzung des Assaymediums ließen sich also Art, Zahl und Menge der Nebenprodukte beeinflussen.

2.3.1. Einfluss des pH-Wertes des Assaymediums

NOREEN et al. (1998) hatten die Umsetzung der PGHS-Isoenzyme im pH-Bereich zwischen 7,6 – 8,4 geprüft und konnten keinen Unterschied bei der Umsetzungsrate feststellen. Da sie jedoch nicht untersucht hatten, ob sich das Umsetzungsmuster ändert, wurde bei pH 7,7, pH 8,0 und pH 8,3 das Metabolitenmuster der Kontrollen aufgenommen und verglichen. Bei pH 7,7 entstanden verstärkt HETE-Derivate, bei pH 8,3 wurde hingegen ca. 40 % mehr PGD₂ als bei pH 8,0 detektiert (Tabelle C.1).

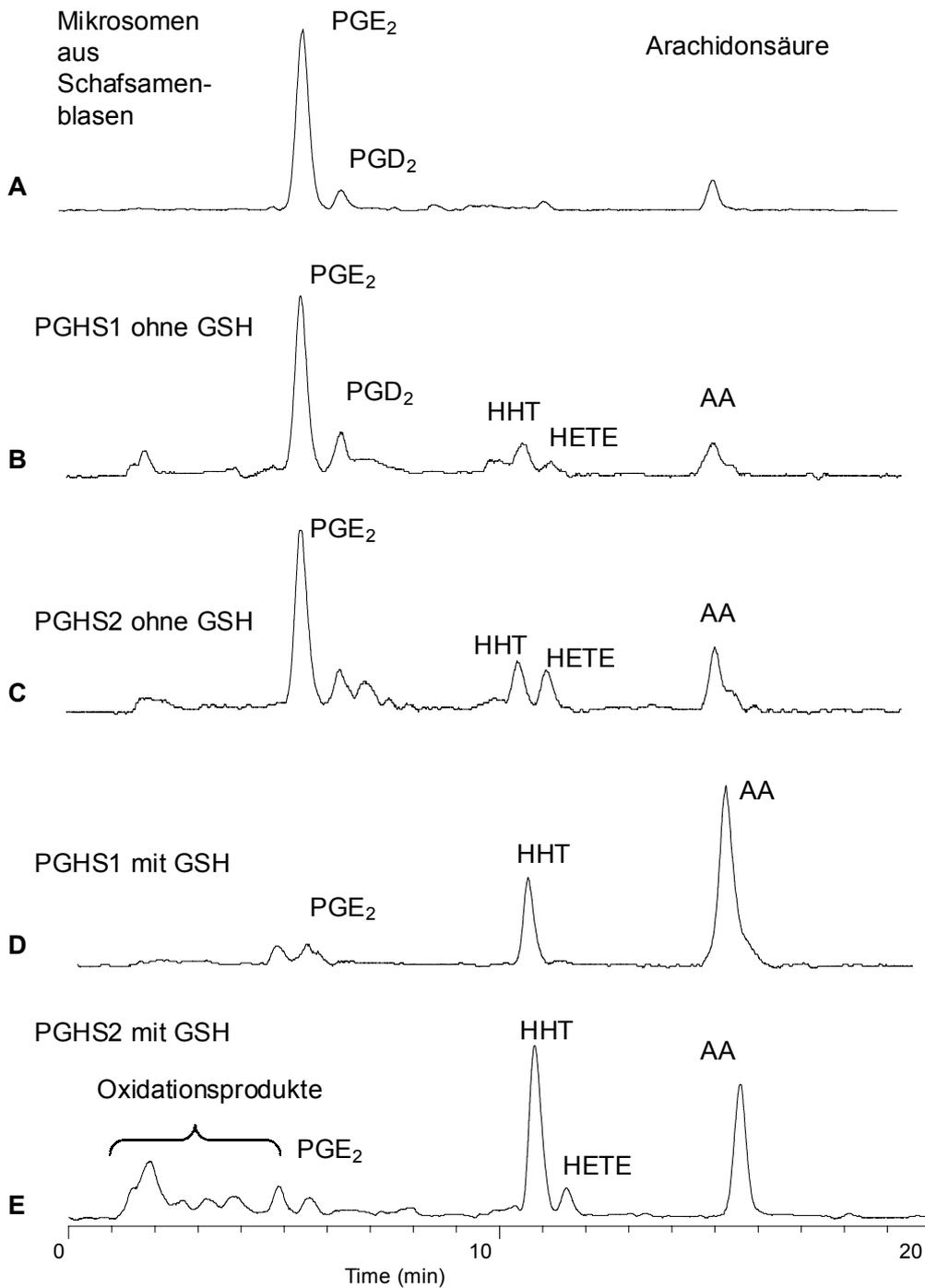


Abbildung C.1: HPLC-Chromatogramme der Metabolite von $4,5\text{ }\mu\text{M}$ ^{14}C -Arachidonsäure zu
 A: im COX-1 Test (Mikrosomen aus Schafsamenblasen)
 B: mit 2,5 U PGHS-1; 18 mM Adrenalinhydrogentartrat
 C: mit 2,5 U PGHS-2; 18 mM Adrenalinhydrogentartrat
 D: mit 2,5 U PGHS-1; 18 mM Adrenalinhydrogentartrat und 1 mM GSH
 E: mit 2,5 U PGHS-2; 18 mM Adrenalinhydrogentartrat und 1 mM GSH

Tabelle C.1: Umsetzungsprodukte von PGHS-1 bei verschiedenen pH-Werten

Angaben in [%]	AA	PGE ₂	andere PGs	HETEs	Oxidations- produkte
pH 7,7	41	33	4 (D ₂)	21	-
pH 8,0	54	31	7	8	-
pH 8,3	34	28	12	18	8

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde **pH 8,0** als günstigster pH-Wert für den Assay gewählt.

2.3.2. Einfluss von reduziertem Glutathion (GSH)

War im Assaymedium reduziertes Glutathion enthalten, konnte PGE₂ nicht mehr als Hauptmetabolit detektiert werden. Hier erschien sowohl bei PGHS-1 als auch bei PGHS-2 ein Peak bei 10,6 min, der deutlich höher war als das PGE₂-Signal (vgl. dazu Abbildung C.1 D und E). RAZ et al. (1976) hatten in ihren Versuchen gefunden, dass die **chemische** Umwandlung von PGH₂ nicht von GSH, Häm oder Tryptophan beeinflusst wurde, während Mercaptoethanol und Hydrochinon die Umwandlung zu PGF_{2α} begünstigten. **Enzymatisch** ließ sich allerdings mit GSH die Synthese von PGE₂ erhöhen, was sich auf die Abhängigkeit der PGE-Synthase von GSH zurückführen ließ.

Eigene Versuche mit diesen Substanzen haben folgendes gezeigt: wurde Tryptophan als Reduktionsmittel der Testlösung zugegeben, verminderte sich im Vergleich zu Adrenalinbitartrat die Aktivität des Enzyms, da durch die begrenzte Löslichkeit der Aminosäure die eingesetzte Menge nicht stark genug erhöht werden konnte. Mit einem Zusatz von Mercaptoethanol wurde ein deutlich komplexeres Umsetzungsmuster gefunden. Der Metabolit PGF_{2α} lag jedoch nicht wesentlich erhöht vor, allerdings wurden bei 9,7, 10,2 und 10,6 min weitere Peaks detektiert. Der Peak bei 10,6 min stimmte mit dem Peak überein, der durch die Zugabe von GSH intensiv verstärkt wurde.

O'BRIEN (1988) hatte beschrieben, dass in einer zweiten Reaktion die freien Radikale der Peroxidasereaktion mit der Thiolgruppe der Stoffe reagieren. Dabei entsteht ein freies Thiylradikal. Physiologisch könnten damit toxische Stoffe abgefangen werden und in wasserlösliche Konjugate überführt werden. Jedoch gab O'BRIEN keine Auskunft, welche Stoffe durch das Thiylradikal aus Arachidonsäure von der PGHS gebildet werden.

WIERER (1988) hatte Peaks mit Retentionszeiten zwischen PGE₂ und Archachidonsäure Lipoxygenase typischen Produkten wie Hydroperoxyfettsäuren (HETE) zugeordnet. Diese entstanden bei der von der Cyclooxygenase entkoppelten Reaktion der Peroxidase. Um

Auskunft über den Peak bei 10,6 min zu erhalten, wurde eine LC-MS-Analyse durchgeführt, welche die Zuordnung der Peaks ermöglichte.

2.3.3. Identifizierung der Umsetzungsprodukte mittels HPLC-MS

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Identifizierung der Umsetzungsprodukte beschrieben: dünn-schichtchromatographische Untersuchungen (z.B. NUTGEREN et al., 1973), gaschromatographische Untersuchungen mit massenspektroskopischer Detektion nach vorangegangener Derivatisierung (MACLOUF et al., 1982; PACE-ASCIAK, 1985; FRÖLICH, 1985; FITZGERALD et al., 1985; FERRETTI et al., 1987; HUBBARD et al., 1987; SCHWEER et al., 1994; LEHMANN et al., 1995) und HPLC-Untersuchungen der Metabolite an RP-18 Material mit verschiedenen Fließmittelgemischen (z.B. VERHAGEN, 1986; POWELL, 1985; ESKRA et al., 1986; ELING et al., 1982; VAN ROLLINS, 1982).

WIERER (1988) hatte mit Hilfe von Referenzsubstanzen Zuordnungen zu den Substanzen getroffen, die im COX-1 Test auftraten. Da wir zur Bestimmung der entstandenen Metabolite wegen der direkten Übertragbarkeit der Ergebnisse ebenfalls die HPLC-Methode beibehalten wollten, jedoch zusätzliche Aussagen zu den Substanzen außer den Retentionszeiten benötigten, bestimmten wir sie durch LC-MS-Messung auf der gleichen Säule wie die radioaktiven Metabolite und mit dem gleichen Fließmittelgradienten.

Ein Gemisch mit verschiedenen Prostaglandinen, ein Gemisch verschiedener Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) und Proben mit und ohne GSH-Zusatz wurden mit LC-MS-APCI-Technik (liquid chromatography mass spectrometry atmospheric pressure chemical ionisation) nach der von uns verwendeten HPLC-Methode analysiert. LC-EI-MS war bereits erfolgreich von SAJIKI et al. (1998) zur Identifikation verschiedener Eicosanoide verwendet worden. Chemische Ionisation mit Ammoniakgas versprach zwar schonendere Ionisation, jedoch einen Verlust von Fragmentation.

Das Gemisch der Prostaglandine enthielt PGE₂, PGD₂, PGA₂, PGB₂ und PGJ₂, das Gemisch der Hydroxyfettsäuren 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE und 15-HETE. Da anorganische Säuren nicht für LC-MS-Messungen verwendet werden können, wurde als Säurezusatz 0,01 % Ameisensäure anstatt Phosphorsäure verwendet. Die Retentionszeiten der Substanzen verschoben sich dadurch nicht. Um die Anlage nicht mit radioaktiven Substanzen zu belasten, wurde mit kalter Arachidonsäure gearbeitet.

In einem Vorversuch wurde ein Chromatogramm bei 200 nm aufgenommen, welches jedoch zur Identifizierung der Substanzen nur wenige Anhaltspunkte lieferte, da mit DAD nur Endabsorptionen gemessen wurden. Jedoch ließ sich mit diesem Chromatogramm feststellen, dass die Retentionszeiten von UV- und Radioaktivitätsdetektor übereinstimmten. Anschließend wurde eine Trennung mit dem Massenspektrometer über negative Ionisierung detektiert. Mit positiver Ionisation waren Prostaglandine nicht sichtbar gewesen. Abbildung

C.1, Abbildung C.2 und Abbildung C.3 zeigen Chromatogramme und Spektren der Referenzsubstanzen. Alle Substanzen konnten auf diese Weise eindeutig zugeordnet werden.

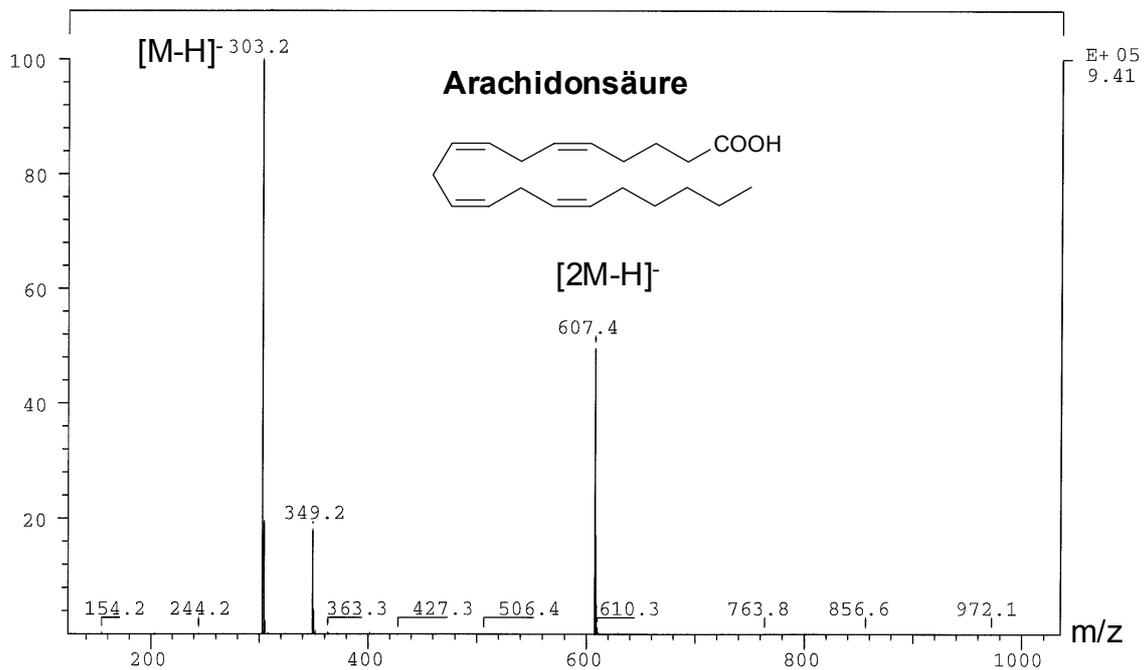


Abbildung C.1: Spektrum der LC-MS Messung von Arachidonsäure

Arachidonsäure war in größeren Mengen mit UV bei 200 nm detektierbar. Sie ließ sich im Direkteinlaß problemlos massenspektrometrisch erfassen. Nach dem LC-Lauf wurde zusätzlich das Dimere als Masse aufgezeichnet. Weitere Addukte entstanden durch Addition von Wasser und Ammoniak.

Die Prostaglandine wurden durch den Wasser/Acetonitril-Gradienten sehr schlecht getrennt. PGE₂ und PGD₂ erschienen getrennt bei 5,19 min und 6,12 min. Prostaglandin A₂, B₂ und J₂ ließen sich jedoch nicht trennen und wurden nach 9,41 min gemeinsam eluiert. Diese Verbindungen waren auch über ihre Masse nicht weiter unterscheidbar.

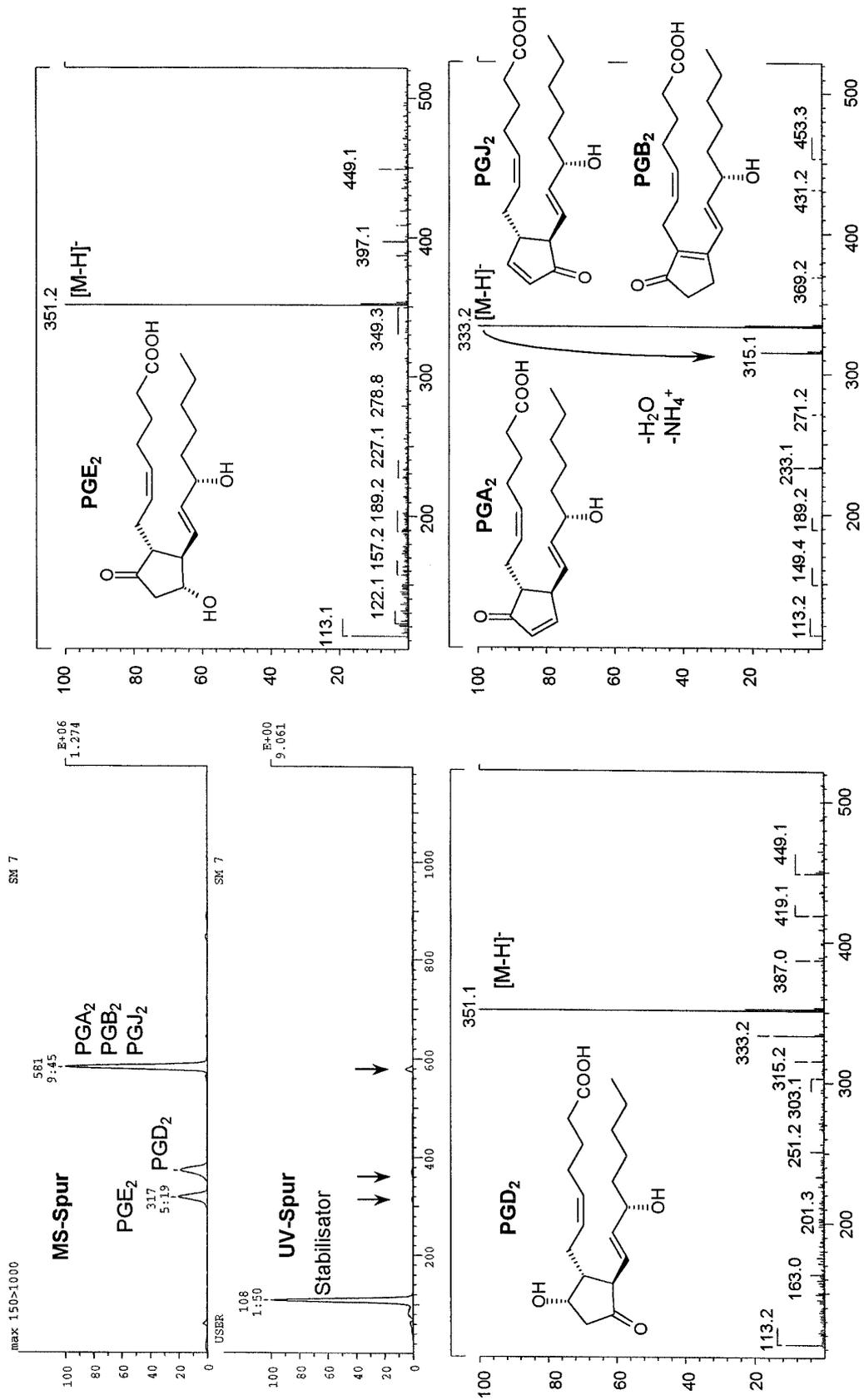


Abbildung C.2: Chromatogramme und Spektren der LC-MS Messung einer Prostaglandinmischung

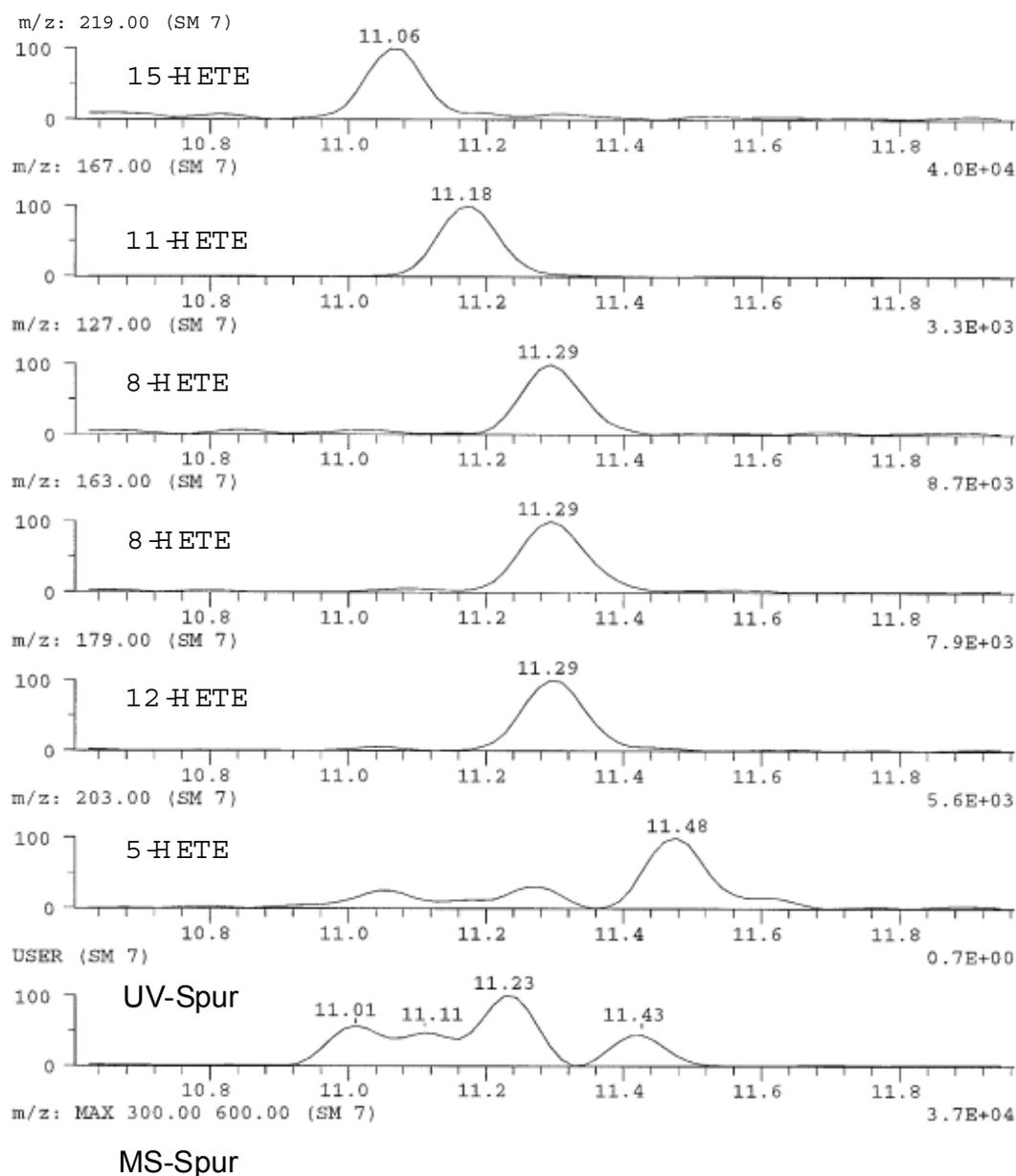


Abbildung C.3: Chromatogramme der LC-MS Messung einer HETE-Mischung (Methode COX, negative Ionisation, 60 V)

Hydroxyeicosatetraensäuren ließen sich mit der HPLC-Methode nur mäßig trennen. Sie erschienen fast gleichzeitig zwischen 10,4 und 11,5 min. Ihre Elution war nicht grundliniengetrennt. Jedoch ließen sich die HETEs über ihr typisches Spaltungsmuster bei einer Ionisierungsenergie von 70 V eindeutig zuordnen (SAJIKI et al., 1998). Dabei wurde 15-HETE bei 11,06 min im Massenspektrometer erfaßt, 11-HETE bei 11,17 min, 8-HETE und 12-HETE bei 11,29 min und 5-HETE bei 11,47 min.

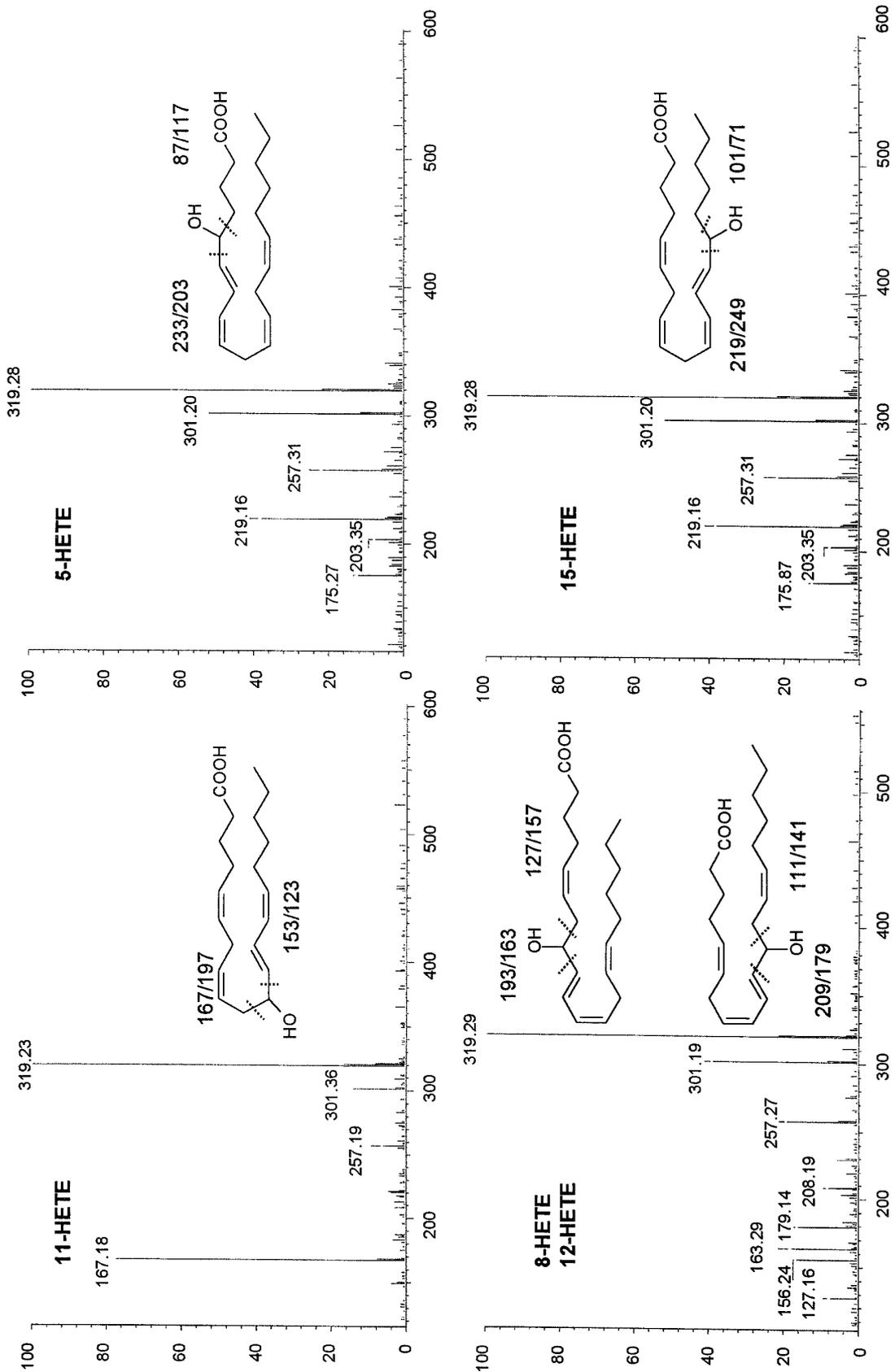


Abbildung C.4: Massenspektren der HETE Referenzsubstanzen

Unter den selben Bedingungen wurde massenspektrometrisch eine Probe analysiert mit den Metaboliten, die bei der Umsetzung von 10 μM Arachidonsäure mit 2,5 U Reinzym PGHS-1 oder -2 in Anwesenheit von 5 μM GSH, 5 mM EDTA, 5 μM Hematin und 18 mM Adrenalinhydrogentartrat entstanden. Da alle Stoffe nur in sehr geringer Konzentration vorlagen, wurden mehrere Proben vereint und die Umsetzungsprodukte mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Einengen wurde der Rückstand in Ethanol p.A. wieder aufgenommen und mit LC-MS analysiert.

Trotz Anreicherung war die Konzentration der Umsetzungsprodukte nur niedrig. Deshalb wurde ein großes Volumen der Probe injiziert und es wurden nur Substanzen im Reaktionsgemisch zugeordnet, die mit Hilfe der Referenzsubstanzen eindeutig erkannt oder aus Vergleichen mit den Angaben von WIERER (1988) zweifelsfrei zugeordnet werden konnten. Es handelte sich dabei um Arachidonsäure, verschiedene Prostaglandine und Hydroxyfettsäuren.

Im früheren Referenzlauf (Abbildung C.1 D und E) mit radioaktiv markierten Produkten, wurde neben Arachidonsäure der Peak bei 10,6 min als Hauptpeak detektiert. Kleinere Peaks waren bei 5,3 min, 6,2 min und 11,3 min zu finden. Nur diese Produkte sollten näher betrachtet werden.

Die UV-Detektion bei 200 nm zeigte deutliche Signale im Startbereich, bei 2,3, 3,5, 4,6 und 9,3 min. Diese hatten weder nach Masse noch Retentionszeit Eigenschaften von Cyclooxygenasemetaboliten. Ein Hauptpeak aus der Radioaktivitätsdetektion bei 10,6 min hatte eine Masse [M-H] von 279, bei dem Peak bei 11,3 min konnte die Masse [M-H] 319 gemessen werden.

Über die Retentionszeiten und Massenspektren wurde der Peak bei 10,6 min als 12-HHT (12-Hydroxyheptadeca-5(Z),8(E),10(E)-triensäure) identifiziert, der Peak bei 11,1 min als 15-HETE. 12-HHT entsteht bei der weiteren Umsetzung von PGH_2 als Produkt neben PGD_2 , PGE_2 und PGF_2 . Eine ausführliche Studie von CAPDEVILA et al. (1995) beschrieb das Phänomen der stereoselektiven Bildung von 12(S)-HHT durch gereinigte PGHS-1 und PGHS-2. Diese Untersuchungen bewiesen, dass 12-HHT nach enzymatischer Umwandlung von Arachidonsäure entsteht und nicht spontan entsteht. Durch Hemmung der PGHS-2 durch ASS blieb als Restaktivität die Bildung von 15-HETE. Seine Bildung wurde durch GSH nicht beeinflusst. GSH scheint bei der Umwandlung von PGH_2 zu 12-HHT die reduzierende Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen zwischen den Kohlenstoffen 8,9 und 11,12 in PGH_2 zu begünstigen. Dabei wird Malondialdehyd eliminiert und oxidiertes Glutathion (GSSG) gebildet. Eine Bildung von Thionylradikalen durch PGHS, die ELING et al. (1992) beschrieb, scheint keinen Einfluß auf diese Reaktion zu besitzen.

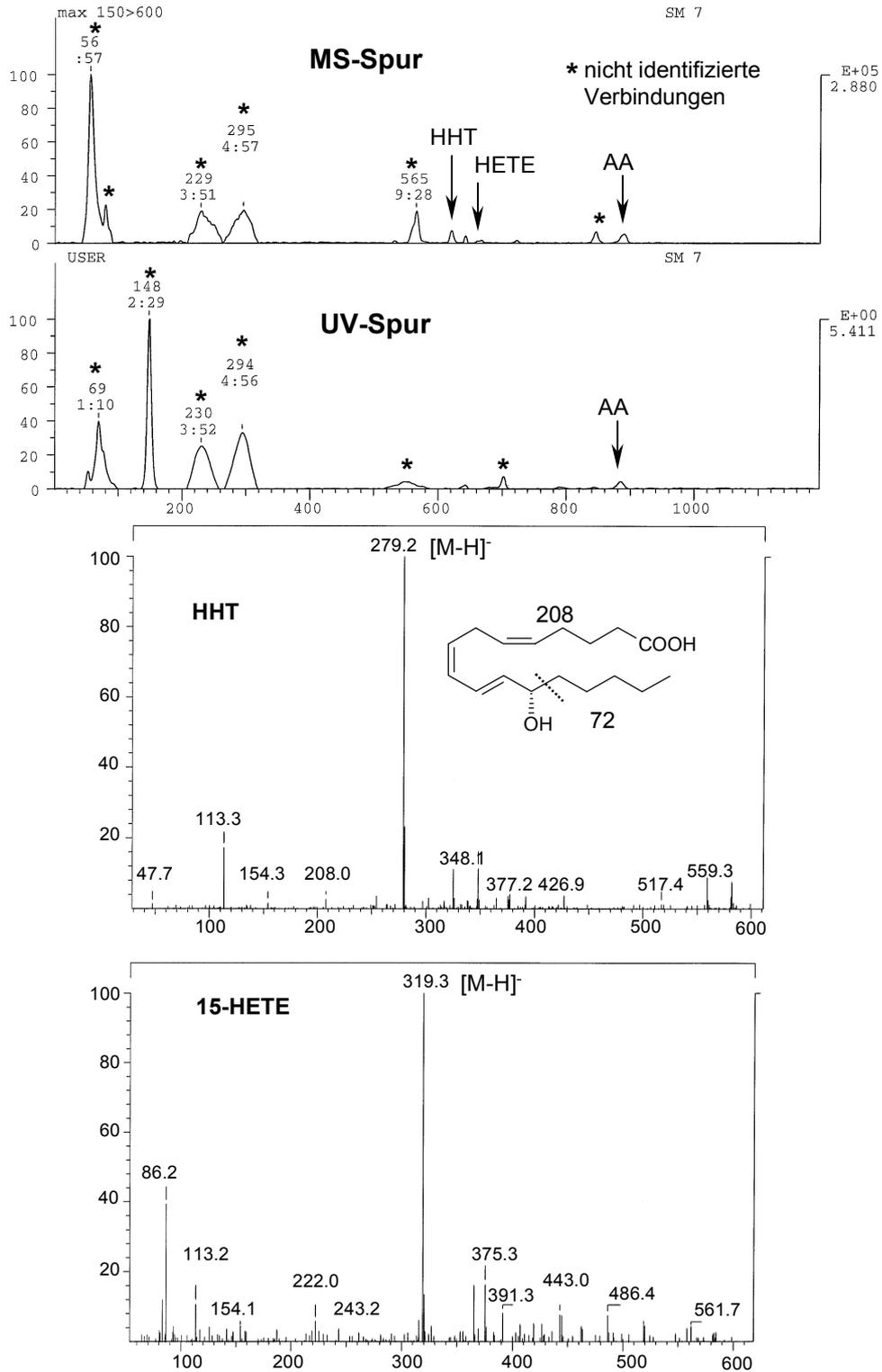


Abbildung C.5: LC-MS Messung einer Probe nach Umsetzung im PGHS-1 Assay mit GSH

Die gesteigerte Umsetzung von Arachidonsäure zu 12-HHT durch PGHS beschrieben auch MARGALIT et al. (1998) für rekombinate Cyclooxygenase und bei *in vivo* Versuchen an

Makrophagen mit Harnsäurekristallen. Dabei zeigte sich, dass erhöhte GSH-Spiegel die Prostaglandinproduktion hemmen und damit in der Regulation der Prostaglandinbiosynthese eine wichtige Rolle spielen.

THURESSON et al. (2000) zeigten in ihren Untersuchungen, dass PGHS je nach Ausrichtung der Arachidonsäure beim Eintritt ins katalytische Zentrum Lipoxygenaseeigenschaften entwickelt. So detektierten sie neben PGH₂ und Derivaten, größere Mengen von 11-HETE und 15-HETE. Diese Produkte schienen damit nicht vermeidbar im PGHS-Screening-Assay zu sein. Jedoch unterschieden sich die K_m -Werte für jedes einzelne Produkt, so dass mit der Substratkonzentration ihre Entstehung leicht verschoben werden konnte.

2.4. Inkubationszeiten und Reaktionszeiten

Nach Auftauen einer Enzymportion und dreiminütigem Temperieren bei Raumtemperatur wurde das Enzym ohne zeitliche Verzögerung im Verhältnis 1:100 verdünnt, gut durchmischt und zum Reaktionsgemisch zupipettiert. Dann wurde Hematin zugegeben und die Vorinkubation gestartet.

Die Vorinkubationszeit diente einerseits dazu, das Enzym zu temperieren und zu gewährleisten, dass sich das Holoenzym aus Apoenzym und Hematin bilden konnte, um volle Aktivität zurückzuerhalten. Andererseits war der Inhibitor bereits in der Reaktionslösung, so dass das Enzym damit konfrontiert wurde. Für zeitlich abhängige, reversible Hemmstoffe wie Indometacin und Ibuprofen (vgl. Kapitel **B**) sollte sich ein Diffusionsgleichgewicht einstellen. Damit konnten starke Schwankungen, die durch zeitlich unpräzises Arbeiten entstanden, vermieden werden.

Die Länge der Inkubationszeit hatte maßgeblichen Einfluss auf die Höhe der gefundenen Hemmwerte. OUELLET et al. (1995) und GIERSE et al. (1999) hatten bereits darauf hingewiesen, dass Indometacin und NS-398 zeitabhängig die PGHS-1 und PGHS-2 hemmen. Ohne zeitliche Abhängigkeit reagierte Ibuprofen. Als Mischtypen mit anfänglicher Zeitabhängigkeit waren z.B. Mefenaminsäure, Piroxicam oder Naproxen zu finden. Die IC_{50} -Werte schwankten bei GIERSE für zeitabhängige Hemmstoffe nur schwach, egal ob sie mit kurzer oder langer Vorinkubationszeit ermittelt worden waren. Bei kompetitiven Hemmstoffen jedoch traten große Differenzen der IC_{50} -Werte zwischen langer und kurzer Vorinkubationszeit auf. Unterschieden sich die Hemmmechanismen, wie beispielsweise bei Celecoxib, das COX-1 kompetitiv und COX-2 zeitabhängig hemmt, unterschieden sich je nach Vorinkubationslänge auch die Hemmwertverhältnisse sehr stark.

Dies gab Anlaß, für unseren Test, in dem zeitabhängige Inhibitoren als Positivkontrollen dienten, den zeitlichen Verlauf der Umsetzung und der unterschiedlichen Hemmung zu beobachten.

Wie Abbildung C.2 zeigt, war bis 2 min Vorinkubationszeit eine starke Steigerung der Umsetzung der Kontrollen im PGHS-2 Test erkennbar, anschließend wurde zwischen 3 und 10 min nur noch eine leichte weitere Steigerung beobachtet.

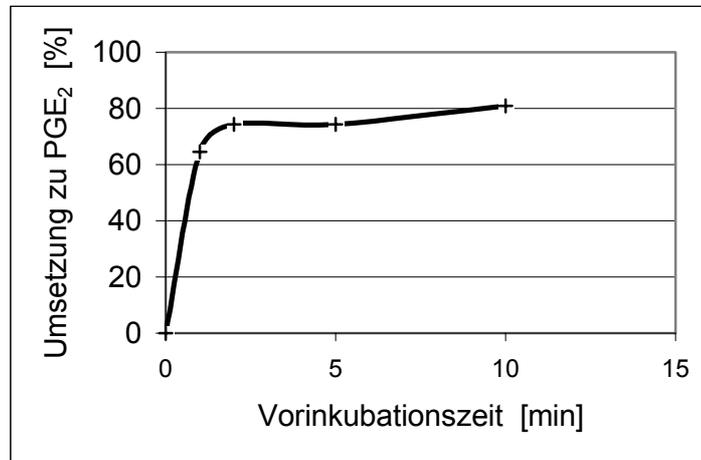


Abbildung C.1: Umsetzung der Kontrollen (Ethanol p.A.) im PGHS-2 Test nach unterschiedlicher Vorinkubationszeit

Gleichzeitig erhöhte sich aber auch die Umsetzung der Proben, die Inhibitor enthielten. Da dies mit einer zeitlichen Verzögerung geschah, konnte bei ca. 5-6 min ein Hemmwertmaximum (Abbildung C.2) gemessen werden. Im PGHS-1 Test wurden analoge Beobachtungen gemacht wie im PGHS-2 Test. Deshalb wurden 5 min als günstigste Vorinkubationszeit gewählt.

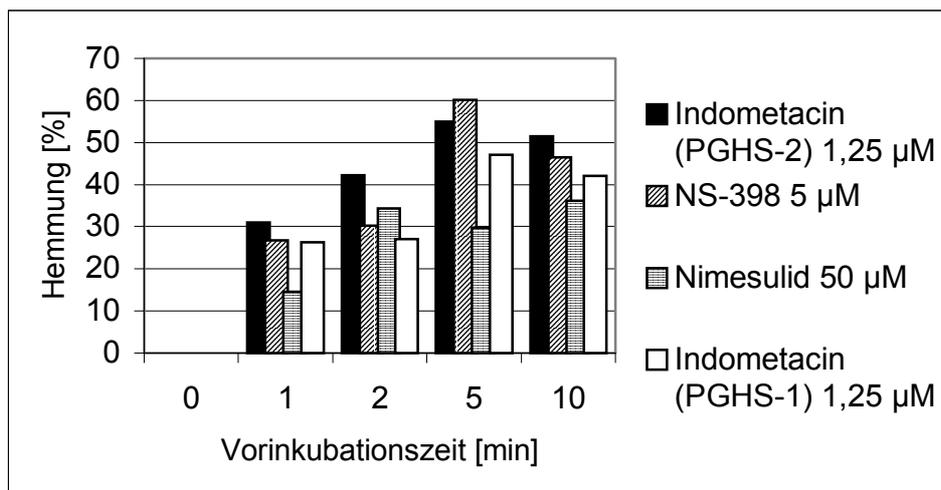


Abbildung C.2: Prozentuale Hemmwirkung verschiedener Inhibitoren nach unterschiedlicher Vorinkubationszeit

Nach der Vorinkubationszeit wurde Arachidonsäure zugegeben, um die Reaktion zu starten. Voruntersuchungen (Abbildung C.2) hatten gezeigt, dass die Umsetzung von Arachidonsäure mit der Mikrosomenpräparation erst bei einer Reaktionszeit von ca. 15 min ein Plateau erreicht. Diese zeitliche Abhängigkeit konnte auch beim Test mit Reinezym festgestellt werden. Allerdings war hier die Kurve deutlich flacher. Bei 20 min wurde auch mit Reinezym keine weitere nennenswerte Umsatzsteigerung mehr erzielt. Die Reaktionszeit von 20 min wurde deshalb beibehalten. Da bei 20 min das Umsatzmaximum erreicht war, wirkten sich zeitliche Schwankungen bei der Testdurchführung nicht mehr stark aus. Dies resultierte in einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

2.5. Umstellung des Testes für die Detektion mit Enzym-Immuno-Assay (EIA) (Phase 2)

Im Test mit radioaktiver Arachidonsäure konnte durch Optimierung der Cofaktoren und des Assaymediums sichergestellt werden, dass PGE₂ das Hauptumsetzungsprodukt der Reaktion der PGHS darstellte. Dies war Voraussetzung, um den Test mit Hilfe eines PGE₂-Enzym-Immuno-Assays (EIA) auswerten zu können. Eine Änderung des für Reinezym optimierten Assaymediums war nicht mehr nötig. Adrenalinhydrogentartrat wurde also in einer Konzentration von 18 mM, EDTA von 2 mM nur im PGHS-2 Assay und Hematin von 5 bzw. 10 µM verwendet. Statt radioaktiver Arachidonsäure wurde nun allerdings kalte Arachidonsäure zugegeben.

Bei Detektion mit EIA konnte die Abnahme der Arachidonsäuremenge nicht mitberücksichtigt werden, so dass eine optimale Umsetzung zu PGE₂ angestrebt wurde. Dies wurde durch den Einsatz einer äquivalenten Menge kalter Arachidonsäure gesehen. Allerdings machten die ersten Versuche, den Ansatz gemäß Abschnitt 2.2.7 direkt mit dem PGE₂-EIA-Kit auszuwerten, deutlich, dass der EIA ca. 1000 mal empfindlicher war, als die Detektion mit Radioaktivitätsdetektor. Es war deshalb eine sehr starke Verdünnung der Proben notwendig.

Zwei Möglichkeiten waren denkbar, diesen notwendigen großen Verdünnungsschritt zu umgehen:

- a) Herabsetzen der Substratkonzentration
- b) Herabsetzen der Enzymmenge.

Die effektivere Möglichkeit schien die Veränderung der Enzymmenge zu sein. Die Enzymmenge sollte nun so gewählt werden, dass die maximale Verdünnung nicht größer als 1:100 war, um die Menge PGE₂ zu erhalten, die innerhalb des Messbereichs des EIA lag. Für den Screening-Assay mit EIA-Detektion sollte damit ein Zehntel der zuerst gebrauchten

Enzymmenge ausreichen. Das starke Herabsetzen der Enzymmenge wurde erst nach Optimierung des Versuchsablaufs durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.1).

2.6. Detektion mit EIA

Enzym-Immuno-Assays (EIA) sind Methoden um kleinste Mengen bestimmter Substanzen in einem Gemisch mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion zu bestimmen. Ein vorgefertigter Testkit für PGE₂ auf Basis eines EIA wird von der Fa. Cayman-Chemicals angeboten. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Enzym-Immuno-Assay mit kinetischer Auswertung (Abbildung C.1).

Der Testkit ist sehr spezifisch für PGE₂. In deutlich geringerem Maß wird PGE₃ und PGE₁ detektiert (siehe Tabelle C.1). Dadurch ließ sich ausschließen, dass PGHS-Metabolite, die über einen anderen Reaktionsweg gebildet wurden, ebenfalls gemessen wurden. Auch war damit eine Aufarbeitung und Reinigung der Proben unnötig. Der Kit reagierte mit keinem anderen Inhaltsstoff aus dem Assay. Das wässrige Milieu des Assays beeinflusste nicht die Antigen-Antikörper- bzw. die Enzymreaktionen des Kits.

Tabelle C.1: Spezifität der PGE₂-EIA-Kits von Cayman Chemicals und R&D Systems (Angaben lt. Hersteller)

Spezifität [%]	Cayman Chemicals	R&D Systems
PGE ₂	100	100
PGE ₃	43	16,3
PGE ₁	18,7	70
PGF _{1α}	< 0,01	1,4
PGF _{2α}	< 0,01	0,7
6-keto-PGF _{1α}	1	0,6
PGA ₂	-	0,1
13,14-dihydro-15-keto- PGF _{2α}	< 0,01	< 0,1
Thromboxan B ₂	< 0,01	< 0,1
PGB ₂	< 0,01	-
PGD ₂	< 0,01	-

Die Detektionsplatten sind mit unspezifischen IgG-Anti-Mouse-Antikörper vorbeschichtet. Die Platte ist zum Schutz mit blockierenden Proteinen behandelt. Bei der Inkubation wird zur Probe ein spezifischer Antikörper für PGE₂ und Acetylcholinesterase (AChE)-PGE₂-Tracer,

ein Komplex aus PGE₂ und dem Detektionsenzym, in definierter Menge zugegeben (PRADELLES et al., 1985). Der spezifische Antikörper lagert sich an den unspezifischen Antikörper der Plattenbeschichtung an. Daran bindet nun entweder PGE₂ aus der Probe oder PGE₂-AChE-Tracer. Die beiden Substanzen konkurrieren um die Bindungsstellen. Nach 18h Inkubationszeit hat sich ein Gleichgewicht eingestellt. Ungebundene Reagenzien werden nun durch mehrmaliges Behandeln mit Waschpuffer (Cayman Chemicals) entfernt. In jede Vertiefung wird nun Ellman's Reagenz gegeben (Abbildung C.2). Die AChE des Tracers spaltet das enthaltene Acetylcholin. Das entstandene Thiocholin lagert sich an 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure). Es entsteht ein gemischtes Disulfid und 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, das im Gelbbereich ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$) mit einem ELISA-Reader, einem Durchlichtphotometer für Mikrotiterplatten, vermessen werden kann.

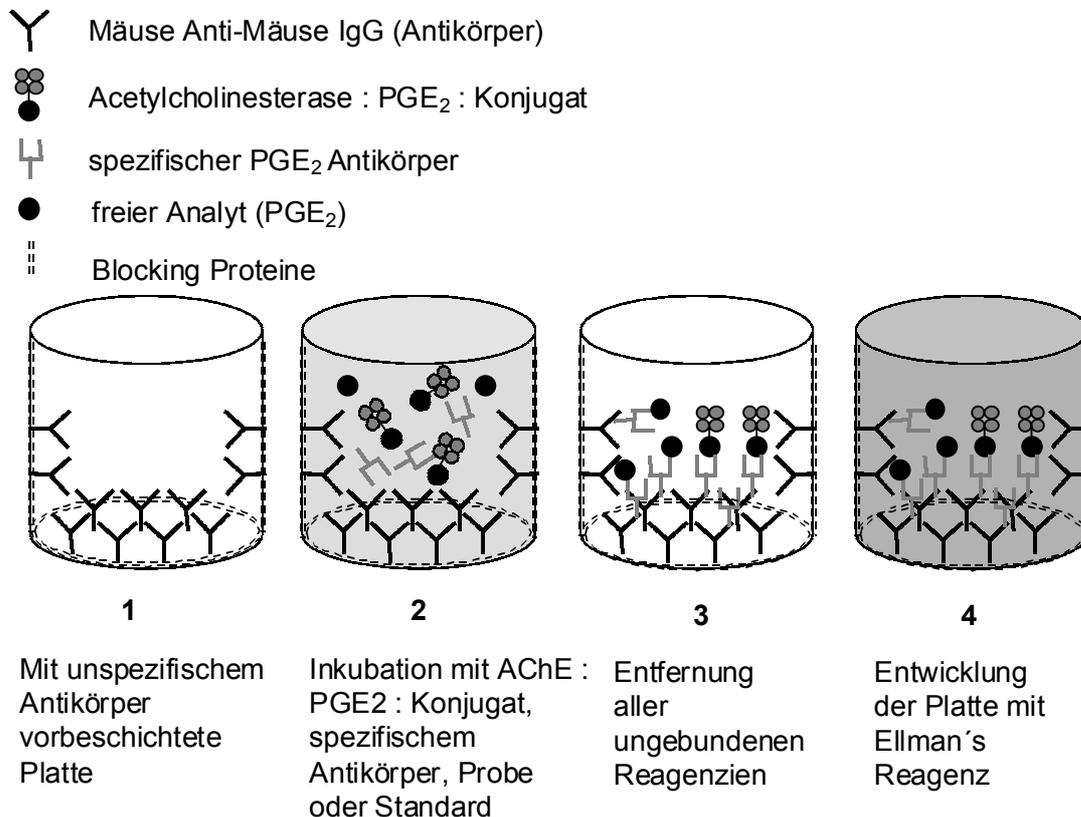


Abbildung C.1: Schematische Darstellung des Ablaufs eines kompetitiven Enzym-Immuno-Assays

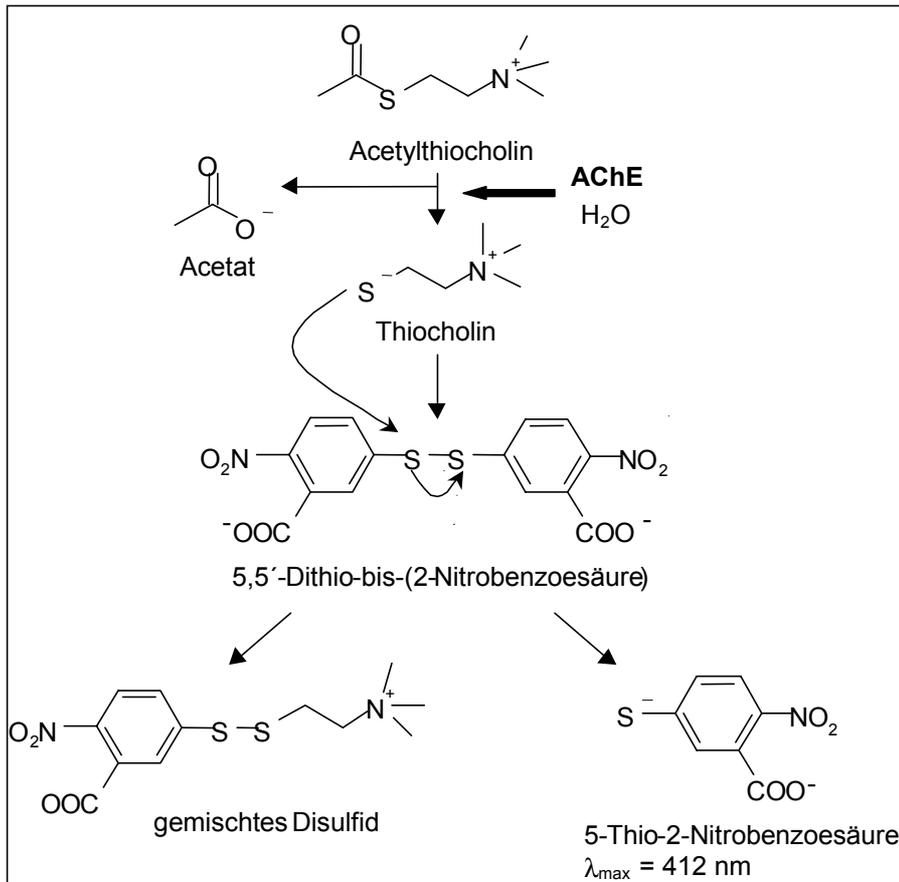


Abbildung C.2: Reaktion der Acetylcholinesterase mit Ellman's Reagenz

Hierbei entspricht eine geringere Gelbfärbung einer höheren PGE_2 -Konzentration. Die Färbung ist also umgekehrt proportional zur PGE_2 Menge.

Die Detektion mit AChE wird als kinetische Messung durchgeführt, d.h. die AChE-Reaktion wird nicht gestoppt, sondern die Auswertung erfolgt nach einer bestimmten Zeit, in der die Reaktionskinetik linear verläuft.

Mit jeder Platte muß aufgrund der Schwankungen innerhalb der Reagenzien und der Beschichtung sowie der unterschiedlich erreichten Umsetzung von Ellman's Reagenz eine neue Standardreihe erstellt werden. Auch müssen Plattenparameter und Reagenziengüte geprüft werden.

Leerwert (BL): die Inkubation erfolgt ohne spezifischen Antikörper, Puffer und Tracer. Ellman's Reagenz wird zugegeben. Damit wird die Durchsichtigkeit der Platte und die nicht-enzymatische Zersetzung von Ellman's Reagenz geprüft. Dieser Wert dient als Abgleich für alle anderen Werte.

Höchstaktivität (TA): hierzu wird Ellman's Reagenz direkt mit Tracer versetzt. AChE spaltet maximal viel Acetylcholin. Dieser Wert prüft die Güte des Tracers.

Unspezifische Bindungen (NSB): zur Inkubation wird kein spezifischer Antikörper zugegeben. Nun sollten weder PGE₂ noch PGE₂-Tracer binden können.

Maximale Bindung (Bo): in diese Wells wird sowohl Puffer, spezifischer Antikörper als auch Tracer gegeben. Da keine Konkurrenz von ungekoppelten PGE₂ vorhanden ist, binden hier maximal viele Tracermoleküle, die dann Ellman's Reagenz umsetzen können. Zur Auswertung der Platte wird dieser Wert als 100% Bindung festgelegt, und alle anderen Werte werden als Relativwert darauf bezogen.

Das Lesen der Platte mit dem ELISA-Reader und die Berechnung der Ergebnisse erfolgt computergestützt, so dass direkt die PGE₂-Konzentrationen abgelesen und zur weiteren Berechnung der Hemmeigenschaften verwendet werden können.

Folgende Rechenschritte werden vom Computer direkt durchgeführt:

1. Leerwertabgleich: Meßwert - BL (Leerwert) = MW_{kor.}
2. Korrektur der maximalen Bindung wg. unspezifischer Bindungen:
Bo - NSB = **Bo**_{kor.}
3. Korrektur aller Meßwerte wg. unspezifischer Bindungen:
(MW_{kor.} - NSB) = **B**
4. **B/Bo**_{kor.} *100 [%] (Grundlage zum Ablesen von der Eichkurve)

Gleichung C.1: Rechenschritte zur Auswertung des EIA (Abkürzungen siehe oben)

Nach dem letzten Rechenschritt wurden die Werte der Standardreihe semilogarithmisch aufgetragen und die Konzentration der einzelnen Meßwerte bestimmt (Abbildung C.3).

Die Proben mußten stark verdünnt werden, damit die Konzentration des im Assay gebildeten PGE₂ innerhalb der Bestimmungsgrenzen des Testkits lag. Nur im Bereich zwischen 20 und 80 % B/Bo wurde Linearität innerhalb der Standardreihe gefunden und nur in diesem Bereich waren die Ergebnisse aussagekräftig und weiter auswertbar.

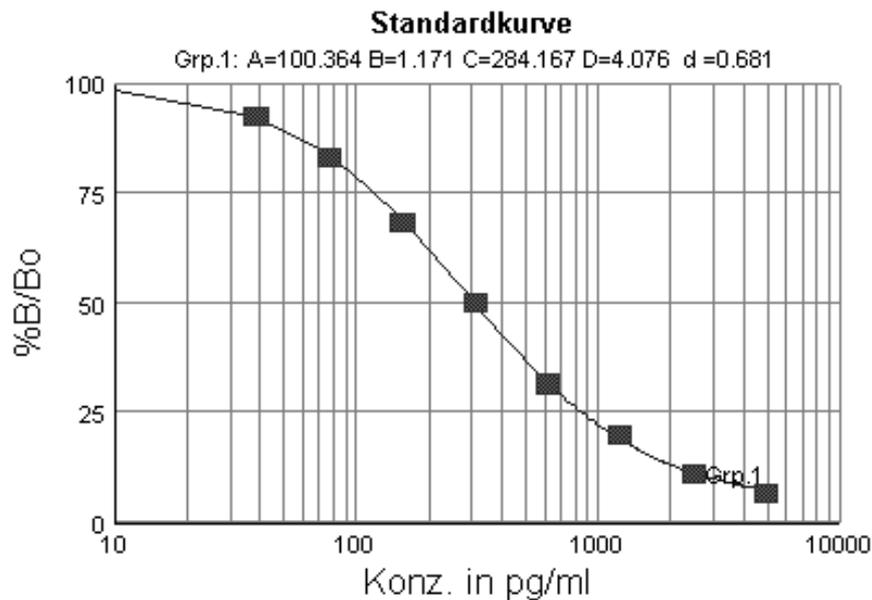


Abbildung C.3: Standardkurve einer EIA-Auswertung (4-Parameter)

Durch das starke Verdünnen entstanden Fehler. Deshalb war es erstrebenswert die PGE₂-Konzentration bei gleichbleibenden Hemmwerten zu reduzieren oder/und eventuell einen weniger sensitiven Kit zu verwenden.

3. Optimierung (Phase 3)

Der Probendurchsatz sollte noch weiter erhöht und die Testzeit nochmals optimiert und verkürzt werden. Wichtig war dafür ein geeignetes Plattendesign und ein einfaches Pipettierschema für den Screening-Assay, sowie die mögliche Verdünnung in Mikrotiterplatten in einem einzigen Schritt zur Detektion mit EIA.

3.1. Optimierung der Enzymmenge

Um die Menge des im Assay gebildeten PGE₂ herabzusetzen und damit Verdünnungsschritte zu sparen, wurde die Menge an umsetzendem Enzym verringert. Theoretisch konnte auf einen Verdünnungsschritt 1:10 verzichtet werden, wenn nur ein Zehntel der Enzymmenge zugegeben wurde. Da aber die Stabilität des Enzyms abnahm, je geringer die Enzymmenge wurde, mußte hier ein Kompromiß gefunden werden. Gleichmäßige, reproduzierbare Werte wurden noch mit Enzymkonzentrationen zwischen **0,2 U** und **0,1 U** erhalten (vgl. Abbildung C.1). Die Verdünnung zur Detektion betrug dann 1 : 100.

3.2. Optimierung des Substrates Arachidonsäure und der Cofaktoren

Obwohl bei den Screening-Assays die Enzymmenge auf 1/10 reduziert wurde, wurde die Substratmenge beibehalten. Ein Überschuß an Arachidonsäure sollte damit auf jeden Fall gewährleistet sein. Die Bildung entsprechend niedrigerer Mengen PGE_2 war problemlos für die Detektion, da mit dem EIA etwa ein tausendstel sensitiver als mit dem Radioaktivitätsdetektor PGE_2 gemessen werden konnte. Auch geringe Unterschiede der PGE_2 -Konzentration waren noch sichtbar zu machen, die bei der HPLC-Analyse im Grundrauschen untergingen. Dadurch konnten noch geringe Hemmwertunterschiede analysiert werden. Es war damit nicht notwendig, neue Testbedingungen vorzuschreiben. Durch den Einsatz verschiedener Mengen Arachidonsäure (Abbildung C.1) konnte bewiesen werden, dass die eingesetzten **5 μM Arachidonsäure** maximale Umsetzung erbrachten. Bei einem Enzymeinsatz von 2,8 U ließ sich die Umsetzung bei weiterer Zugabe von Arachidonsäure steigern. Die maximale Hemmung des Enzyms mit 2,5 μM Indometacin bei eingesetzten 0,5 und 1 μM Arachidonsäure machte deutlich, dass der Hemmeffekt durch den Arachidonsäuremangel verstärkt worden war und die eigentliche Wirkstärke des Inhibitors damit nicht erfaßt wurde. Auch bei 5 μM Arachidonsäure war die Wirkstärke noch vom Substratmangel beeinflusst. Bei 1,4 U Enzym war bei 5 μM bereits ein Plateau bzgl. der Umsetzung und der Wirkstärke erreicht worden. Wurde die Enzymmenge weiter herabgesetzt, gelang damit sicher eine maximale Umsetzung. Mit einer Enzymmenge unter 1 U und einer Arachidonsäurekonzentration von 5 μM war auf jeden Fall gewährleistet, dass das Substrat im Überschuß vorhanden war, und nicht schon durch Substratmangel Hemmeffekte vorgetäuscht wurden.

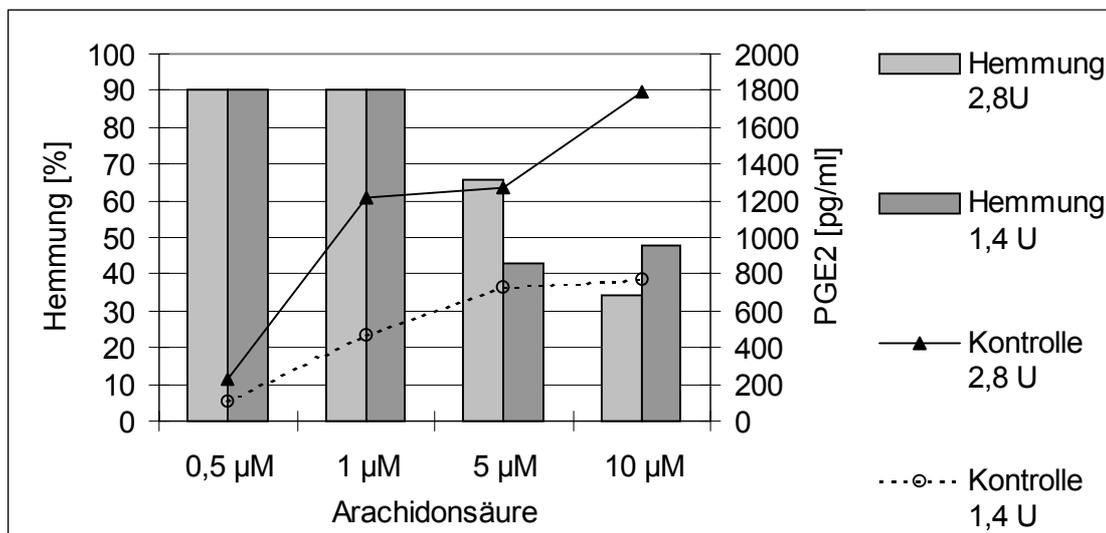


Abbildung C.1: Umsetzung verschiedener Mengen Arachidonsäure zu PGE_2 durch 2,8 und 1,4 U PGHS-1 (Linien) und Messung der Hemmung von 2,5 μM Indometacin bei 2,8 und 1,4 U PGHS-1 (Balken)

Die beiden Isoenzyme unterscheiden sich in ihrer Reaktion mit Arachidonsäure. PGHS-1 zeigt kooperative Antwort auf die Substratkonzentration, während PGHS-2 sättigbare Reaktionskinetik aufweist (CHEN et al., 1999). Das bedeutet, dass PGHS-1 durch die Umsetzung eine Steigerung der Umsetzungsgeschwindigkeit erfährt und dadurch immer mehr und schneller Arachidonsäure umsetzt, je größer das Angebot ist. PGHS-2 steigert die Umsetzung jedoch nur mit zunehmendem Arachidonsäureangebot, jedoch ohne Geschwindigkeitszuwachs. Die Anfangsumsetzung springt allerdings schneller an als bei PGHS-1. Um auszuschließen, dass PGHS-2 relativ bessere Umsetzung zeigte als PGHS-1, war ein Überschuß an Substrat sinnvoll. Berechnungen nach Literaturvergleich für die verwendeten Mengen Enzym bestätigten, dass die eingesetzten **5 µM Arachidonsäure** im Bereich maximaler Umsetzung lagen (CHEN et al., 1999).

3.3. Testdurchführung II

Der Test wurde nun folgendermaßen durchgeführt (molare Angaben beziehen sich auf die Konzentration im Ansatz, die durch die Menge an Lösung (µl) zugegeben wurde):

PGHS-2			PGHS-1		
TRIS/HCl pH 8,0	0,1 mM	110 µl	TRIS/HCl pH 8,0	0,1 mM	130 µl
EDTA	2 mM	20 µl			
Adrenalin HT	18 mM	40 µl	Adrenalin HT	18 mM	40 µl
EtOH/ Probe		10 µl	EtOH/ Probe		10 µl
Enzym auftauen, temperieren (1 min RT, 2 min 37 °C)					
PGHS-2 /Probe	0,15 U	1 µl	PGHS-1 /Probe	0,2 U	1 µl
Hematin	10 µM	10 µl	Hematin	5 µM	10 µl
Vorinkubation 5 min					
Arachidonsäure	5 µM	10 µl	Arachidonsäure	5 µM	10 µl
Inkubation 20 min 37 °C am Schüttelwasserbad					
Ameisensäure	10 %	10 µl	Ameisensäure	10 %	10 µl

Die Proben wurden dann 1 : 100 verdünnt und mit Hilfe des EIA detektiert und ausgewertet.

Unterschiede zwischen den beiden Tests bestanden hauptsächlich in der Menge an Hematin und in den Enzymmengen. Die Hematinmenge von 10 µM hatte sich im Test mit Radioaktivitätsdetektion als günstig für optimale PGHS-2 Umsetzung erwiesen, während für

PGHS-1 sich eine etwas niedrigere Konzentration bewährt hatte. Mit einer neuen Lieferung an PGHS-2 Enzym und damit verbunden einer neuen Verdünnung, konnten sowohl Enzymmenge als auch durch weitere Testung die Hematinmenge vereinheitlicht werden (vgl. Abschnitt 3.4 und 3.5).

3.4. Optimierung der Hematinkonzentration

Es zeigte sich durch weitere Versuche mit einer wie in Abschnitt 2.2.2. beschrieben hergestellten und eingestellten Lösung von Hematin, dass mit $5 \mu\text{M}$ Endkonzentration im Ansatz, die Umsetzung nochmals optimiert werden konnte (Abbildung C.1).

Die unterschiedlichen Mengen Hematin wirkten sich in keiner der eingesetzten Konzentration auf Hemmwirkung von Substanzen aus. Die Hemmung von $2,5 \mu\text{M}$ Indometacin lag beispielsweise mit $5 \mu\text{M}$ Hematin bei 76,1 %, mit $10 \mu\text{M}$ Hematin bei 76,5 %.

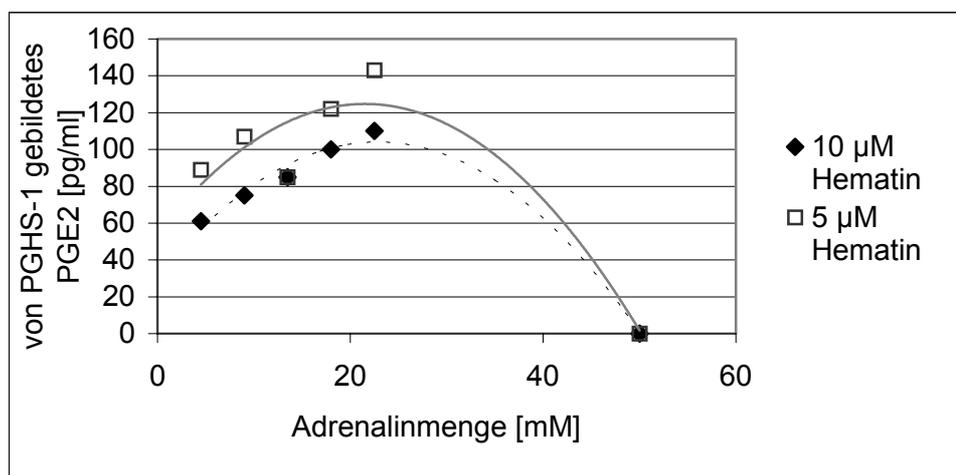


Abbildung C.1: Umsetzung von $5 \mu\text{M}$ Arachidonsäure zu PGE_2 bei verschiedenen Mengen Adrenalin mit $5 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $10 \mu\text{M}$ Hematin

3.5. Optimierung der Detektion

Da im Test bzgl. der Sensitivität des EIA immer noch zu große Mengen PGE_2 gebildet wurden, wurde als Alternative ein PGE_2 -Kit der Fa. R&D Systems verwendet. Der Detektionsbereich lag bei diesem Kit nicht mehr zwischen 1000 und $7,5 \text{ pg/ml}$, sondern zwischen 5000 und 39 pg/ml . Damit war der Kit von R&D Systems mindestens fünfmal weniger sensitiv. Die Verdünnung konnte daher nochmals auf 1:15 reduziert werden, damit die Werte im validen Bereich zwischen 80 und 20 % B/Bo lagen.

Dieser zweite Kit arbeitet ebenfalls als kompetitiver Enzym-Immuno-Assay, jedoch ist nicht Acetylcholinesterase als Detektionsenzym an PGE_2 gekoppelt, sondern alkalische Phosphatase. Zur Detektion wird *p*-Nitrophenylphosphat zugegeben. Nun spaltet die

alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe ab. Es entsteht gelb gefärbtes *p*-Nitrophenol. Die Reaktion wird nicht mehr kinetisch gemessen, sondern ist eine Endpunktbestimmung. Die Reaktion der alkalischen Phosphatase wird mit Natronlauge gestoppt, die zusätzlich auch eine Farbvertiefung des *p*-Nitrophenols erzeugt.

Alkalische Phosphatase ist weniger temperaturempfindlich. Der Kit muß nicht bei -20°C wie der Cayman Kit gelagert werden, sondern bei 4°C . Auch ist die Inkubationszeit dieses Kits nicht mehr 18 Stunden, sondern es kann die Platte bereits nach zwei Stunden gewaschen und detektiert werden. Die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse verringert sich dadurch von 21 auf 4 h. Damit wurde eine deutliche Verkürzung der Testzeit im Vergleich zum COX-1 Assay mit HPLC-/Radioaktivitätsmonitor erreicht.

Von der Fa. Cayman Chemicals wird inzwischen ebenfalls ein weniger empfindlicher Test (4000 bis 31 pg/ml) angeboten (STAT-Prostaglandin E_2 Enzyme-Immuno-Assay-Kit, Bstnr. 514131), der als Detektionsenzym ebenfalls alkalische Phosphatase verwendet. Die vorgeschriebene Inkubationszeit zur Auswertung beträgt nur noch 1h. Bei der Entwicklung wird die Platte nach 60-90 min vermessen und eine kinetische Auswertung durchgeführt. Der STAT-Kit war allerdings nicht so bequem zu handhaben wie der R&D-Kit: die Puffer und Reagenzien werden in Pulverform geliefert und müssen zum Test jeweils frisch zubereitet werden. Leider wurden auch die geforderten Absorptionen für Bo von 0,3-0,5 A.U. nur schwer erreicht. Die Farbintensität lag nach vorgeschriebener Inkubationszeit unterhalb dieses Bereichs.

Die Auswertung der Proben sollte immer als Doppelbestimmung im Test stattfinden. Da jedoch die Schwankungen zwischen den einzelnen Assays größer waren, als die Schwankungen, welche die vorbeschichtete Platte zeigte, wurde auf Mehrfachbestimmung bei der Detektion verzichtet, jedoch jede Probe in mindestens drei verschiedenen Tests eingesetzt bevor der Mittelwert errechnet wurde.

3.6. Durchführung des PGHS-1/-2 Screening-Assays, Plattendesign

Die erste Optimierungsphase hatte zur Detektion mit EIA geführt, jedoch war wegen des komplizierten Pipettierschemas immer noch der Probendurchsatz sehr beschränkt. In der zweiten Phase wurde deshalb eine Vereinheitlichung der beiden Assays angestrebt. Dies ermöglichte bei günstigem Plattendesign, beide Tests ohne Pipettenwechsel durchzupipettieren und damit Substanzen parallel auf ihren Einfluß auf PGHS-1 und PGHS-2 zu prüfen. Die Ergebnisse waren dann auch bequem vergleichbar.

Folgendes Pipettierschema konnte diesen Forderungen gerecht werden:

		PGHS-1	PGHS-2
TRIS/HCl pH 8,0	0,1 mM	20 µl	10 µl
Na EDTA	50 µM		10 µl
Adrenalinhydrogentartrat	18 mM	50 µl	50 µl
EtOH / Substanz		10 µl	10 µl
Enzym auftauen, temperieren, zentrifugieren, verdünnen in 100 µl Assaypuffer je Probe; 3 min; RT			
PGHS-1/-2 in Puffer	0,2 U	100 µl	100 µl
Hematin	5 µM	10 µl	10 µl
Vorinkubation 5 min , RT			
Arachidonsäure	5 µM	10 µl	10 µl
Inkubation 20 min , 37 °C am Schüttelwasserbad			
Ameisensäure	10 %	10 µl	10 µl

Die Hematinmenge von 5 µM war für beide Enzyme ausreichend (vgl. Abbildung C.1). Adrenalinhydrogentartrat wurde so in Assaypuffer gelöst, dass eine größere Pipettenspitze für die verwendete Multipette genommen werden konnte und damit die Pipette nicht mehr nach jeder Reihe nachgefüllt werden mußte. Der etwas größere Spielraum bei der Detektion von PGE₂ mit dem Kit von R&D Systems ließ zu, dass trotz etwas besserer Umsetzung von PGHS-2 die gleiche Unitanzahl für PGHS-1 und PGHS-2 pro Probe zugefügt werden konnte.

NaEDTA hatte zwar keinen Einfluß auf die Umsetzung der Enzyme gezeigt (vgl. Abschnitt 2.2.5), wurde jedoch als Schutz für PGHS-2 zugegeben. Da R&D-Systems im EIA Wechselwirkungen mit großen Mengen EDTA angaben, wurde die Menge des Schutzstoffes auf die höchste im Kit zugelassene Konzentration von 50 µM herabgesetzt.

Für beide Enzyme konnten die selben Lösungen der Cofaktoren verwendet werden. Die Einteilung der Mikrotiterplatte sollte ein möglichst bequemes Pipettieren gewährleisten. Nur die Assaypuffervorlage, EDTA und die verdünnten Enzyme mußten in Querrichtung pipettiert werden, die übrigen Reagenzien konnten jedoch beliebig in alle Wells zugegeben werden.

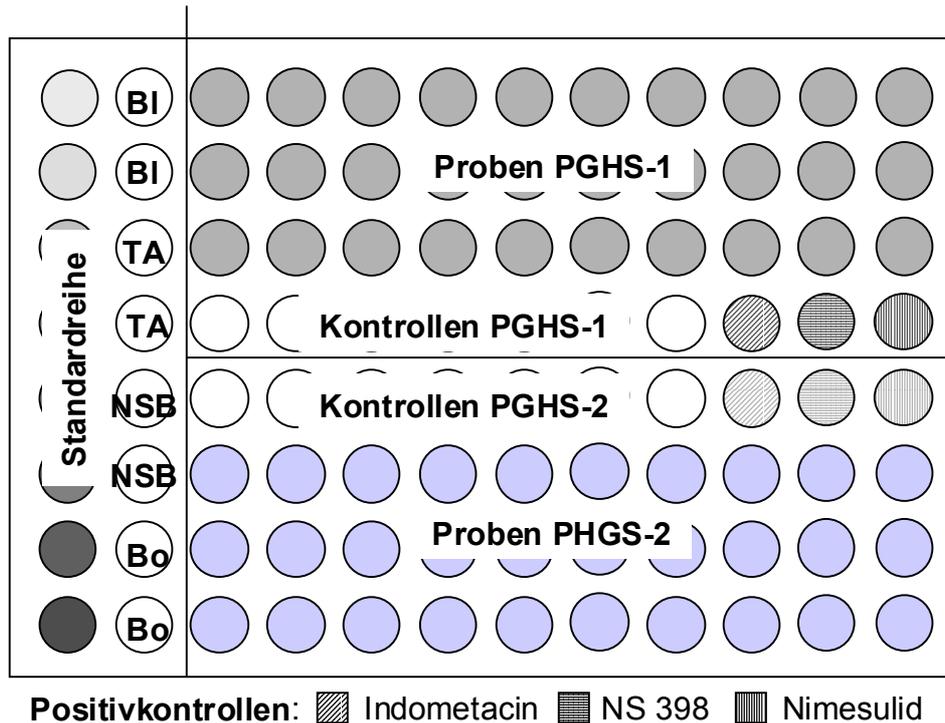


Abbildung C.1: Plattenaufteilung für den PGHS-1/-2 Screening-Assay

Dieses Pipettierschema ließ nun bequem einen hohen Durchsatz von 30 Proben je Platte zu. Zügiges und genaues Arbeiten zahlten sich durch gleichbleibende Kontrollwerte und reproduzierbare Ergebnisse aus.

3.7. Hemmstärke der Positivkontrollen in den Screening-Assays

Bei der Reduzierung der Enzymmenge für die Detektion mit EIA wurde das Verhalten der IC_{50} -Werte von Indometacin im PGHS-1 Test beobachtet. Wenn das Substrat im Überschuß vorlag, konnte kein linearer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen und der Enzymmenge gefunden werden (Abbildung C.1). Die Varianz der IC_{50} -Werte lag bei 11,2 %, also $2,57 \pm 0,29 \mu\text{M}$ und damit innerhalb der Schwankungsbreite des Testes.

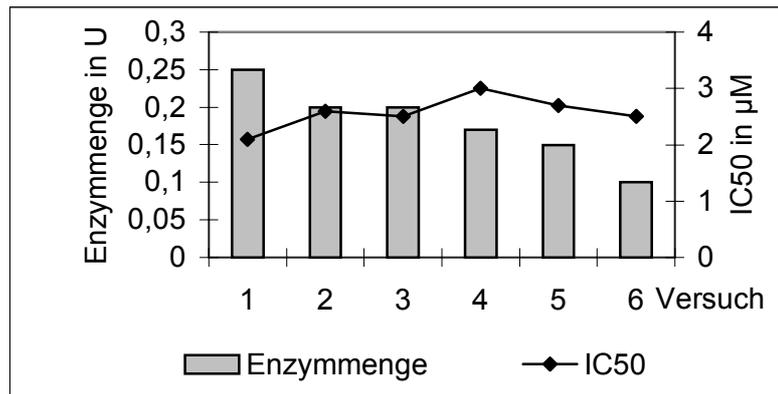


Abbildung C.1: Schwankung der IC_{50} -Werte von Indometacin bei unterschiedlichen Mengen Enzym in verschiedenen Tests (Testbedingungen nach 2.2.7)

Die Hemmwerte der selektiven PGHS-2 Hemmstoffe Nimesulid und NS-398 waren anfänglich sehr inkonstant. Erst die Optimierung des Testes mit EIA-Detektion brachte gleichbleibende, reproduzierbare Ergebnisse.

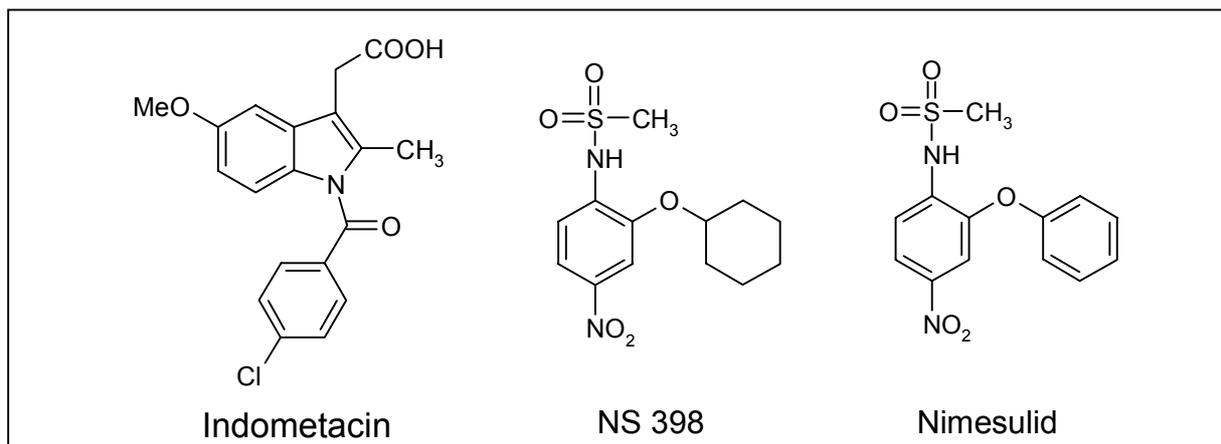


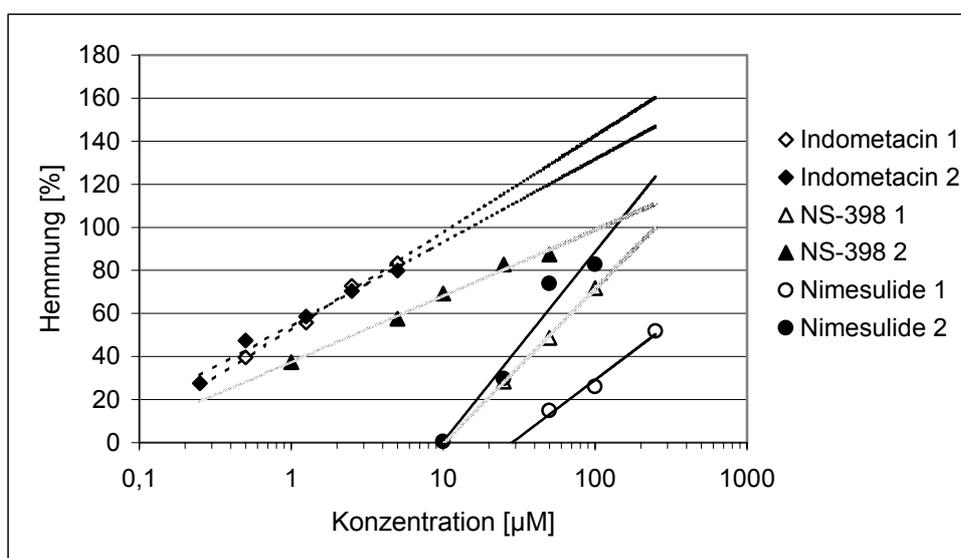
Abbildung C.2: Strukturformeln der verwendeten Positivkontrollen in den PGHS-1 und -2 Screeningtestsystemen

Die IC_{50} -Werte aller Positivkontrollen wurden im optimierten Test gemessen und berechnet.

Die IC_{50} -Werte für Indometacin lagen bei ca. $1 \mu M$ für PGHS-1 und PGHS-2. NS-398 zeigte ca. 20-fach bessere Hemmung der PGHS-2 gegenüber PGHS-1 ($IC_{50 \text{ PGHS-2}} = 2,6 \mu M$; $IC_{50 \text{ PGHS-1}} = 51 \mu M$). Nimesulid hatte deutlich höhere Absolutwerte: $IC_{50 \text{ PGHS-2}} = 36 \mu M$ und $IC_{50 \text{ PGHS-1}} = 246 \mu M$. Die Ratio (PGHS-1 / PGHS-2) betrug damit 6,8 (Tabelle C.1 und Abbildung C.3).

Tabelle C.1: IC_{50} -Werte synthetischer PGHS-Inhibitoren als Positivkontrollen des Screening-Assays

Hemmstoff	Hemmung in [μ M]		Ratio PGHS-1/PGHS-2
	PGHS-1	PGHS-2	
Indometacin	0,9	0,8	1,1
NS-398	50,7	2,6	19,5
Nimesulid	246,3	36,4	6,8

Abbildung C.3: Graphische Darstellung der Bestimmung der IC_{50} -Werte der Positivkontrollen

Der selektive PGHS-2 Hemmstoff Rofecoxib aus Vioxx[®] mit Dichlormethan ausgeschüttelt, zeigte für PGHS-1 keine Hemmung bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze der zugegebenen Lösung (1,6 mM), im PGHS-2 Test konnte ein IC_{50} -Wert von 44 nM gemessen werden. Damit ergibt sich für Rofecoxib aus Vioxx[®] ein Hemmwertverhältnis von > 36000 (PGHS-1 /PGHS-2).

4. Zusammenfassung und Diskussion

Die PGHS-1 und PGHS-2 Screening-Assays wurden in Anlehnung an das Design des bestehenden COX-1 Assays entwickelt, der mit Mikrosomen aus Schafsamenblasen und unter Verwendung von radioaktiver Arachidonsäure durchgeführt wurde (REDL et al., 1994). Die neuen Screening -Assays sollten den Probendurchsatz steigern, die Auswertungsgeschwindigkeit erhöhen, und die Verwendung von radioaktiver Arachidonsäure mit damit verbundenen Konsequenzen für Sicherheitsvorkehrungen und den Problemen der Entsorgung sollte vermieden werden. Die Assays sollten aber keinen Anspruch erheben, die physiologischen Bedingungen nachzuahmen, um die Ergebnisse sofort auf *in vivo* Versuche übertragen zu können (vgl. PAIRET et al., 1998).

Die entwickelten Assays arbeiteten mit gereinigter PGHS-1 aus Schafsamenblasen und gereinigter PGHS-2 aus Schafcotyledonen. Damit besaßen die Ergebnisse eine hohe Aussagekraft hinsichtlich der Spezifität der Inhibitoren auf eine einzige Isoform der PGHS. Die Hemmung ist in beiden Testsystemen gut vergleichbar, da von gleich hoher Aktivität beider Enzyme ausgegangen wird. Vorteilhaft ist zum Vergleichen außerdem, dass beide Prostaglandin-H-Synthasen von einer Spezies abstammen und diesbezügliche Unterschiede nicht zusätzlich berücksichtigt werden müssen.

Die Enzyme sollten im Assaymedium optimalen Umsatz zeigen, aber die Zusammensetzung des Assaymediums durfte die Hemmung von bekannten Inhibitoren nicht einschränken. Die Cofaktoren und ihre Konzentration im Medium wurden so gewählt, dass als Hauptmetabolit der Umsetzung von Arachidonsäure PGE₂ entstand, da bei der Detektion mit EIA nicht mehr zusätzlich zur Entstehung von PGE₂ die Abnahme der Arachidonsäurekonzentration mitberücksichtigt werden konnte.

Die Lipoxygenaseeigenschaften der PGHS konnten nicht unterdrückt werden (THURESSON et al., 2000). Nach Umstellung der Detektion konnte jedoch auch die Bildung der Lipoxygenaseprodukte nicht mehr beobachtet werden. Andere Metabolite besonders 12-(S)HHT waren durch LC-MS-Analyse erkannt worden, und ihre Bildung durch Änderung des Mediums unterdrückt worden. Damit konnte eine hohe Spezifität der Detektion gewährleistet werden.

NaEDTA wurde als Schutz vor Metalloproteasen dem PGHS-2 Test zugegeben, da bei der PGHS-2 der Reinheitsgrad ($\geq 70\%$) deutlich niedriger war als bei der PGHS-1 ($\geq 95\%$). Alle anderen Cofaktoren wurden so eingestellt, dass sie für beide Enzymsysteme verwendet werden konnten. Hematin durfte erst zum Enzym gegeben werden, wenn dieses durch Adrenalinhydrogentartrat vor Selbstinaktivierung geschützt war. Eine Menge von 5 μM war dann für jedes der beiden Enzymtestsysteme ausreichend.

Arachidonsäure wurde im Überschuß zugegeben, um zu verhindern, dass Hemmung durch Substratmangel gemessen wurde. Es konnte nun mit kalter Arachidonsäure gearbeitet werden, da eine spezifische Detektion mit Hilfe eines PGE₂-EIA möglich war.

Durch das vereinfachte Pipettierschema und die Detektion mit EIA wurde ein hoher Probendurchsatz erreicht. Die zweite Optimierungsphase brachte mit Verringerung der Enzymmenge und Verwendung eines alternativen und weniger sensitiven PGE₂-Assays zur Detektion (R&D-Systems) nochmals kürzere Auswertungszeiten. Durch die computergestützte Auswertung des EIA konnten alle Daten zur weiteren Berechnung direkt in andere Programme kopiert werden. Damit war es möglich, sowohl die Berechnungszeit zu verkürzen als auch jeden Test auf einfachem Wege graphisch anschaulich darzustellen.

Tabelle C.1: Zeitlicher Aufwand zur Durchführung eines pharmakologischen Tests einschließlich der Vorbereitungen (ohne Enzymbearbeitung) bis zum Vorliegen der Ergebnisse

Für 30 Proben	COX-1/ PGHS mit HPLC	PGHS-1/-2 mit EIA (Cayman Chemicals)	PGHS-1/-2 mit EIA (R&D Systems)
Assay-Vorbereitung	20 min	20 min	17 min
Assay	50 min	50 min	45 min
Vorbereitung zur Detektion	Umfüllen in HPLC-Vials 30 min	Verdünnen 1:1000 15 min	Verdünnen 1:15 10 min
EIA-Vorbereitung	-	20 min	15 min
Inkubation	-	1100 min (18h Stehenlassen 4°C)	140 min (120 min Stehenlassen bei RT, Schüttler)
Waschen und Detektion	990 min (HPLC) 30 min (Laborputz)	90 min	60 min
Auswertung	60 min	20 min	20 min
Gesamt:	1180 min (= 19h 40 min)	1315 min (= 21h 55 min davon 18 h Standzeit)	302 min (= 5h 2 min)

Die hohe Spezifität des EIAs ersparte alle chromatographischen Aufarbeitungsschritte, die sonst besonders beim Screening pflanzlicher Extrakte durchgeführt werden müssen (WHITE et al., 1974; NOREEN et al., 1998). Da kein Bestandteil des Assays in der eingesetzten Konzentration den EIA beeinflusste, mußten die Proben nur verdünnt werden.

Das Konzept und das Design der Assays entsprachen den Zielsetzungen, die an High-Throughput-Screening-Testsysteme (HTS-Testsysteme) gestellt werden (BROACH et al., 1996): Der Test war geeignet, eine große Anzahl von Proben zu bearbeiten. Das Pipettierschema war soweit vereinfacht worden, dass für den Einsatz von Robotern keine weitere Testumstellung mehr nötig war. Der Test wurde ohne Ausnahme auf Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei der arbeitsaufwendigste Schritt während des Testes die Probenzugabe war. Die Testergebnisse wurden computerisiert erfasst, weiterbehandelt und verwaltet.

Gegenüber vielen industriell genutzten HTS-Testsystemen besaßen die neuentwickelten Testsysteme jedoch grundlegende Vorteile: unser Test ließ neben einer rein qualitativen Aussage zusätzlich eine klare quantitative Aussage zu. Es war möglich neben der Detektion von „Hits“ auch deren Wirkstärke festzustellen. Durch das spezielle Plattendesign und die Quantifizierung der Hemmstärke konnte in einem Testansatz eindeutig eine mögliche präferentielle oder selektive Wirkung einer Probe festgestellt werden.

Beide Assays waren geeignet, um verschiedene Pflanzenextrakte hinsichtlich ihrer hemmenden Eigenschaften der PGHS Isoenzyme zu untersuchen und bezüglich einer bevorzugten Hemmung eines der Isoenzyme zu charakterisieren.

D Pharmakologisches Screening von Arzneidrogen aus der TCM

1. Auswahl der entzündungshemmend wirkenden Drogen

In einem umfassenden pharmakologischen Screening sollten arzneilich verwendete pflanzliche Drogen aus der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) auf ihre Beeinflussung der beiden Isoformen der Prostaglandin-H-Synthase getestet werden. Sinnvoll erschienen alle Drogen, die in Rezepturen Verwendung finden, welche bei entzündlichen Prozessen, bei rheumatischen Leiden, gegen Fieber und Erkältungen eingesetzt werden.

Der Begriff „Entzündung“ existiert in der TCM nicht. Statt dessen werden entsprechende Symptome beschrieben, die durch Beeinflussung des *Yin* und *Yang*, den zwei chinesischen Universalkräften, hervorgerufen werden. *Yin* und *Yang* sind zwei gegenläufige, aber komplementäre Kräfte, die einzeln nicht existieren können. Sie bezeichnen u.a. die Eigenschaften von Dingen, den Körper zu beeinflussen. Mit ihnen verbunden sind die Begriffe „Kälte“ und „Hitze“. „Hitze“ entzieht dabei dem Körper große Mengen Energie. Übermäßige Hitze muss mit „kühlenden“ Kräutern und Früchten behandelt werden. „Wind“ und „Feuchtigkeit“ beschreiben die negativen äußeren Einflüsse, die dem Körper (rheumatische) Schmerzen und Verdauungsprobleme zufügen. Drogen gegen Hitze, Wind und „*Yin*“-Stauung werden in neueren TCM-Büchern auch als analgetisch, antiinflammatorisch und antipyretisch bezeichnet (HUANG, 1993).

In der TCM werden ca. 5000 Drogen arzneilich verwendet und davon mehr als 1300 bei rheumatischen Erkrankungen (BUT et al., 1980). Deshalb wurde eine Auswahl aus häufig verwendeten, in der TCM-Klinik in Kötzing, der ersten (seit 1990) und einzigen von den öffentlichen Krankenkassen anerkannten deutschen TCM-Klinik (RÖSSLER et al., 1996), mit positiven klinischen Erfahrungen eingesetzten Drogen im PGHS-Screening-Assay untersucht.

1.1. Drogen und ihre Inhaltsstoffe

Bei der Auswahl der Drogen wurde keine Familie oder besondere Inhaltsstoffgruppe bevorzugt. Auch die Art des Pflanzenteils, der zur Arzneizubereitung verwendet wurde, spielte keine Rolle. Ausschlaggebend war die Anwendung der Drogen. Sie sollten als Antiinflammatorika, Analgetika, Antipyretika oder bei Anwendungen verwendet werden, bei denen eine Hemmung der PGHS gewünscht wird. Die folgende Aufstellung (Tabelle D.1)

erfolgte alphabetisch und nach Pflanzenfamilien geordnet. Für einige Drogen sind mehrere Stammpflanzen beschrieben, die in der Aufstellung angegeben sind. Die Zusammenstellung enthält auch eine Übersicht über bereits gefundene Inhaltsstoffgruppen und Inhaltsstoffe.

Tabelle D.1: Auswahl der Drogen für das Pharmakologische Screening und darin bekannte Inhaltsstoffgruppen bzw. Inhaltsstoffe (Literatur: ZHU, 1998, HUANG, 1993, TANG et al., 1992, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997)

Amaranthaceae

<i>Achyranthes bidentata</i>	Radix	Triterpene, Saponine
------------------------------	-------	----------------------

Apiaceae

<i>Angelica dahurica</i>	Radix	Furanocumarine, Cumaringlycoside, Phytosterine, Lactone
<i>Angelica sinensis</i>	Radix	äth. Öl, Brefeldin A, Phthalate, Cumarine, Phytosterole, Vit. A, E, B12
<i>Bupleurum chinensis</i> , <i>B. scorzonerifolium</i>	Radix	Triterpensaponine
<i>Cnidium monnieri</i>	Fructus	äth. Öl, Cumarine, Monoterpene, Hemiterpene, Benzofuranderivate
<i>Notopterygium incisum</i>	Rhizoma seu Radix	äth. Öl, Cumarine, Phenethylferulat, p-Hydroxy-m-methoxybenzoesäure, trans-Ferulasäure, Pregnonon, Polyacetylene
<i>Peucedanum praeruptorium</i> , <i>P. decursivum</i>	Radix	Pyranocumarine, Furanocumarine, Cumaringlycoside, Psoralen, β -Sitosterol

Araceae

<i>Acorus gramineus</i>	Rhizoma	äth. Öl, Asaron
-------------------------	---------	-----------------

Aristolochiaceae

<i>Asarum heterotropoides</i> , <i>A. sieboldii</i>	Herba	äth. Öl, Higenamin, Pelletorin, <i>n</i> -Pentadecan, Phytosterine, Lignane, Polyacetylene, Alkamide
---	-------	--

Asteraceae

<i>Arctium lappa</i>	Fructus	Lignane, Sesquiterpene, Triterpene, Polyene, Polysaccharide, Phytosterole, Fettsäuren
<i>Artemisia annua</i>	Herba	Sesquiterpenlactone, Sesquiterpene, äth. Öl, Flavonoide, Cumarine, Polyacetylene, langkettige Kohlenwasserstoffe, Bisnorcadinan
<i>Atractylodes lancea</i>	Rhizoma	äth. Öl, Polyacetylene (Atractylodin), Chinone, Chromene, Sesquiterpene, Cumarine
<i>Atractylodes macrocephala</i>	Rhizoma	äth. Öl, Polyacetylene, Chinone
<i>Cephalanoplos segetum</i> , <i>C. setasum</i>	Herba	Alkaloide, Cholin, Saponine
<i>Taraxacum mongolicum</i> , <i>T. sinicum</i>	Herba	Sesquiterpensäuren, Triterpene, Phytosterole, Kaffeesäure, Flavoxanthin, Flavonoide
<i>Xanthium sibiricum</i>	Fructus	Sesquiterpene, fettes Öl, Proteine, Alkaloide

Brassicaceae

<i>Isatis indigotica</i>	Folium	Indirubin, Indigo, <i>n</i> -Nonacosan, Indolchinolin-alkaloide
--------------------------	--------	---

Campanulaceae

<i>Platycodon grandiflorum</i>	Radix	Triterpensaponine, Phytosterole, Betulin, Inulin, Polysaccharide
--------------------------------	-------	--

Caprifoliaceae

<i>Lonicera japonica</i> , <i>L. confusa</i> , <i>L. hypoglauca</i> , <i>L. dasycarpa</i>	Flores	äth. Öl, Chlorogensäure, Isochlorogensäuren, Flavonone, Iridoidglycoside, Saponine, Inositol
--	--------	--

Convolvulaceae

<i>Cuscuta chinensis</i>	Semen	Flavonoide, Lignane, Tryptophanalkaloid, Arbutin, Chlorogensäure, Kaffeesäure, <i>p</i> -Cumar-säure, acetylierte Trisaccharide
--------------------------	-------	---

Cyperaceae

<i>Cyperus rotundus</i>	Rhizoma	äth. Öl
-------------------------	---------	---------

Eucommiaceae

<i>Eucommia ulmoides</i>	Cortex	Lignane, Iridoide, E/Z-Guaiacylglycerol, Nonacosan, β -Sitosterol, Betulin, Betulinsäure, Ursolsäure, Vanillinsäure
--------------------------	--------	---

Fabaceae

<i>Erythrina variegata</i> , <i>E. arborescens</i>	Cortex	Indol- und Isochinolinalkaloide, Saponine
<i>Pueraria lobata</i> , <i>P. thomsonii</i>	Radix	Isoflavonoide, aromatische Glycoside, Sapogenine, Cumarine, β -Sitosterol
<i>Sophora flavescens</i>	Radix	Chinolizidinalkaloide, Flavonoide, Saponine

Lamiaceae

<i>Leonurus heterophyllus</i>	Herba	Alkaloide
<i>Perilla frutescens</i>	Fructus	fettes Öl, Fettsäuren
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Radix	Tanshinone, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Triterpene, Protocatechualdehyd, Baicalin, β -Sitosterol
<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	Herba	äth. Öl, Flavone, Benzofurane

Lauraceae

<i>Cinnamomum cassia</i>	Ramulus	äth. Öl, Cumarin, β -Sitosterol, Cholin, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Syringasäure
<i>Lindera aggregata</i>	Radix	äth. Öl mit Sesquiterpenen

Moraceae

<i>Morus alba</i>	Cortex radices	Prenylflavone, Prenylflavanone, Chalcone, Phenylbenzofurane, weitere phenolische Komponenten, β -Tocopherol, Umbelliferon, Scopolin, Ethyl-2,4-dihydroxybenzoesäure, 5,7-Dihydroxychromen, Glycoproteine, Alkaloide
-------------------	----------------	---

Oleaceae

<i>Fraxinus rhynchophylla</i> , <i>F. chinensis</i> , <i>F. stylosa</i>	Cortex	Cumarine
--	--------	----------

Piperaceae

<i>Piper sarmentosum</i>	Herba	Amide, Phenylpropane, Phytosterole, Pipatalin, Heterotropan, Vitamin E
--------------------------	-------	--

Poacea

<i>Lophaterum gracile</i>	Herba	Triterpene, Steroide, Phytosterine
---------------------------	-------	------------------------------------

Primulaceae

<i>Lysimachia christiana</i>	Herba	Flavone, Glycoside, Tannine, äth. Öl, Aminosäuren, Cholin und Lactone
------------------------------	-------	---

Ranunculaceae

<i>Aconitum kusnezoffii</i>	Radix praeparata	Diterpenalkaloide,
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> , <i>C. dahurica</i> , <i>C. foetida</i>	Rhizoma	Triterpene, Triterpenglycoside, Phenolcarbonsäuren, Furochromene, Alkaloid Cimicifugin
<i>Clematis sinensis</i>	Radix	Saponine, Prosapogenine mit Hederagenin und Oleanolsäure, Protoanemonin, Anemonin
<i>Coptis chinensis</i> , <i>C. deltoidea</i> , <i>C. teeta</i>	Rhizoma	Alkaloide (Berberin), Obakunon, Obakulacton, phenolische Bestandteile, Ferulasäure

Rosaceae

<i>Agrimonia pilosa</i>	Herba	Phenole, Flavonoidglycoside, Ellagsäure, Kaffeesäure, Gallsäure
<i>Chaenomeles speciosa</i>	Fructus	Saponine, Flavone, Vit.C, Fumarsäure, Oleanolsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Weinsäure

Rubiaceae

<i>Gardenia jasminoides</i>	Fructus	Iridoidglycoside, Crocetin, Crocin, Kaffeesäurederivate
<i>Morinda officinalis</i>	Radix	Physcion, Rubiadin-1-methylether, Rubiadin, Monotropein, Asperulosidtetraacetat
<i>Rubia cordifolia</i>	Radix	Anthrachinone, Triterpene, Sitosterol, Anphthalen, cyclische Hexapeptide RA-I bis VII

<i>Uncaria rhynchophylla</i> , <i>U. macrophylla</i> , <i>U. hirsuta</i> , <i>U. sinensis</i> , <i>U. sessilifructus</i>	Ramulus cum Uncis	Alkaloide, Cumarine
--	-------------------	---------------------

Rutaceae

<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Cortex radiceis	Alkaloide, Cholin, Cumarine, Saponine, äth. Öl, Phytosterine, Triterpene (Limonin)
<i>Evodia rutaecarpa</i>	Fructus	Alkaloide, Isopentenylflavonglycosid, äth. Öl
<i>Phellodendron chinense</i>	Cortex	Isochinolinalkaloide, Triterpene (Limonin), Phytosterole, Flavone
<i>Zanthoxylum armatum</i>	Pericarpium	Alkaloide, Cumarine, Lignane, Amide, Flavonoide, Triterpene, Phytosterine, Fettsäuren, Aminosäuren, äth. Öl

Saururaceae

<i>Houttuynia cordata</i>	Herba	äth. Öl, Flavonglycoside, β -Sitosterol, Fettsäuren, Pyridinderivate
---------------------------	-------	--

Scrophulariaceae

<i>Rehmannia glutinosa</i>	Radix	Iridoidglycoside, Phenolglycoside, Iridoide, Ionoglycoside, Monoterpenglycoside, β -Sitosterol, Campesterol, Mannitol
<i>Scrophularia ninpoensis</i> , <i>S. buergeriana</i>	Radix	Iridoidglycoside, äth. Öl, Alkaloide, L-Asparamid, Flavonoide, p-Methoxyzimtsäure

Solanaceae

<i>Lycium chinense</i>	Cortex radiceis	Sesquiterpene (Betain), Zimtsäure, Sterole, Ionon, Fettsäuren
------------------------	-----------------	---

Typhaceae

<i>Typha angustifolia</i> , <i>T. orientalis</i>	Pollen	α -Typhasterol, α -Sitosterol, äth. Öl, Flavone, Alkaloide, Oligosaccharide
---	--------	---

Violaceae

<i>Viola yedoensis</i>	Herba	Saponine, Flavonoide, Flavon-C-Glycoside, Gerbstoffe, Schleim, Zucker, Säuren, äth. Öl mit Salicylsäuremethylesterglycosid
------------------------	-------	--

Zingiberaceae

<i>Zingiber officinalis</i>	Rhizoma	äth. Öl, Gingerole
-----------------------------	---------	--------------------

Indigo naturalis

Aus: <i>Baphicacanthus cusia</i>	Acanthaceae	Indigo, Indirubin und je nach Herkunft verschiedene weitere Bestandteile
<i>Polygonum tinctorium</i>	Polygonaceae	
<i>Isatis indigotica</i>	Brassicaceae	

1.2. Anwendungen, bekannte und belegte Wirkungen

Die folgende Auflistung (Tabelle D.1) gibt im groben Überblick die Indikationsgebiete der verschiedenen, oben genannten Drogen an (Tabelle D.1). Die Indikationen in der TCM sind nicht unmittelbar mit denen der westlichen Medizin vergleichbar. Deshalb wurde eine weit gefaßte Übertragung ausgehend von chinesischen Anwendungen vorgenommen, und es wurden nur einige westliche Indikationsfelder ausgewählt, die auch im Rahmen dieser Arbeit von Interesse schienen. An erster Stelle standen dabei die antiinflammatorischen Eigenschaften, welche jede Art von Entzündungen einschlossen, für welche die Drogen eingesetzt werden können. Antirheumatische, antipyretische, antiulzerative bzw. antitumorale und analgetische Wirkungen wurden speziell berücksichtigt. Anwendungen in diesem Bereich sind mit (+) gekennzeichnet. Leere Felder besagen, daß für die Droge auf diesem Gebiet keine Anwendung beschrieben war. Andere Wirkungen wurden dann aufgenommen, wenn sie im Mittelpunkt der Anwendung der Droge standen.

Die angegebenen Wirkungen sind entnommen aus HUANG,1993; TANG et al., 1992; ZHU, 1998, der Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997 sowie CRAKER et al., 1989.

Viele Drogen waren bereits in verschiedenen pharmakologischen Modellen auf ihre Wirksamkeit untersucht worden. Um antiinflammatorische Eigenschaften zu belegen, waren das „Rattenpfotenödem“ oder das „Mäuseohrödem“ die am häufigsten benutzten Modelle. Der methanolische Extrakt der meisten Drogen war bereits im COX-1 Test mit einer Mikrosomenfraktion getestet worden (PRÖBSTLE, 1994). Ein entsprechend positiv gewerteter Test für eine Indikation wurde erfasst und zusätzlich mit (*) gekennzeichnet.

Tabelle D.1: Wirkweisen und Indikationen der Pflanzen des Screenings

Droge	chinesischer Name	Antiinflammatorikum	Antirheumatikum	Antipyretikum	Analgetikum	Antitumorale Wirkung	Sonstige Anwendungen / Wirkungen
Achyranthis bidentatae radix	Niuxi	++			+		muskelrelaxierend
Aconiti kusnezoffii praeparata radix	Zhicaowu	++	+		+		lokalanästhesierend, antiarrhythmisch, sedativ
Acori graminei rhizoma	Shichangpu						bei Bewußtlosigkeit, geistiger Verwirrung, Appetitlosigkeit, Hyperlipidämie, als Spasmolytikum
Agrimoniae herba	Xianhecao					+	antiparasitär, antibakteriell, bei Malaria
Angelicae dahuricae radix	Baizhi	+		+	+	+	als Antihistaminikum
Angelicae sinensis radix	Danggui	++	+		++	+	bei Blutarmut und Menstruationsproblemen
Arctii fructus	Niubangzi	+				+	bei Infektionen der oberen Atemwege
Artemisiae herba	Qinghao	++		++	++		bei Malaria, choleretisch
Asari herba	Xixin	++	+	++	++		gegen Husten, Dyspnoe
Atractylodis (lanceae) rhizoma	Cangzhu	++	+				bei Appetit-, Verdauungs-, Sehstörungen
Atractylodis macrocephalae rhizoma	Baizhu	++					Einfluß auf das Verdauungssystem
Bupleuri radix	Chaihu	++		+	+		bei prämenstruellem Syndrom
Cephaloploris herba	Xiaoji	++					hämostatisch, antibakteriell, kreislaufstimulierend, bei Verdauungsstörungen
Chaenomeles fructus	Mugua	++	+		+		bei Erbrechen, Durchfall
Cimicifugae rhizoma	Shengma	++		++	++	+	bei Masern, Diarrhoe
Cinnamomi ramulus	Guizhi			++	++		Myalgie, Amenorrhoe
Clematidis radix	Weilingxiang	+	+		+		
Cnidii fructus	Shechuangzi	+					bei Impotenz, Frigidität, antitrichomonal, antifungal, antiviral
Coptidis rhizoma	Huanglian	++					antibakteriell, antiviral, antitoxisch, antiprotozoetisch
Cuscutae semen	Tusizi				+		bei Impotenz, Inkontinenz, zur Leber-, Nieren- und Milzfunktionssteigerung
Cyperii rhizoma	Xiangfu	++			+		bei Menstruationsproblemen

D Pharmakologisches Screening von Arzneidrogen aus der TCM

Dictamni radiceis cortex	Baixianpi	+*	+	+			bei Röteln, Krätze, Ekzemen mit Juckreiz
Erythrinae cortex	Haitongpi	+*	+			+*	diuretisch
Eucommiae cortex	Duzhong	+*					zur Nierenregulation, antiabortiv, anticonvulsiv
Evodiae fructus	Wuzhuyu					+*	+ uterotonisch, bei Erbrechen und Diarrhoe
Fraxini cortex	Qinpi	+*				+	antibakteriell, antitussiv, antiasthmatisch, expektorierend
Gardeniae fructus	Zhizi	+		+	+		anticholeretisch, antifungal
Houttuyniae herba	Yuxingcao	+*					immunstärkend, diuretisch, antitussiv, mild sedativ
Indigo naturalis	Qingdai	+			+	+	antibakteriell, antiviral, anticonvulsiv
Isatidis folium	Daqinhye	+*		+		+	antiviral, antibakteriell, antifungal, bei Gelbsucht und Mumps
Leonuri herba	Yimucao	+					zur Uteruskontraktion, diuretisch, bei Menstruationsstörungen
Linderae radix	Wuyao					+	bei Brüchen, Dysmenorrhoe
Lonicerae flos	Jiyinhua	+		+		+	antiviral, bakteriostatisch
Lophateri herba	Danzhuye			+		+	diuretisch, antibakteriell
Lycii radiceis cortex	Digupi				+*		blutdrucksenkend, antidiabetisch
Lysimachiae herba	Jinqiancao	+			+		choleretisch
Mori radiceis cortex	Sangbaipi					+*	antitussiv, antifungal, diuretisch, sedativ, anticonvulsiv, antibakteriell
Morindae officinalis radix	Bajitian		+		+		bei Impotenz, Unfruchtbarkeit, Menstruationsproblemen
Notopterygii rhizoma seu radix	Qianghuo	+*	+	+		+*	
Perillae fructus	Zisuzi	+					antibakteriell, antitussiv
Peucedani radix	Qianhu	+					antitussiv, krampflösend
Phellodendri cortex	Huangbai	+*		+	+		bei Infektionen der Harnwege und Haut
Piperi sarmentosi herba	Jiaju		+	+	+		bei Husten, Erkältungen, antiödematös
Platycodi radix	Jiegeng	+*				+	bei Erkältung
Puerariae radix	Gegen	+*		+*	+		bei Diabetes, Masern, akute Dysenterie
Rehmanniae radix	Duhuang	+*		+			antidiabetisch
Rubiae radix	Qiancao				+	+*	zur Blutbildung
Salviae miltiorrhizae radix	Danshen	+*	+		+		bei Angina pectoris, hepatoprotektiv
Schizonepetae herba	Jingjie	+		+*	+*		
Scrophulariae radix	Xuanshen	+		+			antidiabetisch
Sophorae flavescens radix	Kushen	+*		+		+	antiarrhythmisch, antibakteriell, antiasthmatisch, antitussiv, expektorierend, antineoplastisch, antiödematös
Taraxaci herba	Pugongying	+			+	+	antibakteriell, Choleretikum

Typhae pollen	Puhuang	++			+		bei Blutkrankheiten, Blutungen, antiödematös
Uncariae cum uncis ramulus	Gouteng				+		anticonvulsiv
Violae herba	Zuhuadiding	++					Erysipel
Xanthii fructus	Cangerzi	+	+				antitussiv, hypoglycämisch
Zanthoxyli pericarpium	Huajiao	++	+		+		bei Erbrechen, Diarrhoe, Ekzemen, Milchschorf, Schlangenbissen
Zingiberis rhizoma	Ganjiang	++		++	++		antitussiv, Magen beruhigend, cardiotonisch

1.3. Extraktion und Ausbeuten

Jeweils 5 g pulverisierte Droge wurden in einer Soxhletapparatur nacheinander mit Lösungsmitteln zunehmender Polarität (steigende Dielektrizitätskonstanten) extrahiert. Als Extraktionsmittel dienten *n*-Hexan (Hex), Dichlormethan (DCM) und Methanol (MeOH). In wenigen Fällen wurde anschließend noch mit Wasser extrahiert. Durch dieses Verfahren war es möglich, verschieden polare Inhaltsstofffraktionen zu testen und daraus zu erkennen, welche Polarität die wirksamen Bestandteile besaßen. Im Anhang (Kapitel I) finden sich für alle Extraktionen die eingesetzte Menge sowie die absoluten und prozentualen Ausbeuten. Vielfach waren Inhaltsstoffe sowohl in *n*-Hexan als auch in Dichlormethan löslich. Bei diesen Drogen war die Ausbeute des Dichlormethanextraktes sehr niedrig (z.B. Erythrinae cortex, Scrophulariae radix, Fraxini cortex, Morindae off. radix, Platycodi radix). Drogen, die fettes Öl enthielten, zeigten für den *n*-Hexanextrakt gute Ausbeuten (z.B. Cuscutae semen, Cnidii fructus, Perillae fructus). Mit Methanol ließen sich in den meisten Fällen die größten Mengen extrahieren.

2. Pharmakologisches Screening von sukzessiv gewonnenen Extrakten

2.1. Testvoraussetzungen und eigene Testergebnisse

Alle Extrakte sollten auf ihre hemmenden Eigenschaften auf die Prostaglandin-H-Synthase-Isoenzyme geprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die sukzessiv hergestellten Extrakte eingeeengt und in einer Konzentration von 1 mg/ml in absolutem Ethanol gelöst. Bei einigen Extrakten konnten nicht alle Bestandteile wieder vollständig in Lösung gebracht werden. Diese Extrakte wurden über mehrere Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend die Proben zum Test homogenisiert bzw. die Niederschläge aufgeschüttelt. Zum Testansatz wurden jeweils 10 µl gegeben, was einer Extraktkonzentration von 50 µg/ml im Screeningtest entsprach. Das pharmakologische Screening wurde mit den in Kapitel C entwickelten Screeningassays durchgeführt. Die *n*-Hexanextrakte wurden mit einer Hematinkonzentration

von 10 μM auf ihre PGHS-1/-2 Aktivität geprüft, alle anderen Extrakte mit 5 μM Hematin. Diese Änderung der Hematinkonzentration geschah in Zuge der Optimierung der Screening-Assays. Die *n*-Hexanextrakte wurden mit dem Kit der Fa. Cayman Chemicals ausgewertet, für Dichlormethan- und Methanolextrakte wurde der PGE₂-Detektionskit der Fa. R&D Systems verwendet (näheres zu den Test-Kits siehe Kapitel C und H).

Um ausreichend reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Extrakte mit jedem Enzym in mindestens drei unterschiedlichen Testdurchläufen getestet (Dreifachbestimmung). Die Schwankungen bei Verwendung einer Enzymportion innerhalb eines Assays waren geringer als die Schwankungen zwischen zwei Assays mit unterschiedlichen Enzymportionen. Die Zahl der durchgeführten Tests für einen Extrakt wurde dann erhöhet, wenn aus drei Tests kein Mittelwert gebildet werden konnte, dessen Standardabweichung geringer war als die des bekannten unspezifischen Inhibitors Indometacin (2,5 μM : $68,4 \pm 15,5$ % Hemmung im PGHS-2 Test parallel mit den *n*-Hexanextrakten getestet). Auf weiteren Einsatz im Assay wurde verzichtet, wenn die Wirkungslosigkeit aus den anfänglichen Tests klar ersichtlich wurde.

Zur statistischen Beurteilung des Testes wurde überprüft, ob die Voraussetzungen für einen Signifikanztest erfüllt waren: die Testergebnisse waren zufällig, da mindestens drei unabhängige Test durchgeführt worden waren; der Restfehler unterlag der Normalverteilung (Prüfung anhand der Positivkontrolle 1,25 μM Indometacin über 25 Tests), die Varianzen waren homogen und normalverteilt, Additivität der Restfehler konnte ausgeschlossen werden. Für eine Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte aus den zwei unabhängigen Testsystemen PGHS-1 und PGHS-2 waren somit die Voraussetzungen gegeben (T-Test).

Achyranthis bidentatae radix	58
Aconiti kusnezoffii praeparata radix	57
Acori graminei rhizoma	56
Agrimoniae herba	55
Angelicae dahuricae radix	54
Angelicae sinensis radix	53
Arctii fructus	52
Artemisiae herba	51
Asari herba	50
Atractylodis (lancea) rhizoma	49
Atractylodis macrocephalae rhizoma	48
Bupleuri radix	47
Cephalanoploris herba	46
Chaenomelis fructus	45
Cimicifugae rhizoma	44
Cinnamomi ramulus	43
Clematidis radix	42
Cnidii fructus	41
Coptidis rhizoma	40
Cuscutae semen	39
Cyperii rhizoma	38
Dictamni radices cortex	37
Erythrinae cortex	36
Eucommiae cortex	35
Evodiae fructus	34
Fraxini cortex	33
Gardeniae fructus	32
Houttuyniae herba	31
Indigo naturalis	30
Isatidis folium	29
Leonuri herba	28
Linderae radix	27
Lonicerae flos	26
Lophateri herba	25
Lycii radices cortex	24
Lysimachiae herba	23
Mori radices cortex	22
Morinda officinalis radix	21
Notopterygii rhizoma seu radix	20
Perillae fructus	19
Peucedani radix	18
Phellodendri cortex	17
Piperi sarmentosi fructus	16
Platycodi radix	15
Puerariae radix	14
Rehmanniae radix	13
Rubiae radix	12
Salviae miltiorrhizae radix	11
Schizonepetae herba	10
Scrophulariae radix	9
Sophorae flavescentis radix	8
Taraxaci herba	7
Typhae pollen	6
Uncariae cum uncis ramulus	5
Viola herba	4
Xanthii fructus	3
Zanthoxyli pericarpium	2
Zingiberis rhizoma	1

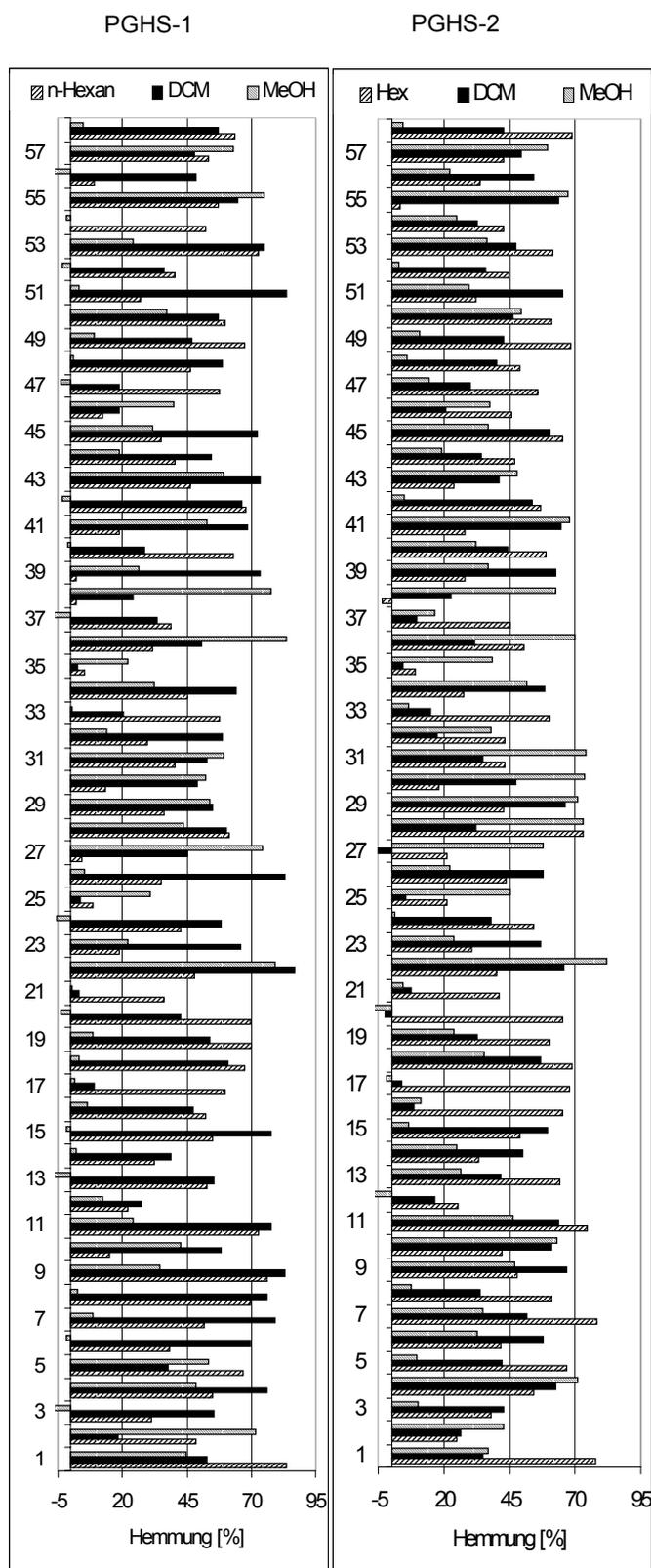


Abbildung D.1: Hemmende Eigenschaften der sukzessiv hergestellten Extrakte auf PGHS-1 und PGHS-2 (Tabelle mit Zahlenwerten und Standardabweichungen siehe Anhang)

Im Vergleich zu den von PRÖBSTLE (1994) durchgeführten Tests konnte keine der Drogen hundertprozentige Hemmung erzielen. Dies war systembedingt, da hundertprozentige Hemmung außerhalb des Detektionsbereiches des EIA-Kits lag. Im Testsystem waren nur Meßwerte quantifizierbar, die eine Extinktion im linearen Bereich der Standardreihe (20-80 % B/Bo) zeigten. Außerhalb dieses Bereichs konnte eine minimale Extinktionsschwankung schon eine sehr große Hemmwertänderung bedeuten. Um Fehlergebnisse zu vermeiden, wurden Messwerte außerhalb des validen Bereiches nicht numerisch für die Berechnung der Mittelwerte berücksichtigt. Die Grenze für maximal gemessene Extinktion, bedeutete maximale Hemmung. Maximale Hemmung wurde gleichgesetzt mit 85 % Hemmung, da sich hier in den meisten Tests die Validitätsgrenze befand. Nicht mehr valide Werte und damit maximale Hemmung wurde von Drogen gezeigt wie *Salviae miltiorrhizae radix*, *Zingiberis rhizoma*, *Taraxaci herba* oder *Angelica sinensis radix* bei der *n*-Hexanextraktion, *Artemisiae herba*, *Violae herba* oder *Mori radice cortex* bei der Dichlormethanextraktion, sowie *Leonuri herba* nach Methanolextraktion. Bei diesen Drogen wurde der Mittelwert aus validen und maximalen Hemmwerten gebildet. In allen anderen Fällen wurden Werte, die außerhalb der validen Detektionsgrenzen lagen, nicht mit in die Mittelwertberechnung einbezogen.

Hemmwerte über 65 % bedeuten bei der eingesetzten Konzentration von 50 µg/ml **gute** inhibitorische Eigenschaften bzgl. der PGHS-Isoenzyme. Mittelmäßige Hemmstoffe zeichneten sich durch Hemmwerte zwischen 30-50 % aus, wenig bzw. unwirksame Extrakte zeigten eine Hemmung der beiden Prostaglandin-H-Synthasen von weniger als 30 %. Die Standardabweichungen wurden in die Zuordnung einbezogen. Lagen Meßwerte innerhalb der nächstweniger wirksamen Gruppe, führte dies zu einer niedrigeren Einstufung der inhibitorischen Eigenschaften des Extraktes.

Bei der Testung der DCM-Extrakte erreichten die Extrakte im PGHS-2 Test eine maximale Hemmung von nur knapp 70 % (nicht wie üblich 85 %!!!, siehe oben). Diese Diskrepanz kam aufgrund einer niedrigen Gesamtumsetzung im Test zustande, wodurch der valide Bereich schneller von wirksamen Extrakten verlassen wurde und oft nicht in die Berechnung von Mittelwerten eingebracht werden konnte. Deshalb wurden bei diesem Test alle Extrakte als gut hemmend bewertet, die mehr als 58 % Hemmung zeigten. Um die Werte mit den Werten aus dem PGHS-1 Test der DCM-Extrakte vergleichen zu können, wird deshalb vorgeschlagen, rechnerisch die Hemmwerte der Maximalhemmung anzugleichen.

Einige Extrakte zeigten „negative“ Hemmungen. Dies bedeutete, daß die Umsetzung der PGHS nicht gehemmt wurde, sondern eine Stimulierung möglich war. Allerdings waren die Standardabweichungen in diesen Fällen meist so groß, daß ein negatives Ergebnis im Rahmen der Schwankungsbreite des Testsystems lag und daher vermutlich **keine** Beeinflussung der PGHS-Isoenzyme stattfand. Nur bei einigen Methanolextrakten wurden reproduzierbare Stimulierungen beobachtet. Die Methanolextrakte von *Acori graminei rhizoma*, *Notopterygii*

rhizoma seu radix, Rehmanniae radix, Rubiae radix, Xanthii fructus müssen deshalb als stimulierende Ausnahmen gelten.

Bei näherer Betrachtung der Testergebnisse wurde deutlich, daß Inhaltsstofffraktionen sehr unterschiedlicher Polarität für die Wirksamkeit im PGHS-Test entscheidend waren. So zeigten einige Pflanzen nur im lipophilen Bereich hemmende Eigenschaften (z.B. Phellodendri cortex), während bei anderen Pflanzen nur die Methanol-Extrakte inhibitorisch aktiv waren (z.B. Indigo naturalis). Ausgewählte Beispiele zeigt Abbildung D.2.

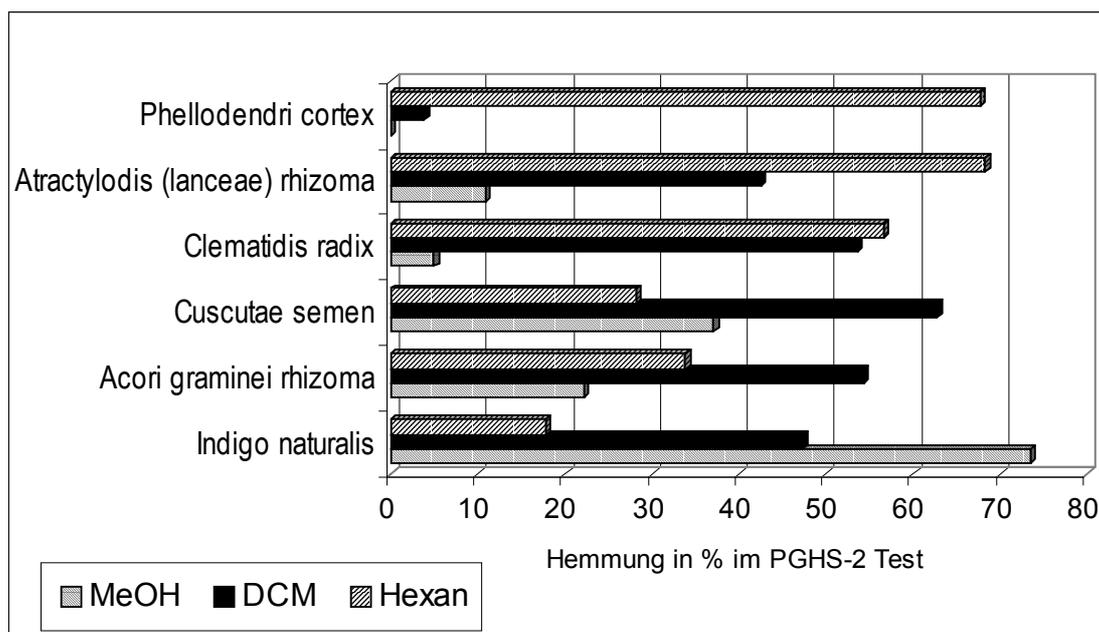


Abbildung D.2: Abhängigkeit der inhibitorischen Eigenschaften vom Extraktionsmittel

Bis auf wenige Ausnahmen konnten für alle Pflanzen in diesen Testsystemen inhibitorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Von einigen Pflanzen existieren bereits Untersuchungen zu ihren Inhaltsstoffen und deren möglicher Beteiligung an einer Hemmwirkung gegenüber den PGHS-Isoenzymen. Für phenolische Komponenten wie Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, Cumarine, Chinone sowie Arachidonsäureanaloga wie Alkamide, Retinoide, Arylheptanoide u.a. ist bereits eine PGHS-Hemmung beschrieben worden (WAGNER, 1989). Für Asari herba dürfte Eugenol die Wirksamkeit mitbestimmen (WIERER, 1988), für Fraxini cortex und Artemisiae annuae herba Esculetin (SEKIYA et al., 1982). Für Ingwerwurzel konnten Gingerole und Gingerdione als PGHS-Inhibitoren identifiziert werden (KIUCHI et al., 1982). Berberin konnte als antiinflammatorisches Prinzip in Coptidis rhizoma und Phellodendri cortex aufgeklärt werden (OTSUKA et al. 1981). Aus Mori cortex konnten seltene Inhaltsstoffe wie Mulberrofurane, Sanggenone und Kuwanone isoliert werden und ihre Wirkung auf die PGHS gezeigt werden (TANG et al., 1992). Stark hemmende Inhaltsstoffe waren z.B. Phenethyl-, Bornylferulat und Phenethylcaffeat aus Angelicae sinensis radix und anderen Angelicaarten

(ZSCHOCKE, 1998; LIU et al., 1998), (3Z,5E,11E)-Tridecatrien-7,9-diin-(1E)-ferulat, Atractylochinon, Atractylochromen und Atractylohydrochinon aus *Atractylodis (lanceae) radix* (RESCH, 1998), Guineensin, Retrofractamid A und B bei *Piperi sarmentosi herbae* (STOEHR, 1999), das Indolisochinolinalkaloid Tryptanthrin aus *Isatis tinctoria* (DANZ et al., 2000).

Von den meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Drogen wurden zwar schon Studien zu ihrer Inhaltsstoffführung durchgeführt, jedoch konnte der für die positive Gesamtwirkung des Extraktes verantwortliche Bestandteil nicht gefunden werden.

2.2. Gerichtete PGHS-1 oder -2 Wirkung

Im Mittelpunkt des Screenings stand der Vergleich der Wirkungen auf die beiden Isoenzyme. Da zu jedem Extrakt jedoch nur eine Konzentration getestet wurde, war die Berechnung der Hemmwertverhältnisse oder Englisch „Ratio“ ($IC_{50 \text{ PGHS-1}}/IC_{50 \text{ PGHS-2}}$) nicht sinnvoll. Es wurde statt dessen die Differenz zwischen der Hemmwirkung im PGHS-2 Assay und im PGHS-1 Assay gebildet. Bessere PGHS-2 Hemmwirkung drückte sich somit in positiven Ergebnissen aus. Tabelle D.1 gibt die Ergebnisse wieder. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für den DCM-Extrakt im PGHS-2 Test die Werte an die in allen anderen Tests übliche maximale Hemmwirkung von 85 % angeglichen (vgl. oben).

Tabelle D.1: Differenzen aus den Testergebnissen der PGHS-2 und PGHS-1 Tests (PGHS-2 – PGHS-1) nach Extraktionsmittel geordnet

Droge	Differenz PGHS-2 – PGHS-1 für die Extraktion mit		
	n-Hexan	DCM	MeOH
<i>Achyranthis bidentatae radix</i>	5,1	-6	-0,2
<i>Aconiti kusnezoffii praeparata radix</i>	-11	10,9	-3,9
<i>Acori graminei rhizoma</i>	25,1	16,9	38,7
<i>Agrimoniae herba</i>	-53,8	11,7	-7,7
<i>Angelicae dahuricae radix</i>	-10,1	39,4	26,8
<i>Angelicae sinensis radix</i>	-11,5	-18,2	12,4
<i>Arctii fructus</i>	4,4	7	6,1
<i>Artemisiae herba</i>	5,5	-5,3	26,7
<i>Asari herba</i>	1,3	-1,6	12,2
<i>Atractylodis (lanceae) rhizoma</i>	0,9	4,2	2
<i>Atractylodis macrocephalae rhizoma</i>	2,8	-10,8	5,2
<i>Bupleuri radix</i>	-1,8	17,5	18
<i>Cephalanoploris herba</i>	33,6	5,7	-2,8
<i>Chaenomeles fructus</i>	30	0,6	5
<i>Cimicifugae rhizoma</i>	6,7	-12,9	0,3
<i>Cinnamomi ramulus</i>	-23	-24,3	-11,2

D Pharmakologisches Screening von Arzneidroge n aus der TCM

Droge	n-Hexan	DCM	MeOH
Clematidis radix	-11,5	-2	8,5
Cnidii fructus	8,9	9,2	15,1
Coptidis rhizoma	-4,4	24,8	33,3
Cuscutae semen	26,3	2,1	11
Cyperii rhizoma	-5,1	3	-15,4
Dictamni radice s cortex	6,2	-21,9	34
Erythrinae cortex	18,5	-12,8	-14
Eucommiae cortex	3,9	2,7	16,3
Evodiae fructus	-17,7	5,4	19,4
Fraxini cortex	2,6	-2,7	6
Gardeniae fructus	13,8	-37,8	24
Houttuyniae herba	2,8	-11,2	15
Indigo naturalis	4,3	7,8	21,4
Isatidis folium	6,6	24,8	16,9
Leonuri herba	11,2	-21,9	29,3
Linderae radix	16,6	-51,2	-17
Lonicerae flos	8,6	-13,8	16,7
Lophateri herba	12,9	2,9	14,6
Lycii radice s cortex	11,7	-12,8	6,9
Lysimachiae herba	11,8	2,5	1,8
Mori radice s cortex	-8	-7,9	2,5
Morindae officinalis radix	4,6	5,7	4,1
Notopterygii rhizoma seu radix	-4,7	-45,6	-6,9
Perillae fructus	-9,6	-25,5	15,3
Peucedani radix	1	7,1	32,5
Phellodendri cortex	8,2	-4,6	-3,4
Piperi sarmentosi herba	12,6	-36,9	5,1
Platycodi radix	-6,4	-6,5	8,5
Puerariae radix	0,6	21	23,1
Rehmanniae radix	11,1	-5,6	42,7
Rubiae radix	3,6	-7,6	-22,8
Salviae miltiiorrhizae radix	2	-1,4	22,3
Schizonepetae herba	27,5	15,4	20,6
Scrophulariae radix	-28,3	-2,8	12,3
Sophorae flavescentis radix	-8,2	-35,9	4,9
Taraxaci herba	26,9	-17,6	26,3
Typhae pollen	3,4	0	34,3
Uncariae cum uncis ramulus	-0,4	12,7	-44,1
Violae herba	-0,6	-1,1	22,2
Xanthii fructus	6,5	-4,7	24,2
Zanthoxyli pericarpium	-23,6	13,5	-29,5
Zingiberis rhizoma	-5,9	-10,9	-7,8

Eine bessere Wirkung auf das induzierbare Isoenzym konnte nur bei Extrakten bestätigt werden, deren Ergebnisse im PGHS-2 Test signifikant höher lagen als im PGHS-1 Test. Die Ergebnisse wurden deshalb auf Gleichheit der Mittelwerte geprüft (T-Test). Aus Tabelle D.1 wurden für jedes Extraktionsmittel die besten bevorzugt PGHS-2 hemmenden Drogen zusammengestellt und in Tabelle D.2 sortiert nach Extraktionsmittel und der Höhe ihrer Präferenz aufgelistet.

Tabelle D.2: Signifikant bevorzugt PGHS-2 hemmende Extrakte

n-Hexanextrakt	Dichlormethanextrakt	Methanolextrakt
Cephalanoploris herba	Angelicae dahuricae radix	Typhae pollen
Chaenomelis fructus	Coptidis rhizoma	Coptidis rhizoma
Schizonepetae herba	Bupleuri radix	Leonuri herba
Taraxaci herba		Angelicae dahuricae radix
Cuscutae semen		Artemisiae herba
Acori graminei rhizoma		Rehmanniae radix
Erythrinae cortex		Taraxaci herba
Gardeniae fructus		Gardeniae fructus
		Salviae miltiorrhizae radix
		Violae herba
		Acori graminei rhizoma
		Indigo naturalis
		Schizonepetae herba
		Bupleuri radix
		Lonicerae flos
		Cnidii fructus
		Lophateri herba

Die berechneten Differenzen der bevorzugten PGHS-2 Hemmung waren teilweise sehr gering, so daß diese Ergebnisse nur Tendenzen angeben konnten. Auch müssen die stärkeren PGHS-2-Wirkungen der Methanolextrakte von Rehmanniae radix und Acori graminei radix gesondert betrachtet werden, da ihre PGHS-1 Wirkung stimulierend war und nicht hemmend. Weitere Tests, Bestimmungen von IC₅₀-Werten und Testung einzelner Inhaltsstoffe waren notwendig, um eine eindeutige PGHS-2 Präferenz sicherzustellen.

2.3. Auswahl der Drogen für die direkte Extraktion mit Dichlormethan

Für umfangreichere Untersuchungen wurde Dichlormethan als Extraktionsmittel gewählt. Der n-Hexanextrakt vieler Drogen war nicht vollständig in Ethanol löslich, das als Solvens für die Proben des PGHS-Screening-Assays diente. So waren im Test große Schwankungen der Zusammensetzung der Probe möglich. Für hydrophile Bestandteile konnte gezeigt werden, daß sie im Test unwirksam waren, was auch nicht weiter verwunderte, da bei der PGHS eine

hydrophober Kanal zum aktiven Zentrum führt, in den hydrophile Substanzen nicht eindringen können (KURUMBAIL et al., 1996).

Zur Auswahl der Drogen wurden aus den Tabellen D.3-4 die am stärksten und besser auf die PGHS-2 wirkenden Drogen der *n*-Hexan- und DCM-Extraktionen entsprechend ihres Potentials bewertet. Drogen, die schon im Arbeitskreis untersucht worden waren, wurden für weitere Untersuchungen ausgeschlossen (*Piper sarmentosum*, *Atractylodes*-Arten, *Angelica*-Arten, *Zanthoxylum*-Arten, *Houttuynia cordata*, *Perilla frutescens*). Es wurden zwölf Drogen für die Extraktion mit Dichlormethan ausgewählt (Tabelle D.2), bei denen gute Wirksamkeit im Test gegeben war, die Präferenz gesichert war, deren Extrakt ausreichend Löslichkeit bewiesen hatte und bei denen phytochemisch interessante Inhaltsstoffe zu erwarten waren. Die pharmakologischen Eigenschaften der ausgewählten Drogen sind in Abschnitt 1.2 beschrieben. Weitere Untersuchungen finden sich in Kapitel E und Kapitel F.

3. Screening-Untersuchungen von Dichlormethanextrakten

Von den zwölf ausgewählten Drogen wurden jeweils ca. 5 g pulverisiert und unmittelbar mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden zur Trockne eingeengt und in Ethanol p.A. wieder gelöst. Die Ausbeuten sind in Tabelle D.1 angegeben.

Tabelle D.1: Ausbeuten der direkten Dichlormethanextraktion ausgewählter chinesischer Arzneidrogen

Droge	Ausbeute in [%]
Achyranthis bidentatae radix	4,38
Acori graminei rhizoma	1,83
Bupleuri radix	4,0
Cephalanoploris herba	4,40
Chaenomelis fructus	1,39
Clematidis radix	1,22
Erythrinae cortex	0,29
Platycodi radix	0,82
Schizonepetae herba	2,59
Scrophulariae radix	0,67
Taraxaci herba	5,16
Uncariae cum uncis ramulus	2,4

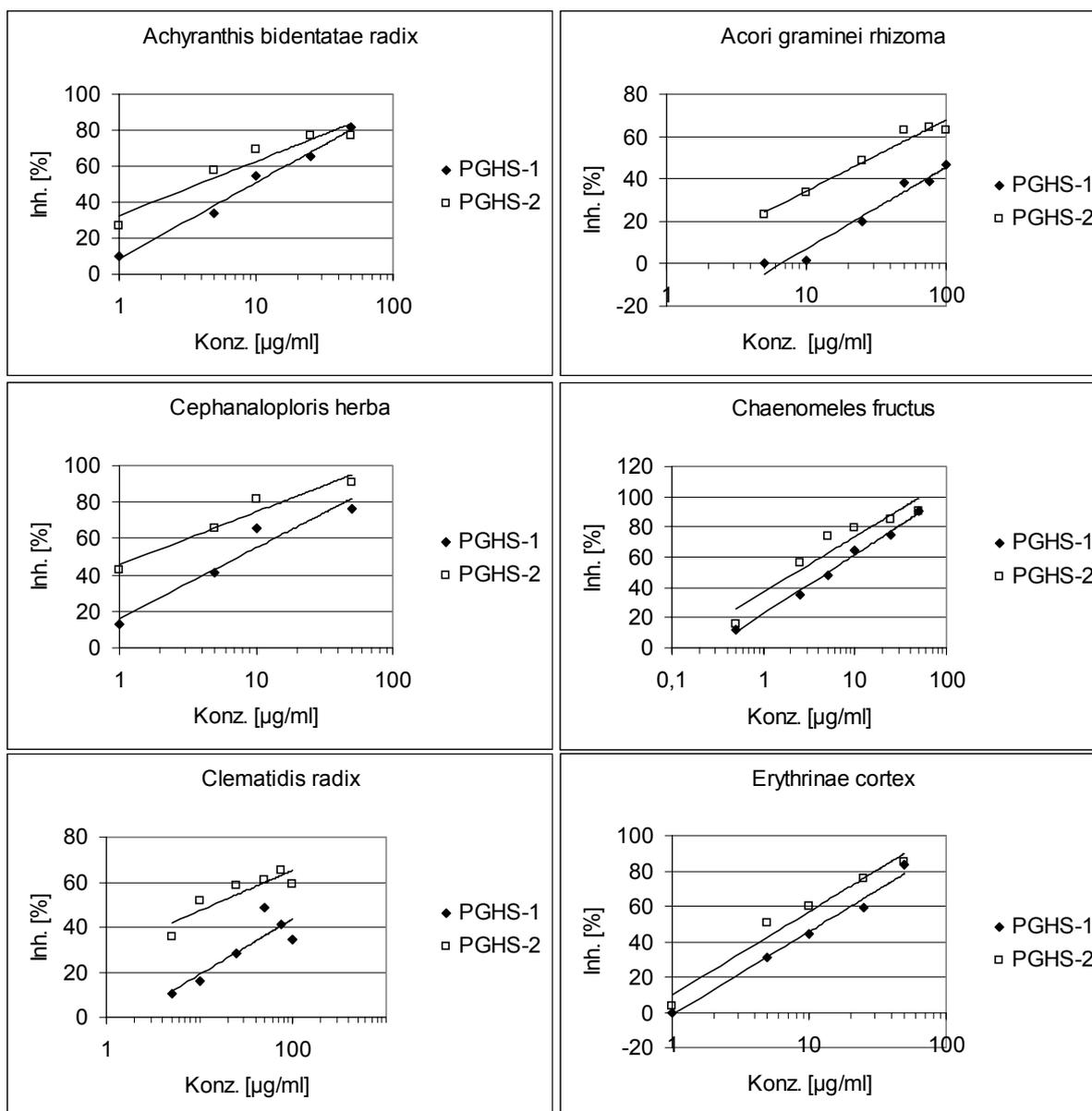
Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und getestet. Dies entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml im PGHS-1/-2 Testansatz.

Tabelle D.2: Ausgewählte Drogen zur Extraktion mit Dichlormethan

Droge	Chin. Bezeichnung	Familie	Bekannte Inhaltsstoffgruppen und Inhaltsstoffe
Achyranthis bidentatae radix	Niuxi	Amaranthaceae	Triterpene, Saponine vom Oleanolsäuretyp, Cholestanterivate: Ecdysterone, Inokosteron
Acori graminei rhizoma	Shichangpu	Araceae	äth. Öl mit α -Asaron, β -Asaron, γ -Asaron, Bisasaricin
Agrimoniae herba	Xianhecao	Rosaceae	Phenole (Agrimol A-E, Agrimoniin, Potentillin, Pedunculagin, Agrimophol, Agrimonolid), Flavonoidglycoside, Ellagsäure, Kaffeesäure, Gallsäure
Bupleuri radix	Chaihu	Apiaceae	Triterpensaponine und Sapogenine mit Saikosapogenin- und Oleanolsäuregrundkörper, äth. Öl, Flavone: Kaempferitrin und Kaempferol-7-rhamnosid
Cephalanoploris herba	Xiaoji	Asteraceae	Alkaloide, Cholin, Saponine
Chaenomelis fructus	Mugua	Rosaceae	Saponine, Flavone, Vit. C Fumarsäure, Oleanolsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Weinsäure (siehe Kapitel F)
Clematidis radix	Weilingxian	Ranunculaceae	Saponine, Prosapogenine mit Hedera-genin und Oleanolsäure, Protoanemonin, Anemonin
Platycodi radix	Jiegeng	Campulaceae	Triterpensaponine, Phytosterole, Betulin, Inulin, Polysaccharid (siehe Kapitel E)
Schizonepetae herba	Jingjie	Lamiaceae	äth. Öl (Menthon, d-Limonen), Monoterpene Schizonepetosid A-E, Flavone, Benzofurane
Scrophulariae radix	Xuanshen	Scrophulariaceae	Iridoidglycoside (Harpagosid, Aucubin u.a., Angorosid C), äth. Öl, Alkaloide, L-Asparamid, Flavonoide, p-Methoxyzimtsäure
Taraxaci herba	Pugongying	Asteraceae	Sesquiterpensäuren, Triterpene (Taraxasterol, Taraxicin), Phytosterole, Kaffeesäure, Flavoxanthin, Flavonoide, Inulin, Cholin

3.1. Bestimmung der halbmaximalen Hemmwerte und der PGHS-1/-2 Ratio

Die einzelnen Proben wurden im PGHS-1 und -2 Screening-Assay in mindestens vier Konzentrationen wenigstens in Doppelbestimmung eingesetzt. Der Dichlormethanextrakt von Bupleuri radix zeigte nur sehr geringe Hemmung der Isoenzyme. Deshalb wurde kein IC_{50} -Wert bestimmt. Die Ergebnisse des Screenings wurden gemittelt und graphisch dargestellt. Nach semilogarithmischer Auftragung wurde eine optimierte Gerade durch die Punkte gelegt, und die Konzentration berechnet, die 50 %-ige Hemmung entsprach. Folgende Graphen veranschaulichen die Bestimmungen der IC_{50} -Werte.



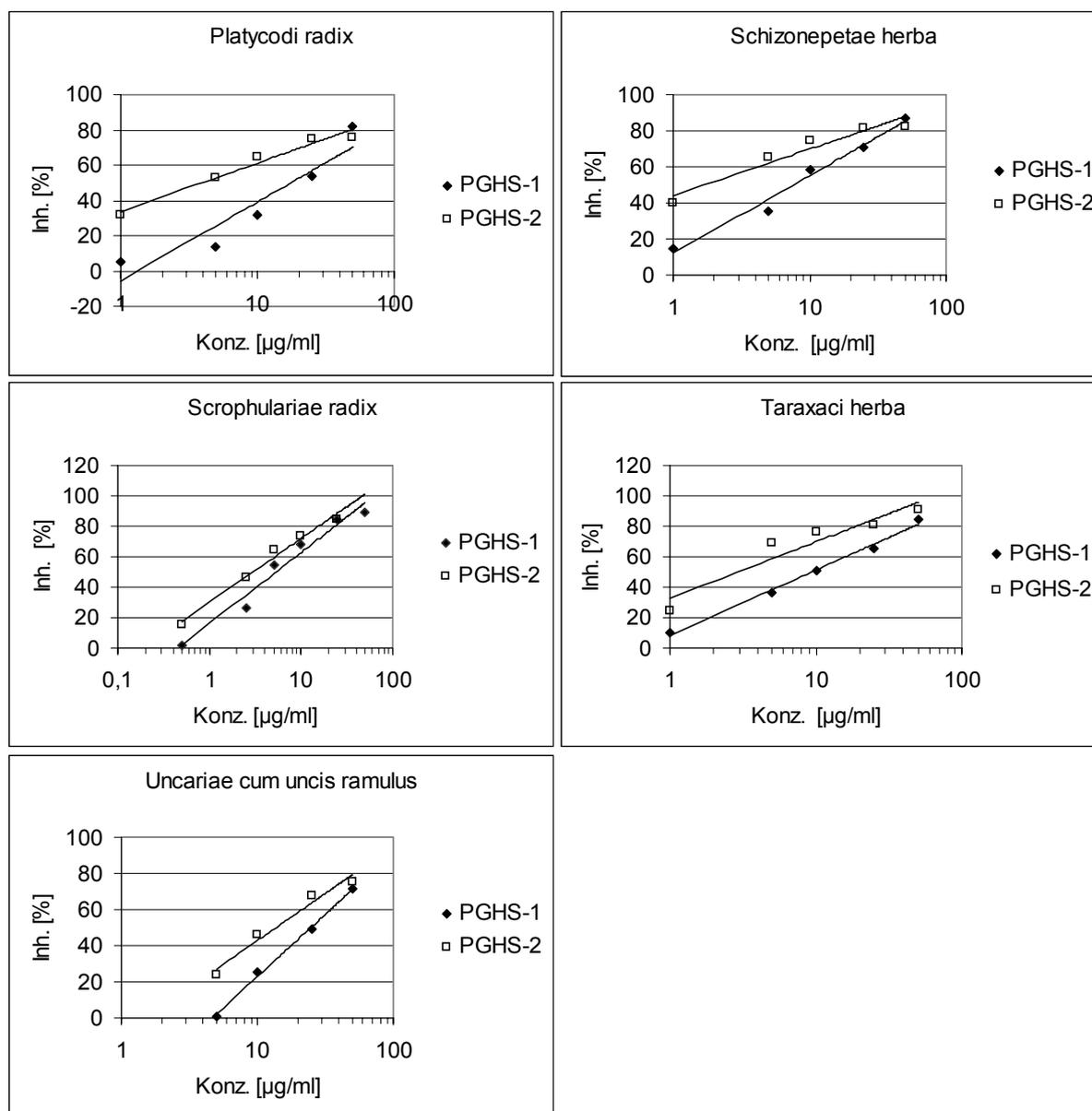


Abbildung D.1: Graphen der IC_{50} -Wertbestimmungen der direkt mit Dichlormethan hergestellten Extrakte

Die Berechnungen erfolgten mit computergestützter Auswertung über die beiden Parameter Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden. Aus den IC_{50} -Werten der beiden Isoenzyme wurde jeweils die Ratio berechnet. Die Hemmwerte waren nur geringfügig zugunsten der PGHS-2 verschoben. Die Positivkontrollen NS-398 hatte eine Ratio PGHS-1/PGHS-2 von 20, Nimesulid die Ratio PGHS-1/PGHS-2 von 6,8. Als einzige Droge erreichte Clematidis radix eine ähnliche Ratio, jedoch wie oben im Graphen abgebildet, flachte bei diesem Extrakt die Hemmung für höhere Konzentrationen stark ab, so daß für PGHS-1 keine 50 %-ige Hemmung erreicht werden konnte und PGHS-2 sich nicht stärker als 60-65 % hemmen ließ. Die positive Ratio von Cephalanoploris herba, Platycodi radix und

Schizonepetae herba zeigten für diese Drogen PGHS-2 präferentielle Hemmung und waren deshalb als interessant einzustufen (vgl. Tabelle D.1). Platycodi radix wurde wie in Kapitel E beschrieben weiter untersucht.

Tabelle D.1: Bestimmung der IC_{50} -Werte der Dichlormethanextrakte ausgewählter Drogen und deren Ratio PGHS-1/PGHS-2

Droge	Enzym	IC_{50} -Wert [$\mu\text{g/ml}$]	R^2 (Bestimmtheitsmaß)	Ratio (PGHS-1/ PGHS-2)
Clematidis rhizoma	PGHS-1	> 100	0,768	> 7,0
	PGHS-2	14,3	0,773	
Cephalanoploris herba	PGHS-1	7,2	0,935	5,1
	PGHS-2	1,4	0,940	
Schizonepetae herba	PGHS-1	7,6	0,977	4,5
	PGHS-2	1,7	0,931	
Platycodi radix	PGHS-1	17,6	0,888	4,4
	PGHS-2	4,0	0,967	
Acori graminei rhizoma	PGHS-1	>100 (131,3)	0,959	> 4
	PGHS-2	29,6	0,962	
Taraxaci herba	PGHS-1	9,3	0,992	3,1
	PGHS-2	3,0	0,905	
Achyranthis bidentatae radix	PGHS-1	9,6	0,986	2,5
	PGHS-2	3,8	0,917	
Chaenomelis fructus	PGHS-1	5,1	0,993	2,2
	PGHS-2	2,3	0,902	
Scrophulariae radix	PGHS-1	5,3	0,967	1,8
	PGHS-2	3,0	0,981	
Uncariae cum uncis ramulus	PGHS-1	24,7	0,970	1,8
	PGHS-2	13,7	0,997	
Erythrinae cortex	PGHS-1	12,4	0,987	1,7
	PGHS-2	7,1	0,969	

3.2. Fraktionierung ausgewählter Drogen und Testung der Fraktionen

Um die Wirksamkeit der Drogen etwas genauer charakterisieren zu können, wurde von fünf Drogen ca. 0,5 g Dichlormethanextrakt hergestellt. Dieser wurde auf eine Vakuumsäule aufgebracht und mit verschiedenen Mischungen aus *n*-Hexan/ Ethylacetat mit steigender Hydrophilie in elf Fraktionen aufgetrennt. Die letzte Fraktion wurde mit reinem Methanol gewonnen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend in einer Screeningkonzentration von 50 µg/ml hinsichtlich ihrer PGHS-1 und -2 hemmenden Wirkung untersucht. Jeder Wert wurde mindestens in Doppelbestimmung gemessen.

3.2.1. Clematidis radix

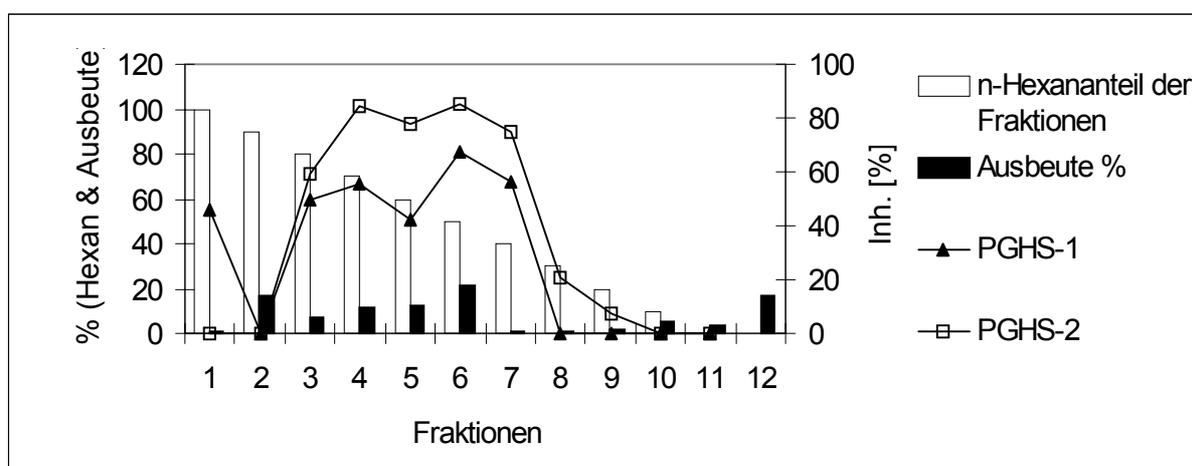


Abbildung D.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Clematidis radix* und PGHS-1/PGHS-2 Testung der Fraktionen (Konzentration je 50 µg/ml)

Die Droge zeigte in den mittelpolaren Fraktionen 3-7 zwischen 80 und 40 % *n*-Hexananteil die beste Hemmung und gleichzeitig auch die stärkste Differenz zwischen den beiden Isoenzymen. Die maximalen Hemmwerte erreichten ca. 80 % bei PGHS-2 sowie ca. 60 % bei PGHS-1 Testung. Fraktion 2 lieferte zwar eine gute Ausbeute, jedoch hemmte diese Fraktion keines der beiden Isoenzyme. Fraktionen 4 und 5 zeigten etwas geringere Ausbeuten, hier war aber die Präferenz am deutlichsten zugunsten der PGHS-2 verschoben. Fraktion 6 hatte sowohl die beste Ausbeute als auch die stärksten Hemmeigenschaften auf beide Isoenzyme, die Präferenz nahm allerdings wieder ab.

In den Fraktionen 3-7 konnten durchwegs gute Hemmwerte gefunden werden. Diese Fraktionen ergaben allerdings nur einen Anteil von ca. 50 % des Gesamtextraktes. Die Fraktionen 2 und 9-12 besaßen gute Ausbeuten, jedoch war ihre hemmende Wirkung sehr gering. Da ein großer Anteil des Extraktes die PGHS-Isoenzyme nicht beeinflusste, war es auf

der Stufe des Gesamtextraktes noch nicht möglich gewesen, die guten inhibitorischen Eigenschaften einzelner Bestandteile zu erkennen.

3.2.2. Chaenomelis fructus

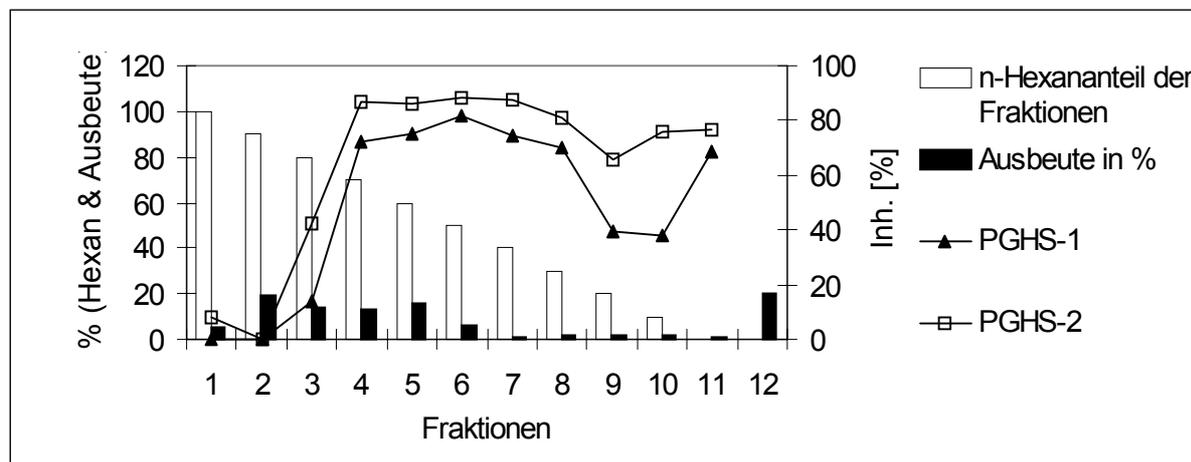


Abbildung D.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus* und PGHS-1/PGHS-2 Testung der Fraktionen (Konzentration je 50 µg/ml)

Der DCM-Extrakt der Droge *Chaenomelis fructus* zeigte ab Fraktion 3 ansteigende Hemmwerte für die beiden Isoenzyme. Eine leicht präferentielle Hemmwirkung zugunsten der PGHS-2 wurde bei allen Fraktionen mit 50 % oder weniger *n*-Hexan gefunden. Der Hemmwertunterschied zwischen den beiden Isoenzymen steigerte sich in Fraktion 9 und 10. Hier waren allerdings die Ausbeuten sehr gering. Hohe Ausbeuten bei gleichzeitig guten Hemmwerten konnten für die Fraktionen 4-6 gefunden werden. Weitere phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu dieser Droge sind in Kapitel F beschrieben.

3.2.3. Acori graminei rhizoma

Im Vergleich zu den anderen Drogen, deren Dichlormethanextrakt untersucht worden war, konnte bei diesem Extrakt die schwächste Gesamtwirkung gefunden werden. Bei der Fraktionierung ergab die Fraktion 3 mit 61 % die höchste Ausbeute. Die anderen Fraktionen wiesen nur sehr geringe Ausbeuten auf. Aus dem Extrakt wurde in Fraktion 3 das ätherische Öl mit verschiedenen Asaronisomeren eluiert. Das ätherische Öl hemmte zwar nur mit 30,6 % im PGHS-2 Test, jedoch scheint es auf die Gesamtwirkung des Dichlormethanextraktes durch die große Menge einen besonderen Anteil zu haben. Ätherisch-Öl-Komponenten waren schon

mehrfach als PGHS-Inhibitoren beschrieben worden (WAGNER, 1986). Die sehr wirksame Fraktion 7 hatte andererseits nur einen Anteil von 1,6 % am Gesamtextrakt.

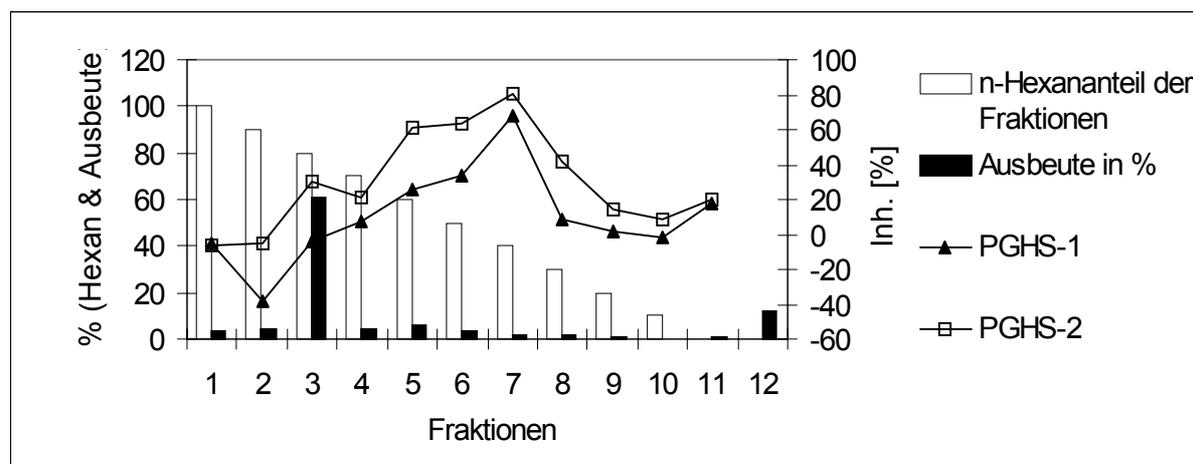


Abbildung D.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Acori graminei rhizoma* und PGHS-1/PGHS-2 Testung der Fraktionen (Konzentration je 50 µg/ml)

Da Wurzel drogen oft reichlich Fettsäuren enthalten, die sich im PGHS-1 und -2 Test als wirksam erwiesen hatten, wurde der Gehalt der Fettsäuren bestimmt.

Tabelle D.1: Fettsäuregehalt des Dichlormethanextraktes von *Acori graminei rhizoma*

Fettsäure	Gesamtgehalt	freie Fettsäuren
Palmitinsäure	3,1	2,1
Linolsäure	1,7	< 1
Ölsäure	2,9	< 1
Stearinsäure	-	-

Die Droge enthielt nach dieser Quantifizierung nur sehr geringe Mengen Fettsäuren, die größtenteils in gebundener Form vorlagen. Es konnte ein Einfluß der Fettsäuren auf die Wirkung damit ausgeschlossen werden.

3.2.4. Cephalanoploris herba

Nach der Fraktionierung war bei diesem Extrakt auffällig, daß sich wirksame Komponenten sowohl mit ca. 70 % *n*-Hexan als auch mit weniger als 50 % *n*-Hexan eluieren ließen. In Fraktion 5 wurden dagegen für PGHS-1 keine hemmenden Eigenschaften, für PGHS-2 nur sehr mäßige Hemmung gefunden. Die gute Wirksamkeit des Gesamtextraktes schien vor

allem durch die Fraktionen 3, 4 und 6 zustande zu kommen, die zusammen ca. 30 % des Gesamtextraktes ausmachten.

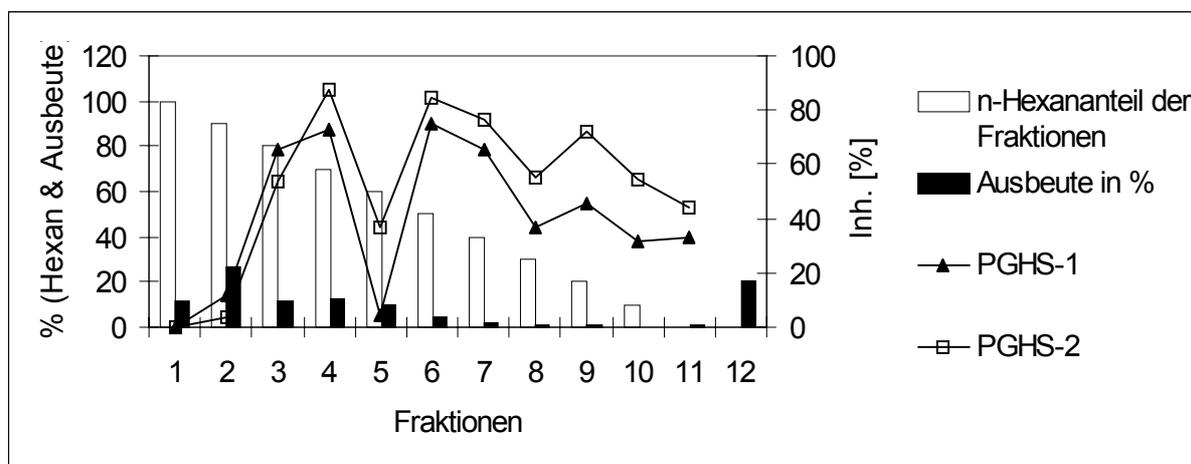


Abbildung D.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Cephalanoploris herba* und PGHS-1/PGHS-2 Testung der Fraktionen (Konzentration je 50 µg/ml)

3.2.5. Taraxaci herba

Der Dichlormethanextrakt von *Taraxaci herba* zeigte bei der Fraktionierung ab 80 % *n*-Hexananteil in allen Fraktionen gute inhibitorische Eigenschaften mit besonders starker Hemmung in Fraktion 5 (PGHS-1 78,7 %; PGHS-2 91,0 %). Die Präferenz für das induzierbare Isoenzym war zwar nicht besonders ausgeprägt, jedoch in allen Fraktionen ab Fraktion 4 erkennbar. Die wirksamen Bestandteile hatten ca. ein Drittel Gewichtsanteil am eluierten Extrakt. Die starke Hemmwirkung des Gesamtextraktes wurde also durch die Fraktionen 3-11 bedingt.

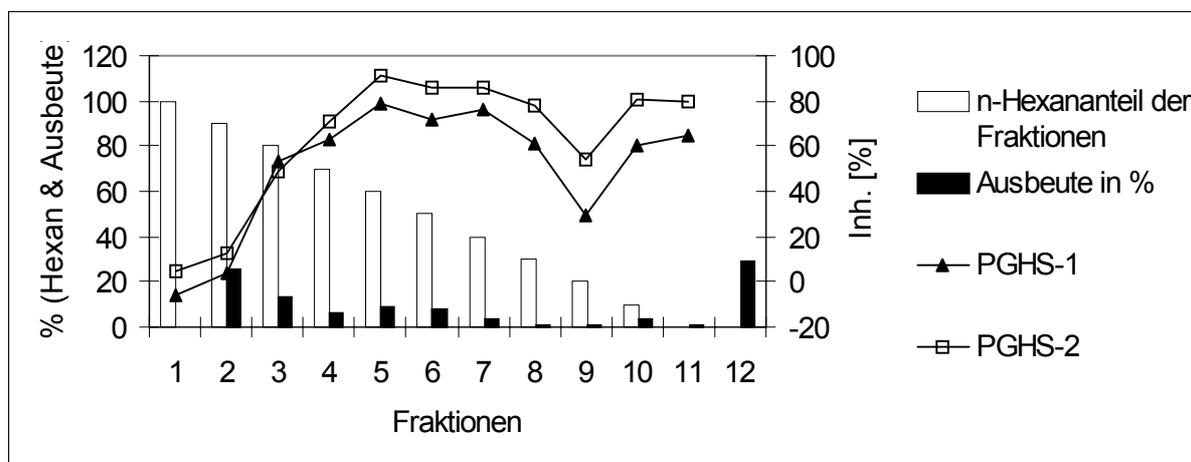


Abbildung D.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Acori graminei rhizoma* und PGHS-1/PGHS-2 Testung der Fraktionen (Konzentration je 50 µg/ml)

4. Screening-Untersuchungen von Extrakten und einzelnen lipophilen Inhaltsstoffen aus *Angelicae dahuricae radix*

Die Wurzel von *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook f., Baihzi, ist „ventus“ zerstreuend, „humor“ trocknend, macht die Nase durchgängig, wirkt schmerzstillend, abschwellend und den Eiterfluß fördernd. Sie wird bei Erkältungskrankheiten mit Kopfschmerz, Sinusitis, Zahnschmerzen, Furunkel und schmerzhaftes Schwellungen eingesetzt. Diese Droge wurde im Rahmen der Dissertation „Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von *Notopterygium incisum* Ting ex H.T. Chang und *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels sowie verwandter antiinflammatorischer Arzneidrogen aus der Familie der Umbelliferae“ von S. Zschocke bearbeitet (ZSCHOCKE, 1998).

4.1. Vergleich der sukzessiv hergestellten Extrakte und IC₅₀-Bestimmung des Dichlormethanextraktes

Bei der Testung der sukzessiv hergestellten Extrakte war aufgefallen, daß sowohl der Dichlormethan- als auch der Methanolextrakt von *Angelicae dahuricae radix* präferentiell die PGHS-2 hemmten (Abbildung D.1). Der *n*-Hexanextrakt entfaltet zwar vergleichsweise die stärkste Hemmung beider Isoenzyme, zeigte aber eine stärkere Wirksamkeit gegenüber der PGHS-1. Die maximale Hemmung der Extrakte war gut, jedoch gehörten diese im Drogenvergleich nicht zu den sehr stark inhibierenden Extrakten. Aus dieser Droge waren wichtige Inhaltsstoffe bereits identifiziert und isoliert worden, sowie ihre Hemmwirkung im COX-1 Test nach REDL (1994) mit einer Mikrosomenfraktion überprüft worden.

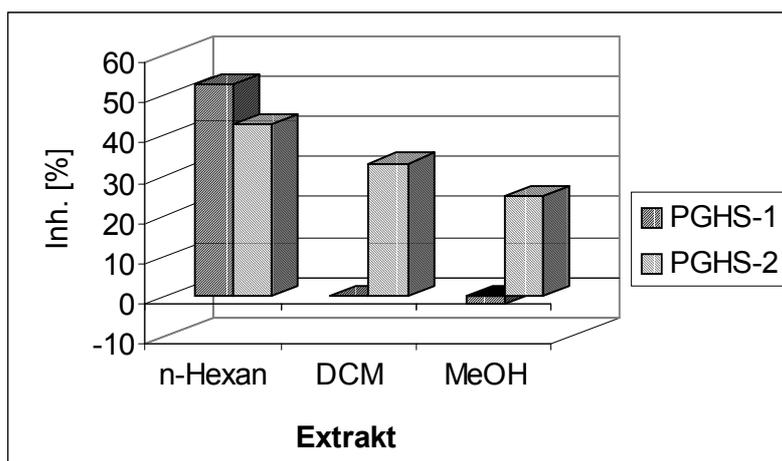


Abbildung D.1: Hemmwirkung der sukzessiv gewonnenen Extrakte von *Angelicae dahuricae radix* (je 50 µg/ml) auf die PGHS-1 und -2

Zur weiteren Charakterisierung der Wirksamkeit der Droge und in der Hoffnung, die starke inhibitorische und gleichzeitig präferentielle Wirkung aus den lipophilen Extrakten zu erhalten, wurde die gemahlene Droge direkt mit Dichlormethan extrahiert. Für den Dichlormethanextrakt wurden die IC_{50} -Werte für die beiden Isoenzyme bestimmt (Abbildung D.2). Die IC_{50} -Werte betragen 146,7 $\mu\text{g/ml}$ für die PGHS-1 und 179,6 $\mu\text{g/ml}$ für die PGHS-2.

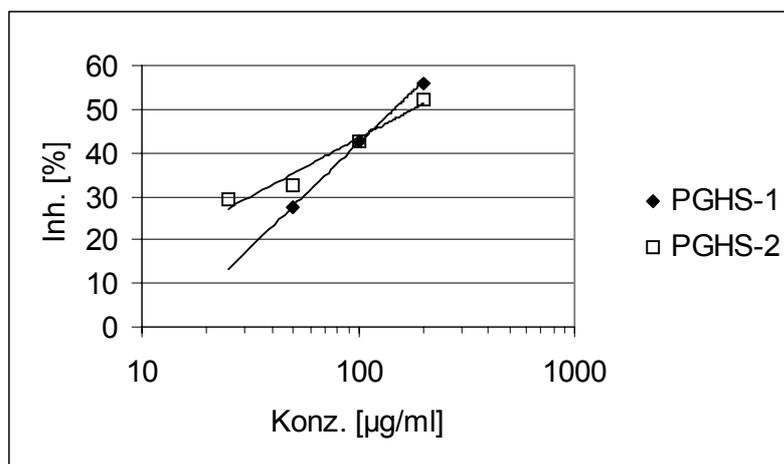


Abbildung D.2: Bestimmung der IC_{50} -Werte des Dichlormethanextraktes von *Angelicae dahuricae radix*

Zwar zeigte der Dichlormethanextrakt eine gute Hemmwirkung, jedoch ging die Selektivität zugunsten der PGHS-2 verloren. Die wirksamen Stoffe aus dem *n*-Hexanextrakt wurden also mit Dichlormethan ebenfalls extrahiert. Ihre Wirkung schien auch deutlich stärker zu sein als die Hemmeigenschaften der nicht *n*-Hexan löslichen Verbindungen. Im Vergleich zu den in Kapitel 3 untersuchten Dichlormethanextrakten, waren die Mengen des eingesetzten Extraktes für halbmaximale Hemmung relativ hoch.

4.2. Testung von Einzelkomponenten aus *Angelicae dahuricae radix*

Aus den Isolierungsarbeiten von S. Zschocke, J. Liu und G. Roos wurden einige der in der Droge identifizierten Hauptinhaltsstoffe in der Screeningkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ im PGHS-1/-2 Screeningtest untersucht.

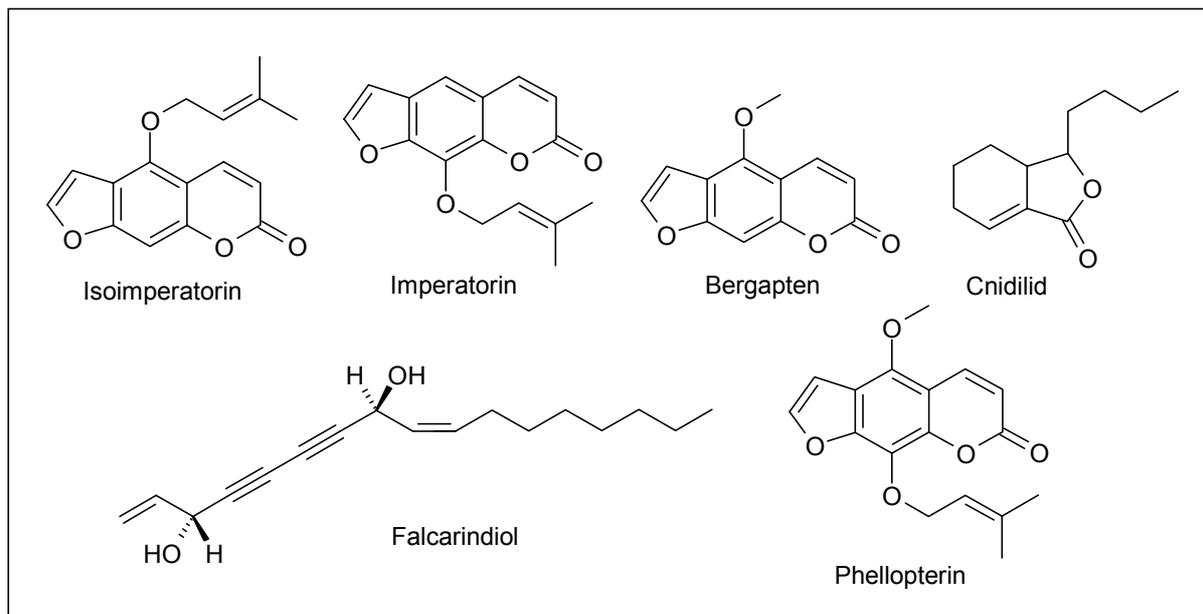


Abbildung D.1: Getestete Inhaltsstoffe aus *Angelicae dahuricae radix*

Das lineare Furanocumarin Isoimperatorin zeigte ca. 30 % Hemmung gegenüber beiden Isoenzymen. Die beste Hemmwirkung entwickelte Falcarindiol mit 68 % gegen PGHS-1 und 30 % gegen PGHS-2. Die anderen Inhaltsstoffe aus dem Extrakt zeigten weniger als 10 % Hemmung und müssen demnach als unwirksam betrachtet werden.

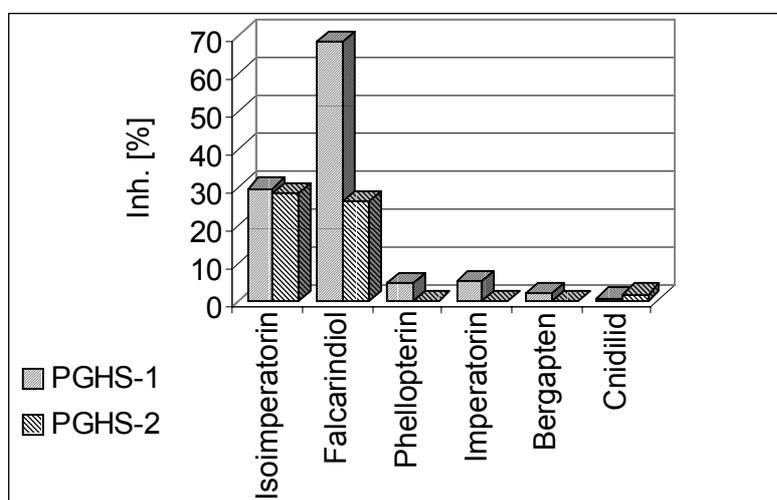


Abbildung D.2: Hemmwirkung lipophiler Inhaltsstoffe aus *Angelicae dahuricae radix* (Testkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$)

Aus diesen Beobachtung ging wiederum eher eine selektive Wirkung gegenüber der PGHS-1 als der PGHS-2 hervor. Der Trend hatte sich durch die Bestimmung der IC_{50} -Werte bereits

angedeutet. Die Selektivitäten der sukzessiv gewonnenen Dichlormethan- und Methanol-extrakte konnten damit nicht erklärt werden. Durch reine Konzentrationsverschiebung der getesteten Inhaltsstoffe zwischen dem direkten und dem sukzessiv gewonnenen Dichlormethanextrakt waren die Ergebnisse ebenfalls nicht zu erklären. Für die Wirksamkeit des Extraktes dieser Droge und ihrer präferenziellen Hemmwirkung können deshalb nicht die getesteten Verbindungen verantwortlich sein, sondern es müssen noch andere, bisher nicht bekannte Inhaltsstoffe enthalten sein.

5. Diskussion

Auf der Suche nach neuen Arzneistoffen werden seit Anfang der 90er Jahre verschiedene neue Wege beschritten wie kombinatorische Chemie mit High-Throughput-Screening (HTS), die Suche nach Antisens-Oligonucleotiden oder strukturorientiertes Wirkstoffdesign. Die kombinatorische Chemie bedient sich dabei Methoden, die von der Natur seit der Entstehung des Lebens angewandt werden: durch beliebige Kombination von wenigen Grundbausteinen werden eine Vielzahl von neuen Molekülen synthetisiert. Die strukturelle Vielfalt pflanzlicher Stoffe übertrifft dabei bei weitem die Möglichkeiten der kombinatorischen Synthese, da Pflanzen Sekundärstoffe mit Multienzymkomplexen synthetisieren, die dem Chemiker im Labor bisher nicht zur Verfügung stehen (VERDINE, 1996). Nachteilig ist allerdings, dass nach einem erfolgreichen Screening eines Pflanzenextraktes oder eines Stoffgemisches pflanzlichen Ursprungs sich die anschließende Aufklärungsarbeit als sehr schwierig erweisen kann. In der pharmazeutischen Industrie werden dennoch große Erfolge verzeichnet, neuartige Leitstrukturen durch HTS in pflanzlichen Extrakten zu finden (HENKEL et al., 1999). Dabei ist ein wichtiger Ansatzpunkt, daß in den meisten Fällen nicht ein reines Zufallsscreening erforderlich ist, sondern gerichtete Screenings durchgeführt werden können. Nach HOGAN besteht dabei folgender Zusammenhang (1996):

$$\text{required diversity} \propto \text{library size} \propto 1/\text{available information}$$

Die erforderliche Strukturvielfalt ist beim Screening von Pflanzenextrakten in jedem Fall gegeben. Die Größe der „library“ ist dabei abhängig von der möglichen Sensitivität eines HTS-Systems. Können noch einzelne Moleküle gemessen werden, so ist die Größe der Bibliothek beinahe unbegrenzt.

Die verfügbare Information zu verschiedenen Pflanzen ist in vielen Fällen sehr gut und resultiert oftmals aus traditionellen Anwendungen. Dadurch sind Hinweise für die biologische Aktivität und Wirksamkeit bereits vorhanden. Genauso ergeben sich daraus Anhaltspunkte zur Pharmakokinetik und Toxizität. Neben dem Auffinden von neuen wirksamen

Pflanzeninhaltsstoffen durch HTS, ist es genauso möglich, die Wirkweise bekannter Drogen zu erforschen (PETSKO, 1996).

Mit unseren neuentwickelten PGHS-1 und PGHS-2 Testsystemen sollte ein umfangreiches Screening von entzündungshemmend wirkenden, pflanzlichen Drogen aus der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) durchgeführt werden. Mit diesem Screening war es möglich einerseits neue, wirksame Extrakte zu finden, andererseits die Wirkweise von bekannten Drogenerzeugnissen zu charakterisieren. Unser Pflanzenscreening war **kein Zufallsscreening**. In China werden mit über 2000-jähriger Tradition ca. 5000 pflanzliche Drogen therapeutisch eingesetzt (BUT et al., 1980), deren Anwendungen dokumentiert sind (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997). Da auch in den westlichen Ländern die traditionelle chinesische Medizin als alternative Behandlungsmethode allmählich größere Bedeutung gewinnt, wird eine entsprechende Qualitätssicherung und rationale Erklärung der Wirkweisen immer stärker gefordert. Die Drogenerwahl für unser Screening wurde aufgrund der traditionellen Anwendungsgebiete der einzelner Pflanzen getroffen. In der traditionellen chinesischen Medizin existieren keine Indikationsgebiete nach westlichen Einteilungen. Unsere Auswahl beschränkte sich deshalb auf Pflanzen, deren Anwendungsgebiet denen eines Antiinflammatorikums, Analgetikums, Antipyretikums, Antirheumatikums oder eines antiulzerativ oder antitumoral wirkenden Medikamentes entsprachen. Sie war somit **targetorientiert**, denn all diese Indikationen können durch Beeinflussung der PGHS-Isoenzyme erklärt werden. Wichtig für ein erfolgreiches Pflanzenscreening ist die Qualität des verwendeten Drogenmaterials. Schon kleine Unterschiede in der inhaltstofflichen Zusammensetzung können zu Wirkverlust bzw. zu Nebenwirkungen führen. (BOULLATA et al., 2000). Die im Screening eingesetzten Drogen wurden deshalb mit Drogenatlanten identifiziert und mit Hilfe von dünnenschichtchromatischen Vergleichen und HPLC-Techniken geprüft.

Die Drogen wurden sukzessiv mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol extrahiert. Diese unterschiedlich lipophilen Wirkstofffraktionen wurden jeweils in einer Screeningkonzentration von 50 µg/ml im PGHS-1 und PGHS-2 Testsystem eingesetzt. Alle ausgewählten Drogen zeigten meßbaren Einfluss auf die PGHS-Isoenzyme mit Ausnahme von *Rubiae radix* und *Eucommiae cortex*. Für diese beiden Drogen kommt damit ein Wirkmechanismus über eine direkte Hemmung der PGHS-Isoenzyme nicht in Frage. Für die anderen Drogen bestätigte sich die Effizienz eines gerichteten Screenings, denn mindestens ein Extrakt hemmte jeweils eines der Isoenzyme.

Aufgrund des Testdesigns und der Detektion mit EIA konnte im Gegensatz zu PRÖBSTLE (1994) kein Extrakt 100 %ige Hemmung der Enzyme erreichen, da dieser Wert außerhalb des validen und damit messbaren Bereichs des EIAs lag (vgl. Abschnitt 2.1). Ein Extrakt wurde deshalb bereits ab 65 % Hemmung als stark wirkend eingeordnet („hit“). Wurden die Hemmwirkungen aller drei Extrakte von einer Droge addiert, so waren *Mori radice cortex*, *Violae herba*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Scrophulariae radix*, *Leonuri herba* und *Zingiberis rhizoma* die am stärksten hemmenden Drogen. Aus *Zingiberis rhizoma* wurden Gingerole und Gingerdione als gut wirksame PGHS-1 Inhibitoren isoliert (KIUCHI et al., 1982). Bei den

anderen Pflanzen konnte bisher kein ausreichend wirksamer Stoff gefunden werden, der die starke Hemmwirkung erklären könnte, noch wurden Untersuchungen zur direkten PGHS-2 Hemmung durchgeführt. Die Wirkung dieser Drogen wurde aber bereits im Mausohr- oder Rattenpfotenödemtest bestätigt (ZHU, 1998).

Gut erkennbar war durch die sukzessive Extraktion, welche Lipophilie die wirksamen Bestandteile aufwiesen. In den meisten Fällen zeigten die lipophilen Extrakte deutlich stärkere Hemmungen als die hydrophilen. Dies erklärte sich aus der Struktur der PGHS. Zum aktiven Zentrum führt ein langer hydrophober Kanal, in den hydrophile Inhaltsstoffe nicht eingelagert werden können (KURUMBAIL et al., 1996).

Im Vordergrund des Screenings stand nicht allein die Hemmstärke, sondern der Vergleich der Hemmwirkungen auf die beiden Isoenzyme der PGHS. Besonderes Interesse fanden dabei Extrakte, die **signifikant besser** PGHS-2 als PGHS-1 hemmten (T-Test). Da nur eine Testkonzentration (50 µg/ml) eingesetzt wurde, war es nicht sinnvoll das Hemmwertverhältnis zwischen der IC_{50} -Werten von PGHS-1 und PGHS-2 zu errechnen, das in der Literatur zur Bestimmung von Selektivität herangezogen wird (PAIRET et al., 1998). Damit konnte für keinen Pflanzenextrakt selektive Hemmung der PGHS-2 oder PGHS-1 definiert werden. Signifikant besser PGHS-2 hemmende Extrakte konnten jedoch im Screening bestimmt werden (Tabelle D.2). Auch umgekehrt signifikant besser die PGHS-1 hemmende Extrakte wurden detektiert. Dazu gehörten die *n*-Hexanextrakte von *Agrimoniae herba*, *Angelicae dahuricae radix*, *Scrophulariae radix* und *Zanthoxyli pericarpium*, die Dichlormethanextrakte von *Erythrinae cortex*, *Gardeniae fructus*, *Leonuri herba*, *Linderae radix*, *Mori radices cortex*, *Notopterygii rhizoma seu radix*, *Perillae fructus*, *Piperi sarmentosi herba*, und *Sophorae flavescentis radix* sowie die Methanolextrakte von *Cyperii rhizoma*, *Erythrinae cortex*, *Rubiae radix*, *Uncariae cum uncis ramulus* und *Zanthoxyli pericarpium*.

Diese Ergebnisse können nur erste Anhaltspunkte sein, welche Extrakte präferentiell oder selektiv hemmende Substanzen enthalten könnten. Im Extrakt können Effekte wie unspezifische Hemmungen, additive oder gar synergistische Effekte von Substanzen auftreten, die zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen würden. Auch war die Schwankungsbreite der Ergebnisse groß. Unter Berücksichtigung der nachfolgend aufgeführten Überlegungen musste dies jedoch größtenteils als systemimmanent angesehen werden:

- Extrakte bestehen aus einem Vielstoffgemisch. Vor allem wenn sich der Extrakt im Lösungsmittel für den PGHS-Assay (Ethanol p.A.) nicht vollständig wieder löste, waren große Schwankungen bei der Inhaltsstoffmenge nicht zu vermeiden. Auch konnte Zersetzung, Oxidation und andere Umwandlungen der inhaltlichen Zusammensetzung zu Schwankungen bzw. Wirkungsänderungen im Test führen.
- Enzymatische Analytik unterliegt prinzipiell einer stärkeren Streuung der Ergebnisse, da mit biologischem Material gearbeitet wird, das empfindlich auf alle äußeren Einflüsse reagiert. Die Präzision der Instrumentellen Analytik ist nicht erreichbar.

- Der Fehler vergrößert sich mit jedem weiteren Reaktionsschritt. Durch die Aneinanderreihung von zwei enzymatischen Tests und vielen Pipettierschritten potenzieren sich damit die Abweichungen.

Aus diesen Gründen musste eine relativ großzügige Fehlertoleranz akzeptiert werden. Auffällig war jedoch, daß vor allem bei schlechteren Hemmungen große Fehler zu finden waren und hier die Abweichungen teilweise höher als die Mittelwerte waren.

Beim Vergleich der Anwendungsgebiete mit der signifikant bevorzugten Hemmung konnte tendenziell festgestellt werden, dass vor allem PGHS-1 wirksamere Drogen bei akuten Schmerzen angewandt werden (*Linderae radix*, *Mori radice cortex*, *Cyperus radix*, *Uncaria cum uncis ramulus*), während antirheumatisch eingesetzte Drogen besser PGHS-2 hemmend wirkten (*Chaenomeles fructus*, *Erythrina cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*). Diese Beobachtung war interessant, da auch die beiden zugelassenen PGHS-2 Hemmstoffe Celecoxib und Rofecoxib, bei rheumatoider Arthritis und für Arthrose zugelassen sind, zur akuten Schmerztherapie jedoch konventionelle NSAR, mit Wirkung auch auf die PGHS-1 angewandt werden. (CLEMETT et al., 2000, SCOTT et al., 1999). Diese Beobachtung bestätigte wiederum, dass für hohe Trefferquoten im HTS, wichtige Hinweise für die Wirkweise aus den traditionellen Anwendungen gewonnen werden können.

Um präferentielle oder selektive Wirkung von Extrakten festzustellen waren also weitere Tests und Bestimmungen von IC_{50} -Werten notwendig, mit denen eine Ratio aus PGHS-1 und PGHS-2-Hemmung errechnet werden konnte.

Für diese Untersuchungen wurden aufgrund von Überlegungen günstiger und gerichteter Hemmwirkungen, verbesserter Löslichkeit in Ethanol p.A., das als Lösungsmittel der pharmakologischen Testungen diente, und verbesserten Ausbeuten zwölf Pflanzen ausgewählt und direkt mit Dichlormethan extrahiert (vgl. Abschnitt 3). Dabei entstanden Extrakte mit neuer, von der sukzessiven Extraktion abweichender Stoffzusammensetzung. Vielfach fiel die Korrelation zwischen der sukzessiven Extraktion und der direkten Dichlormethanextraktion (DCMD) deshalb schwer. So zeigte beispielsweise der DCMD-Extrakt von *Clematidis radix* eine bessere PGHS-2 Wirkung als der sukzessiv gewonnene Dichlormethanextrakt, während bei *Angelicae dahuricae radix*, die bessere PGHS-2 Wirkung verschwand. Bei *Angelicae dahuricae radix* wurden mit der direkten Dichlormethanextraktion wohl auch Stoffe extrahiert, die vorher bei sukzessiver Extraktion mit *n*-Hexan eluiert worden waren. Diese Stoffe hatten bessere Hemmwirkung auf die PGHS-1 als auf die PGHS-2 gezeigt.

Bis auf *Bupleuri radix*, dessen DCMD-Extrakt nur eine sehr schwache Wirkung aufwies, zeigten alle direkt hergestellten Dichlormethanextrakte gute Hemmwirkung und hemmten mit Ausnahme von *Angelicae dahuricae radix* bevorzugt PGHS-2. Im Vergleich zu den synthetisch hergestellten selektiven PGHS-2 Hemmstoffen NS-398 und Rofecoxib, die in unsere Testsystem PGHS-1/PGHS-2 Ratios von 20 bzw. >36000 auswiesen, lagen die Hemmwertverhältnisse der getesteten DCMD-Extrakte zwischen 1,7 und >7. Der präferentielle Hemmstoff Nimesulid ergab eine Ratio von 6,8. Damit konnte für **keinen** Extrakt

selektive Hemmung gefunden werden, jedoch konnten elf der zwölf ausgewählten DCMD-Extrakte als **präferentiell PGHS-2 wirksam** eingestuft werden.

Da bisher nur sehr wenige Inhaltsstoffe dieser gewählten Drogen bezüglich ihrer PGHS-2 Beeinflussung untersucht worden waren, konnte keine ausreichende Erklärung für die präferentielle PGHS-2 Wirkung gefunden werden (zu den bekannten Inhaltsstoffen vgl. Tabelle D.2). In *Scrophulariae radix* wurden beispielsweise Iridoidglycoside wie Harpagosid identifiziert. Harpagosid ist eine Leitsubstanz der Teufelskralle, die als Phytotherapeutikum bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt wird (WEGENER, 1999). Dabei widersprechen sich jedoch Ergebnisse, dass Harpagosid PGHS-2 inhibitorisch wirksam ist. Ebenso muss angenommen werden, dass das glykosidierte, hydrophile Iridoid nicht mit Dichlormethan extrahiert wurde. *Achyranthis bidentatae radix*, *Clematidis radix*, *Chaenomeles fructus*, *Cephalanoploris herba*, *Platycodi radix* und *Taraxaci herba* enthalten Triterpene bzw. Triterpensaponine. Untersuchungen von RINGBOM et al. (1998) hatten die beiden Saponine Oleanolsäure und Ursolsäure als selektive PGHS-2 Hemmstoffe identifiziert. Jedoch war die Aktivität der beiden Verbindungen nicht sehr groß, so daß sie die starken Hemmwirkungen einzelner Extrakte nicht erklären können. In den Drogen *Acori graminei rhizoma*, *Agrimoniae herba*, *Schizonepetae herba* und *Scrophulariae radix* sind ätherisches Öl bzw. phenolische Komponenten enthalten. Für diese Inhaltsstoffe waren bisher nur PGHS-1 hemmende Eigenschaften beschrieben worden (WAGNER, 1989). Bisherige Untersuchungen hatten für die Flavonoide wie beispielsweise (+)-Catechin, Gallocatechinderivate Ouratea-proanthocyanidin und Quercitrin keine selektive Hemmung der PGHS-2 finden können (NOREEN et al., 1998).

Zur weiteren Eingrenzung des Wirkprinzips wurden ausgewählte Dichlormethanextrakte durch VLC (Vakuum-Flüssig-Chromatographie) an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat-Gemischen gleichmäßig steigender Polarität in zehn Fraktionen getrennt. Durch Verwendung dieser schnellen, effektiven Methode der VLC konnte in kurzer Zeit ein guter Überblick gewonnen werden, welche Polarität die wirksamen Bestandteile besaßen. Alle Fraktionen wurden einrotiert und in Ethanol p.A. für die Testungen in einer Konzentration von 1 mg/ml wieder aufgenommen. Dieser Aufarbeitungsschritt war unumgänglich, da weder *n*-Hexan noch Ethylacetat geeignete Lösungsmittel für den Einsatz in den PGHS-1/-2 Testsystemen darstellten. Die VLC hatte dadurch den Nachteil, dass die Testung nicht direkt mit der Fraktionierung verknüpft werden konnte. Es musste immer ein Arbeitsschritt für die Herstellung der ethanolischen Lösungen zwischengeschaltet werden. Andere Bemühungen einer direkten Kopplung von chromatographischer Trennung und pharmakologischem COX-2-Screening haben bisher zur Erkennung pflanzlicher PGHS-2 Hemmstoffe keine ausreichenden Erfolge gezeigt, da selbst bei synthetischen Inhibitoren die Schwankungen zu groß für präzise Auswertungen waren (HUSS et al., 1999).

Durch die VLC-Fraktionierung verloren gut hemmende Extrakte nicht an Potenz. Bei allen Extrakten wurde ersichtlich, dass die extrem lipophilen Fraktionen nur sehr wenig die PGHS-Isoenzyme beeinflussten. In diesen waren Wachsbestandteile, Fette, Kohlenwasserstoffe oder lipophile Bestandteile aus dem ätherischen Öl enthalten. Für diese sehr lipophilen

Pflanzeninhaltsstoffe war auch in der Literatur bisher keine Hemmwirkung auf die PGHS beschrieben worden (vgl. ZSCHOCKE, 1998; RESCH, 1999; STÖHR, 1999).

Der Vergleich der Wirkstärken der Fraktionen mit der enthaltenen Ausbeute machte deutlich, dass gerade niedrig konzentrierte Anteile gute Wirkstärken aufwiesen. Alle Fraktionen wurden in einer einheitlichen Screeningkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Diese Vorgehensweise betonte stärker die Wirkstärke einzelner Inhaltsstoffe, vernachlässigte aber die natürlich vorhandene Konzentration der Stoffe. Die Methode der Testung einer einheitlichen Konzentration wurde gewählt, um zu vermeiden, dass bei geringer Ausbeute gute Hemmstoffe nur niedrige Hemmwerte zeigen würden und durch die große Schwankungsbreite des Testes gerade bei geringeren Hemmwerten (< 20% Hemmung) zu viele falsch negative Ergebnisse zustande kommen würden. Die starke Wirkung von Spurenkonzentrationen ist in den phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen von *Atractylodes lancea* eindrücklich beschrieben worden (RESCH, 1999).

Auch die Untersuchungen zu *Angelicae dahuricae radix* belegten, daß nicht die Hauptinhaltsstoffe einer Pflanze die Wirkungsträger sein müssen. Zwar hatte der Dichlormethanextrakt gute Wirkungen im PGHS-1 und -2 Test gezeigt, doch nur Isoimperatorin zeigte ca. 30 % Hemmung auf beide Isoenzyme und Falcarindiol 65 % Hemmung der PGHS-1 bzw. ca. 30 % Hemmung der PGHS-2 in einer Konzentration von 50 µg/ml. Alle anderen getesteten Komponenten erwiesen sich als wirkungslos in dieser Konzentration. Die Hauptinhaltsstoffe der Droge konnten die Hemmung der PGHS-Isoenzyme damit nicht klären. Ein hier nicht untersuchter PGHS-1 hemmender Inhaltsstoff in *Angelica dahurica* ist Linolsäure. Untersuchungen von LIU et al. (1998) ergaben, dass Linolsäure in einer Konzentration von ca. 25 µM im *n*-Hexanextrakt von *Angelicae dahuricae radix* enthalten ist. Für diesen Extrakt ergab sich damit eine mögliche Einflussnahme auf die Wirkung auf die COX-1. Da auch mit Dichlormethan Linolsäure extrahiert wird, darf dieser Inhaltsstoff für weitere Untersuchungen nicht unberücksichtigt bleiben.

Das Screening der targetorientierten Auswahl von Arzneidrogen aus der traditionellen chinesischen Medizin hatte somit gezeigt, dass die Anzahl der wirksamen Pflanzenextrakte („hits“) durch ausreichend Informationen über die traditionelle Anwendung stark erhöht werden kann. Dies bedeutet andererseits, dass die Anwendung der meisten hier getesteten Drogenextrakte bei Entzündungen durch die Wirkung auf die PGHS-Isoenzyme erklärt werden kann. Die Wirkung ist jeweils von der Art des Extraktes und seiner Polarität abhängig. Weitere Informationen zur Polarität der wirksamen Inhaltsstoffe lassen sich über die effiziente und schnelle Methode der VLC-Fraktionierung erhalten. Dabei müssen besonders auch niedrig konzentrierte Inhaltsstoffe beachtet werden, da hier hohes inhibitorisches Potential gefunden werden kann. Ein Screening von Mehrstoffgemischen kann aber nur erste Anhaltspunkte für das Vorhandensein von selektiv oder präferentiell hemmenden Inhaltsstoffen bieten. Es muss sich in jedem Fall eine Testung von isolierten Verbindungen anschließen.

Das pharmakologische Screening und besonders die Untersuchungen der Dichlormethan-extrakte diente dazu, eine engere Auswahl von Drogen für detaillierte phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu treffen. *Platycodi radix* schien interessant, da sich bei diesem Extrakt eine deutliche PGHS-2 Präferenz abzeichnete, wobei die Differenz der IC_{50} -Werte im Vergleich zu den anderen untersuchten Drogen besonders deutlich war. *Chaenomeles fructus* wurde gewählt, da die Hemmstärke des Extraktes auf beide Isoenzyme sehr gut war und bisher zur Inhaltsstoffführung nur sehr wenige Daten vorlagen. Die Kombination der Anwendung als Antirheumatikum und zugleich auch als Magenmittel, weckte besonderes Interesse, ob sich diese Kombination besonders auf die Beeinflussung der Prostaglandin-H-Synthase-2 zurückführen ließ. In den folgenden Kapiteln sind diese beiden Drogen näher beschrieben.

E Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu *Platycodi radix* „Jiegeng“

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Beschreibung der Pflanze und der Droge



Abbildung E.1: *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. (aus CYONG et al., 1982)

Beschreibung der Pflanze

Platycodon grandiflorum (Jacq.) A. DC. aus der Familie der Campanulaceae ist eine ganzjährige Staude mit ca. 40-50 cm hohem Wuchs, vom Boden an einfach und unverzweigt. Die Blätter sind am Grund wechselständig, bisweilen beinahe gegenständig. In der unteren Hälfte des Triebes sind sie sitzend, länglich-oval, ca. 3 cm lang, zur Basis sich verjüngend, mit grob gezahntem Blattrand. Die oberen Blätter sind reduziert.

Die Blüten stehen einzeln oder selten zu zweit. Sie sind lang gestielt und befinden sich jeweils am Ende eines Triebes. Die auffällig violett-blauen, ca. 4 cm großen bauchigen Glöckchen setzen sich aus fünf verwachsenen Kronblättern zusammen. Als Frucht bildet sich eine eiförmige, fünfteilige Kapsel, die zur Reife an der Oberseite aufplatzt und viele stumpf eiförmige, bräunliche Samen entlässt.

Der lateinische Name leitet sich aus dem Griechisch/Lateinischen von der Blütenform „großblumige breite Glocke“ ab (DANERT et al., 1971). Der englische Name, balloon

flower, und chinesische Name „Jiegeng“ („gestielte, runde Frucht“) leiten sich von der Form der Kapseln ab, die an einen Ballon erinnert.

Als wichtige Arzneipflanze wurde sie schon früh beschrieben und erhielt so mehrere Namen. Neben *Platycodon grandiflorum* werden synonym *P. chinensis* Lindl, *P. autumnalis* Deche., *P. sinensis* Lem. oder *Campanula grandiflora* Jacq. verwendet.

Wildvorkommen von *Platycodon grandiflorum* finden sich im gesamten nordostasiatischen Raum, in China, Korea bis ins östliche Sibirien. Aufgrund der schönen Erscheinung und der Genügsamkeit der Pflanze sind Züchtungen mit weißen, violetten, blauen und sogar besonders imposanten rosaroten Blüten als Zierpflanze im Handel erhältlich.

Makroskopische Beschreibung der Droge

Pharmazeutisch findet die im Frühjahr oder Herbst geerntete, getrocknete und gewaschene Ballonblumenwurzel Verwendung. Sie wird von Nebenwurzeln befreit und entweder frisch geschält getrocknet oder ungeschält getrocknet (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997).

Die Wurzel ist unregelmäßig, rundzylindrisch oder konisch und oft verzweigt. Am oberen Ende erreicht sie einen Durchmesser von bis zu 3 cm. Ihre Länge beträgt ca. 10-15 cm. Die Außenseite ist graubraun oder beige bei ungeschälten oder hellbraun bis blass gelblich bei geschälten Wurzeln. Ihre Oberfläche ist reichlich überzogen von Längsrillen, Furchen sowie Narben von der Entfernung der Nebenwurzeln. Die Droge hat eine spröde, aber harte Textur, zerbricht uneben, jedoch ohne Fasern.

Bei genauer Betrachtung erkennt man den Kambiumring durch die benachbarte braune Verfärbung. Nach außen schließt sich die Rinde an. Nach innen findet sich dichtes fast weißes Xylem.

Die Droge ist geruchlos, anfangs leicht süß im Geschmack, später aber bitter (STÖGER, 1999).

Mikroskopische Beschreibung

Im Querschnitt (Abbildung E.2) der ungeschälten Droge finden sich an der Außenseite mehrere Schichten isodiametrischer Korkzellen, von denen an der geschälten Wurzel nur einzelne Zellen verbleiben. Im Kork finden sich Calciumoxalatprismen. Die primäre Rinde ist schmal und zeigt häufig Risse. Das Phloem durchziehen Zellgruppen mit Milchsaftröhren, bei denen die Zellwände leicht verdickt sind. Einige Zellen enthalten auch gelbbraune Inulingranula, die nach dem chinesischen Arzneibuch (STÖGER, 1999) in Glycerinlösung sichtbar gemacht werden können. Zwischen Phloem und Xylem zeigt sich ringförmig das

Kambium. Die Gefäße des Xylems sind radiär in Gruppen oder einzeln angeordnet. Die Parenchymzellen enthalten Inulinkristalle.

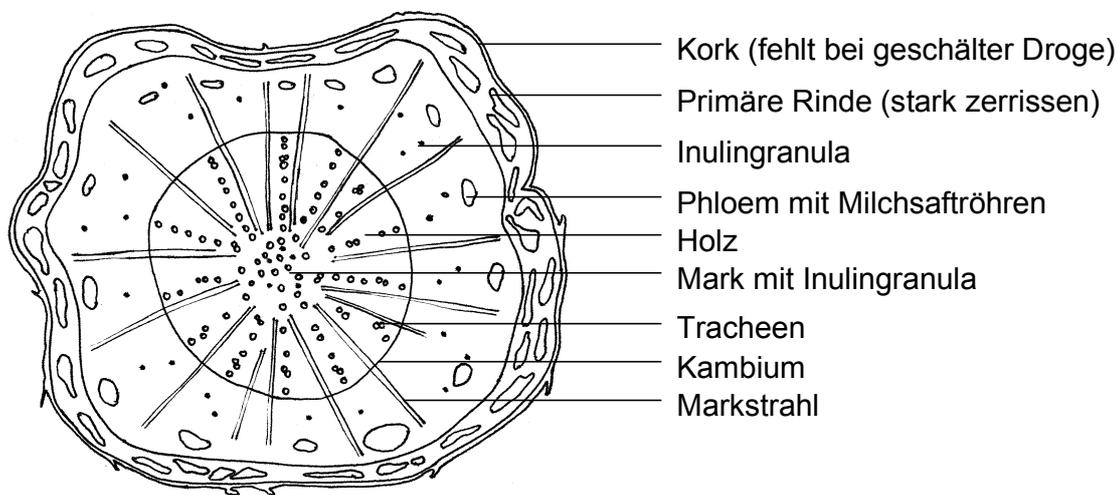


Abbildung E.2: Querschnitt durch *Platycodi radix* (modifiziert nach STÖGER, 1999)

1.2. Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin

Zum traditionellen Anwendungsbereich von „Jiegeng“ zählen vor allem Lungenleiden und Erkrankungen des Rachens sowie die Förderung der Sputumeliminierung und des Eiterauswurfes.

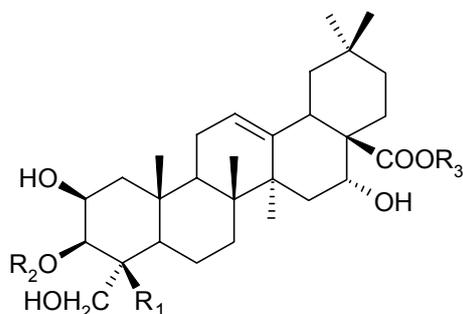
Als Indikationsgebiete werden in der Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1997) Erkältungen mit reichlich Schleim, Halsentzündung, Heiserkeit, Lungenabszesse mit eitrigem Auswurf oder Abszesse, die sich nach Eiterung nur schwierig öffnen, genannt.

Im ostasiatischen Raum findet die Droge zusätzlich Verwendung bei Stomatitis, peptischen Ulzera und chronisch entzündlichen Erkrankungen (OZAKI, 1995).

Das chinesische Arzneibuch nennt als Tagesdosis 3-9 g. Traditionell wird der Dekokt eingesetzt. *Platycodi radix* wird häufig in Kombination mit anderen Drogen verwendet, wie beispielsweise mit *Agastachis herba*, *Angelicae dahuricae radix* oder *Schizonepetae herba* bei Erkältungsleiden, aber auch mit *Rehmanniae radix* gegen hohes Fieber, Ruhelosigkeit und Delirium (GENG et al., 1994).

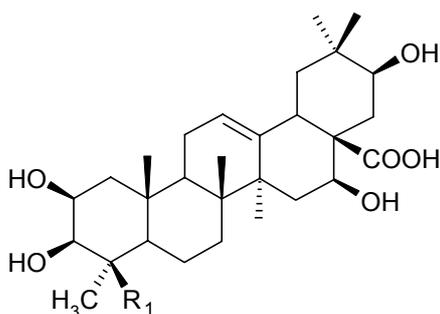
1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe und pharmakologische Untersuchungen

Hauptinhaltsstoffe der Wurzel von *Platycodon grandiflorum* sind saure Triterpensaponine, die als Sapogenine meist Platycodigenin, Polygalasäure oder Platycogensäure enthalten (ISHII et al., 1978a & b).



	R ₁	R ₂ , R ₃
Polygalasäure	-CH ₃	H
Platycodigenin	-CH ₂ OH	H

Als weitere Sapogenine wurden Platycogensäure B und Platycogensäure C beschrieben.



	R ₁
Platycogensäure B	-COOH
Platycogensäure C	-CH ₃

Beispiele für die entsprechenden Saponine sind verschiedene Platycodine und Polygalacine.

Tabelle E.1: Beispiele für Saponine aus *Platycodi Radix*

	Sapogenin	Zucker R ₂	Zucker R ₃
Polygalacin D	Polygalasäure	β-D-Glc	D-Arabinose(Ara)-D-Rhamnose (Rha)-D-Xylose (Xyl)-D-Apiose (Api)
Polygalacin D ₂	Polygalasäure	Glc-Glc; β-1,3	
Platycodin A	Platycodigenin	b-D-Glc	Ara-2O-Acetylramnose-Xyl-Api
Platycodin C	Platycodigenin	b-D-Glc	Ara-3O-Acetylramnose-Xyl-Api
Platycodin D	Platycodigenin	b-D-Glc	Ara-Rha-Xyl-Api
Platycodin D ₃	Platycodigenin	Glc-Glc; β-1,6 (Gentiobiose)	

Der Gesamtsaponingehalt darf nach chinesischem Arzneibuch einen Wert von 6 % nicht unterschreiten (STÖGER, 1999).

GORECKI (1992) nennt als weitere Inhaltsstoffe 0,2–0,3 % eines scharf riechenden, sehr flüchtigen Öls sowie die Sterole Δ^7 -Stigmastenol, α -Spinasterol, α -Spinasteryl- β -D-glucopyranosid und das Triterpen Betulinsäure. Die Chinese Materia Medica (ZHU, 1998) gibt an, dass aus der Wurzel Inulin und das Polysaccharid Platycodin in isoliert wurden.

Vor allem die Saponinfraktion sowie einige Saponinreinstoffe wurden bereits auf ihre **pharmakologischen Wirkungen** hin untersucht. Es existieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen.

Platycodi Radix besitzt danach folgende Wirkungen:

- **expektorierende und antitussive Wirkung:**

Die orale Gabe eines Dekoktes förderte die Speichel- und die Bronchialsekretion. Dazu wurde bei betäubten Hunden oder Katzen die Anregung des Speichelflusses beobachtet, die der von Ammoniumchlorid entsprach. Für diesen Effekt werden die Platycodine verantwortlich gemacht, weshalb die Wirkung der Einzelstoffe ebenfalls getestet wurde. Die Saponine riefen eine Irritation der Rachen- und Darmmukosa hervor, verstärkten damit die Schleimsekretion im Respirationstrakt und halfen mit der Sputumverdünnung, den Auswurf zu erleichtern.

Eine *in vivo* Studie an Meerschweinchen zeigte, dass Platycodine die Häufigkeit des Hustens mindern können (effektive Dosis 6,4 mg/kg i.p.). Bei durch Ammoniak induziertem Husten war ein 20%-iger Dekokt wirksam (CHANG, 1987).

- **hypoglykämischer Effekt:**

Wässrige oder alkoholische Auszüge zeigten bei Hasen blutzuckersenkende Wirkung. Die Wirkstärke des wässrigen Extraktes entsprach der von Tolbutamid (WANG, 1983).

- **antiulzerative Wirkung und Hemmung der Magensaftsekretion:**

Platycodonsaponine hemmten die Magensaftsekretion bei Ratten und wirkten vorbeugend gegen Magengeschwüre (ZHU, 1998).

- **antihypercholesterinämische und antihyperlipidämische Effekte:**

Beimengungen von *Platycodi radix* zum Futter von Ratten, bei denen diätetisch Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie ausgelöst worden war, zeigten eine signifikante Herabsetzung des Cholesterinspiegels und der Blutfettwerte um 5 % (KIM et al., 1989).

- **zentralhemmende Wirkung:**

Reine Platycodine schränken die spontane Aktivität von Mäusen ein und der durch Cyclobarbital induzierte Schlaf wurde verlängert (ZHU, 1998).

- **antiinflammatorische Wirkung:**

Carrageen- oder essigsäureinduziertes Rattenpfotenödem konnte durch intragastrale Verabreichung einer nicht näher beschriebenen Saponinfraktion inhibiert werden (Dosis: 1/10- 1/5 LD₅₀); orale Langzeitgabe (1/10 LD₅₀) dieser Saponinfraktion verhinderte die Wunde-induzierte Granulation bei Ratten. Ebenso konnte damit die Kapillarpermeabilität von Mäusen mit allergischen Reaktionen reduziert werden. Durch Platycodine konnte effektiv Adjuvans-induzierte Arthritis bei Ratten gehemmt werden. Nicht näher konkretisierte analgetische und antipyretische Effekte wurden ebenfalls beobachtet (ZHU, 1998).

Der wässrige Extrakt von *Platycodi radix* hat keine direkte antibakterielle Wirkung, steigert jedoch die Abwehr der bakteriellen Erreger im Körper (ZHU, 1998).

Reine Platycodonsaponine besitzen ausgeprägte hämolytische Eigenschaften (hämolytischer Index: 1,2fach bzgl. Standardsaponin). Deshalb sollten Platycodonzubereitungen nur oral gegeben werden, da nach der Magen-Darmpassage kein hämolytischer Effekt mehr auftritt. Die gastrointestinale Resorption der Saponine ist niedrig (TAKAGI et al., 1972).

Die beschriebenen pharmakologischen Studien wurden jeweils mit hydrophilen Extrakten bzw. einzelnen Inhaltsstoffen aus *Platycodon grandiflorum* durchgeführt. Zu lipophilen Extrakten fehlen bisher pharmakologische Studien.

Die bisher einzige Studie zur Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels konnte für den methanolischen Extrakt keine inhibitorische Aktivität gegenüber einer Mikrosomenpräparation, die reich an Cyclooxygenase-1 war, nachweisen (PRÖBSTLE, 1994).

Klinische Studien mit der pulverisierten Droge oder dem Dekokt wurden zwar durchgeführt, doch sind bisher keine Daten verfügbar (WHO Monographs, 1999).

2. Ergebnisse eigener Untersuchungen

2.1. Chromatographische Untersuchungen

2.1.1. Dünnschichtchromatographischer Vergleich verschiedener Extrakte

Das Screening der unterschiedlichen, sukzessiv gewonnenen Extrakte hatte für die lipophilen Extrakte von *Platycodi radix* gute hemmende Effekte bzgl. der beiden Isoenzyme der

Cyclooxygenase gezeigt, wobei der Dichlormethanextrakt noch bessere Wirkung als der *n*-Hexanextrakt aufwies. Der dünnschichtchromatographische Vergleich der *n*-Hexan-, Dichlormethan-, Methanol- und Wasserextrakte ließ erkennen, dass sich die beiden lipophilen Extrakte kaum in ihrer qualitativen Zusammensetzung unterscheiden. Quantitativ traten jedoch im Dichlormethanextrakt die etwas polaren Substanzen im Rf-Bereich von 0,5 - 0,6 mehr in den Vordergrund (Abbildung E.1). Mit Methanol als Extraktionsmittel konnte zwar eine gute Ausbeute von 15,6 % erzielt werden, jedoch war die inhibitorische Wirkung auf die Prostaglandin-H-Synthase sehr schwach. Im Laufmittel **FMC1** (Toluol : Ethylacetat : Eisessig 80:15:5) konnte weder für den methanolischen noch für den wässrigen Extrakt eine Auftrennung erreicht werden.

Wurde die Droge direkt mit Dichlormethan extrahiert, unterschied sich auch dieser Extrakt von den lipophilen, sukzessiven Auszügen hauptsächlich in der Quantität und nicht in der qualitativen inhaltlichen Zusammensetzung.

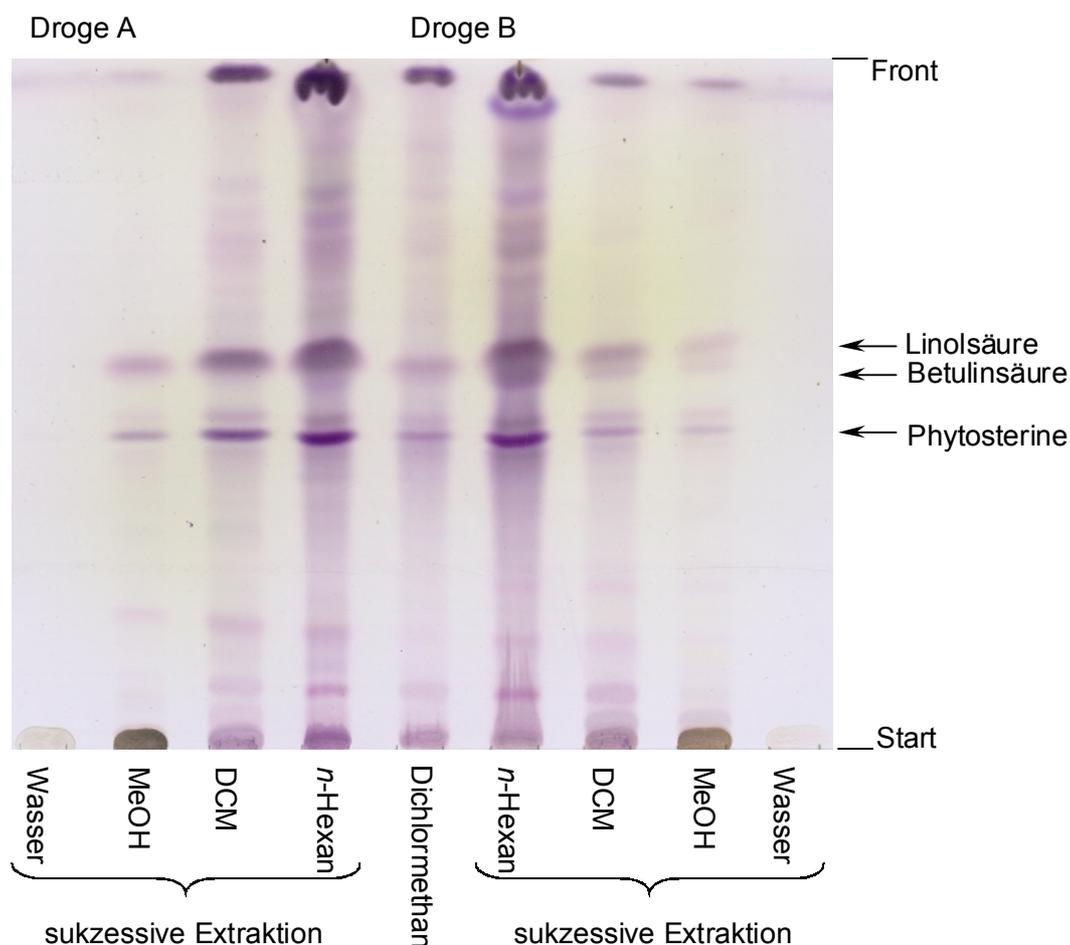


Abbildung E.1: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Extrakte von *Platycodi radix* der Drogenmuster A und B (FMC1, Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; VIS)

2.1.2. HPLC-Fingerprintanalyse und Vergleich unterschiedlich lipophiler Extrakte

Sowohl im HPLC-Chromatogramm des *n*-Hexanextraktes als auch in dem des Dichlormethanextraktes dominierte ein Peak, der bei ca. 90 % Acetonitril ($R_t = 35,07$ min; Methode **Platy**) eluiert wurde. Zwei weitere Peaks bei ca. 32,50 und 33,13 min waren in beiden Extrakten vorhanden. Der mit Dichlormethan direkt hergestellte Extrakt (Abbildung E.1) enthielt noch einige Substanzen, die gleich zu Beginn des Laufes erschienen. Die Peaks wurden ausschließlich bei 200 nm erfasst. Bei 254 nm waren die gemessenen Absorptionen so niedrig, dass ausgeschlossen werden konnte, dass die Inhaltsstoffe der Extrakte konjugierte Doppelbindungen oder andere chromophore Gruppen besaßen. Die online aufgenommenen UV-Spektren zeigten für die Substanzen wie erwartet Endabsorptionen.

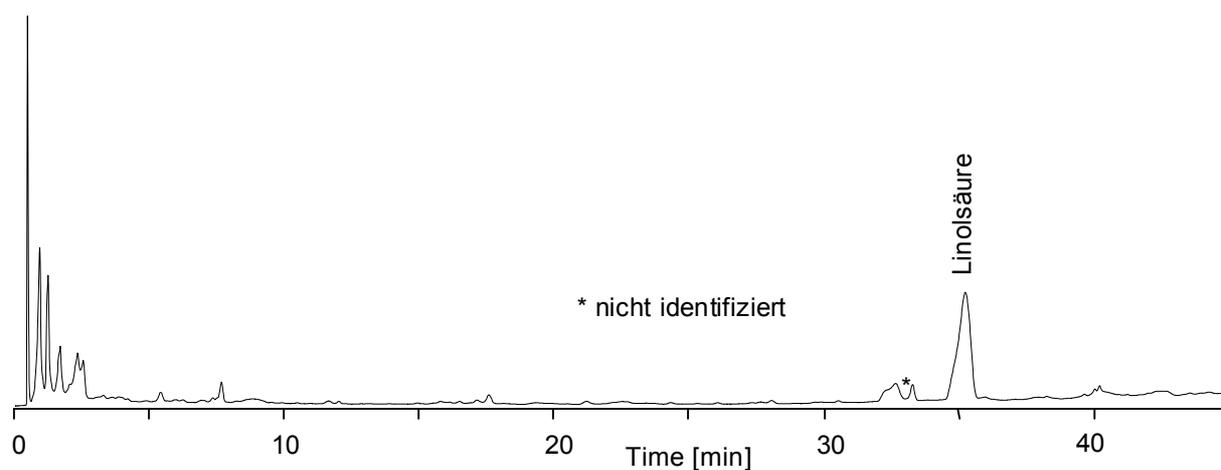


Abbildung E.1: HPLC-Chromatogramm des direkt gewonnenen Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix* (Drogenmuster A) (Methode **Platy**)

2.2. Extraktion mit Dichlormethan und Fraktionierung

Aufgrund der niedrigen Ausbeute von 0,5 bzw. 0,1 % für die lipophilen sukzessiv gewonnenen Extrakte und der Ergebnisse aus den pharmakologischen Tests, lag es nahe, den direkt gewonnenen **Dichlormethanextrakt** genauer zu untersuchen. Dieser Extrakt zeigte sehr gute hemmende Eigenschaften auf die PGHS-Isoenzyme -1 und -2. Die chromatographischen Untersuchungen hatten außerdem ergeben, dass innerhalb der verschiedenen, lipophilen Extrakte hauptsächlich quantitative Unterschiede in der Inhaltsstoffzusammensetzung bestanden. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb eine größere Menge Droge erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert, wodurch mit 0,86 % eine signifikant höhere Ausbeute erreicht wurde. Der Extrakt wurde eingengt und unter

n-Hexan bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert, um eventueller Zersetzung vorzubeugen.

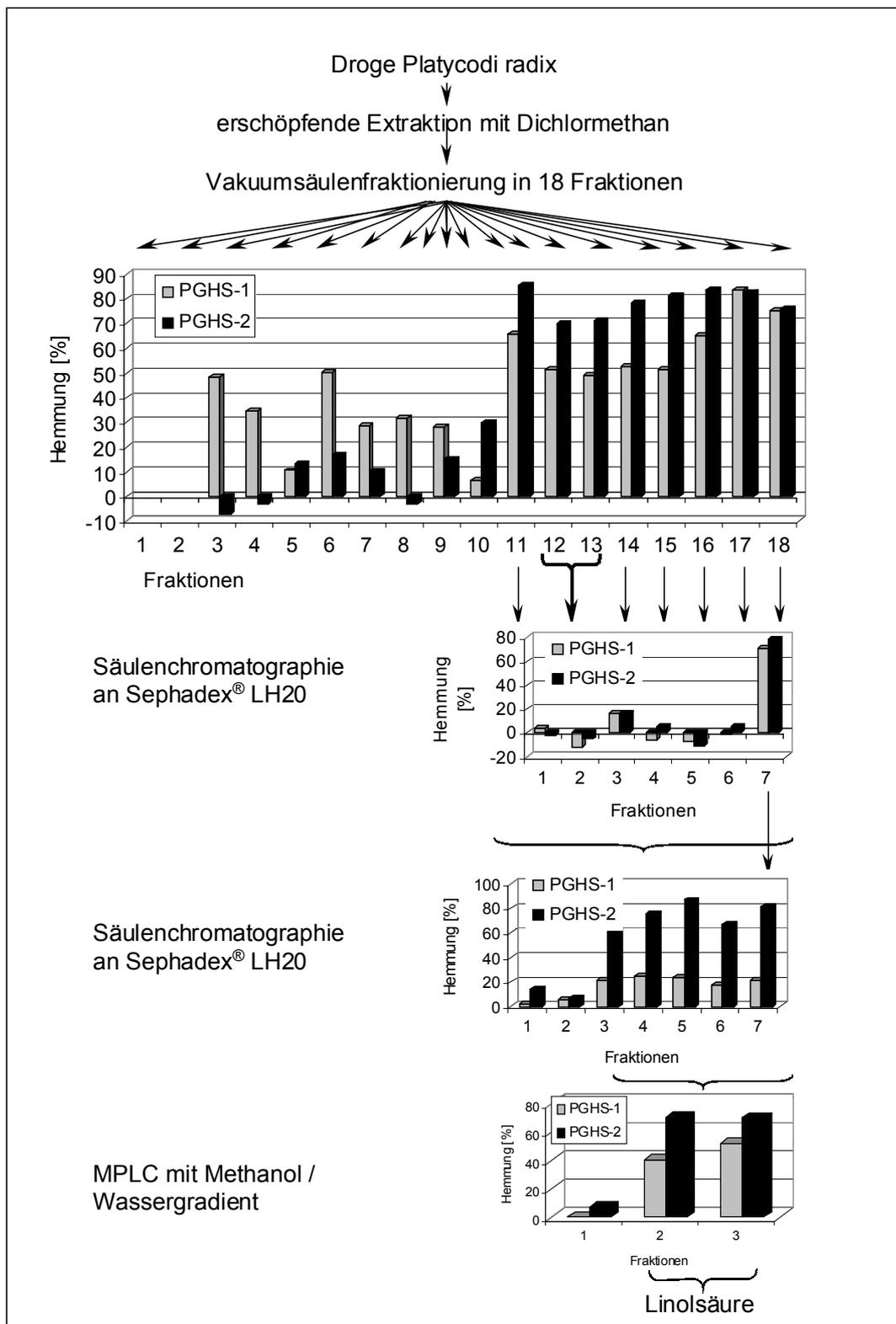


Abbildung E.1: Wirkungsorientierte Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Drogenmuster A*

Die anschließende Fraktionierung erfolgte wirkungsorientiert, d.h. es wurden alle Fraktionen nach säulenchromatographischer Trennung in den PGHS-1/-2 Screening-Assays eingesetzt. Inhibitorisch aktive Fraktionen wurden weiter bearbeitet (Abbildung E.1).

Zunächst wurde der Dichlormethanextrakt durch Vakuumflüssigchromatographie (VLC) an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetat-Mischungen steigender Polarität in 16 Fraktionen aufgetrennt. Diese wurden nach pharmakologischer Testung weiter fraktioniert. Bei den Fraktionen **11** bis **15** war ein Hauptinhaltsstoff so dominant, dass eine weitere Auftrennung nicht notwendig erschien, sondern dieser Bestandteil direkt isoliert werden konnte.

2.3. Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus dem Dichlormethanextrakt

Die Hauptkomponente der Fraktionen **11** bis **15** wurde durch säulenchromatographische Reinigungen über Sephadex® LH20 mit Dichlormethan und zuletzt mittels MPLC auf RP18 Material mit einem Methanol/Wassergradienten von den verbliebenen Begleitstoffen befreit (Abbildung E.1). Die Identität wurde über Cochromatographie mit authentischer Substanz und NMR-Spektroskopie bestätigt.

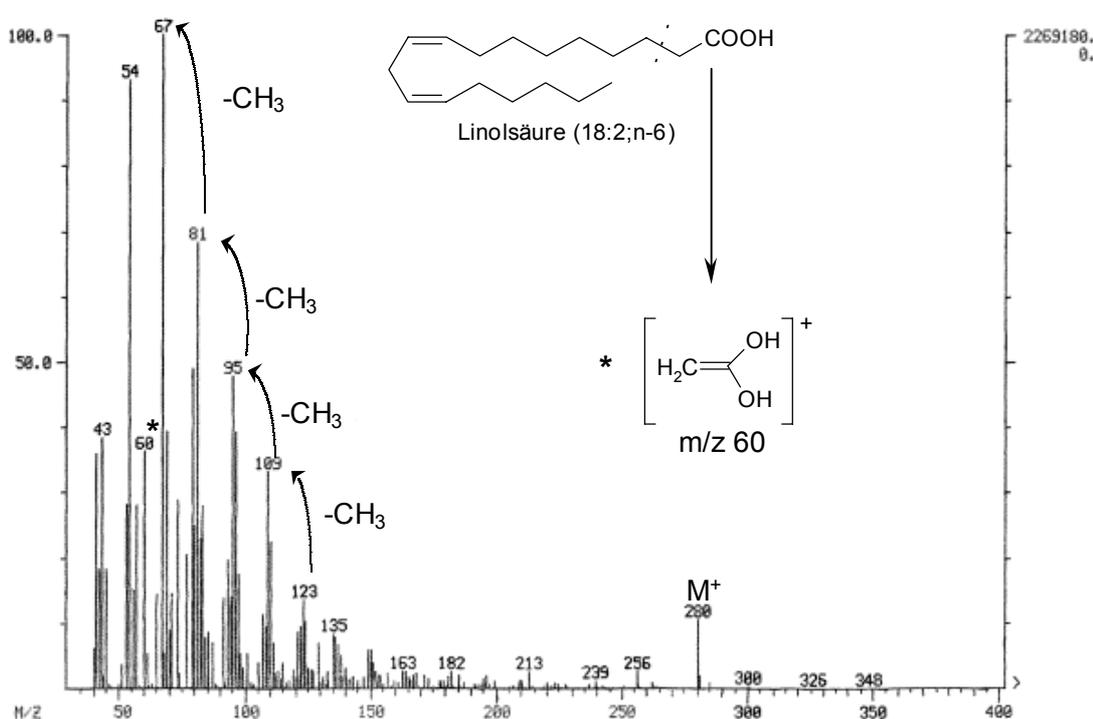


Abbildung E.1: EI-MS von Linolsäure

Die Substanz besaß ein Molekulargewicht von 280. Sie war nicht GC-gängig, und ihr Massenspektrum wurde deshalb über Direkteinlass am Massenspektrometer vermessen. Mit Hilfe des Massenspektrums konnte die Substanz als **Linolsäure** identifiziert werden.

Aus Fraktion **9** kristallisierte der Hauptbestandteil in feinen weißen Nadeln aus. Nach gaschromatographischer Trennung ließen sich in den Kristallen über Cochromatographie mit authentischen Substanzen und Vergleich der Massenspektren drei Stoffe identifizieren (Abbildung E.2). Es handelte sich um die Phytosterole **α -Spinasterol**, **Δ 7-Stigmastenol**, **Campesterol**. Das reiche Vorkommen von Phytosterolen war bereits für *Platycodi radix* beschrieben worden (PAULUS et al., 1987).

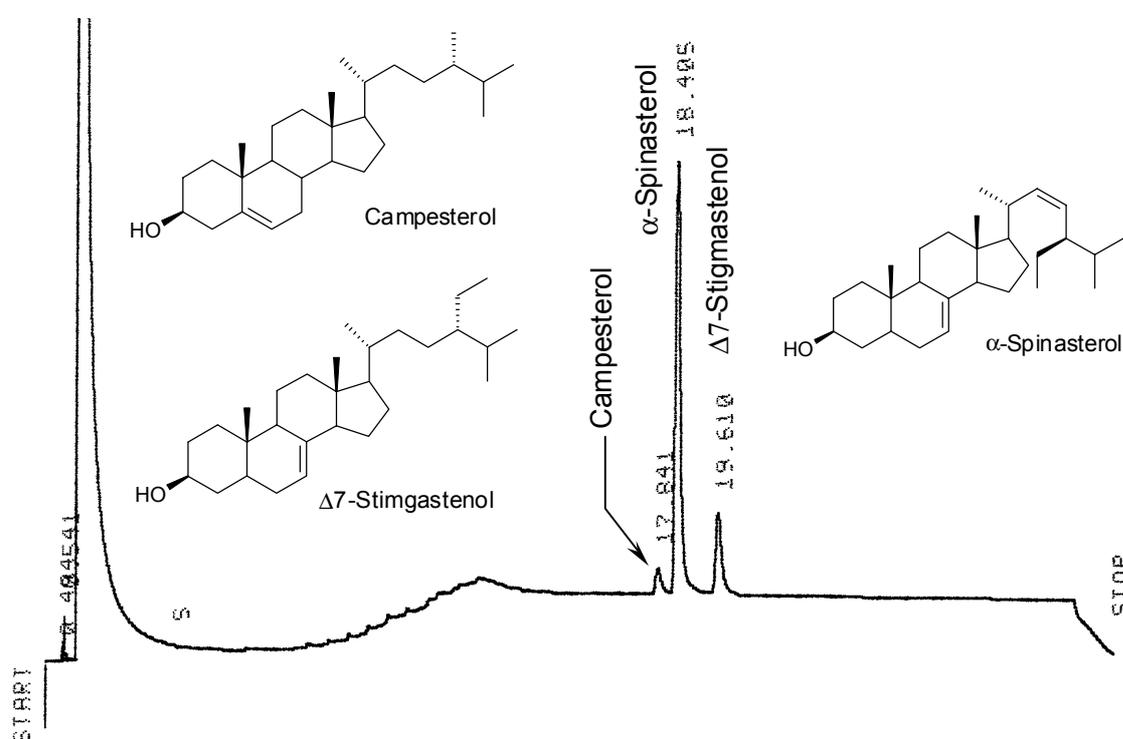


Abbildung E.2: Gaschromatogramm der Phytosterole aus *Platycodi radix* (FID-Detektion)

Über DC- und HPLC-Cochromatographie konnte in Fraktion **7** **Betulinsäure** identifiziert werden.

Da in den meisten bisherigen Untersuchungen die in der Droge enthaltenen **Saponine** als wirksames Prinzip beschrieben wurden, wurde die Anwesenheit dieser Stoffklasse auch in den lipophilen Extrakten geprüft. Ein „Schaumtest auf Saponine“ nach der Monographie des Japanischen Arzneibuches *JAP XI* (The Pharmacopoeia of Japan, 1986) mit dem Dichlormethanextrakt verlief negativ. Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung mit dem speziell für Saponine geeigneten Laufmittel Chloroform : Methanol : Eisessig : Wasser

60:32:12:8 und einem Standardsaponingemisch (Saponin *RN*, DAB 1996), sowie Aescin, Glycyrrhizinsäure und Oleanolsäure als Referenzsubstanzen zeigte nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, dass der Hauptteil der Inhaltsstoffe des Dichlormethanextraktes an die Laufmittelfront lief. Nur sehr geringe Mengen von hydrophilen Bestandteilen wurden zwischen $R_f = 0,5$ und $0,9$ detektiert. Glykosilierte Verbindungen wie Saponine sollten im R_f -Bereich zwischen $0,05$ und $0,18$ erscheinen. In diesem Bereich konnten jedoch für den vorliegenden Extrakt keine Zonen detektiert werden. Somit war eindeutig, dass der Dichlormethanextrakt keine Saponine enthielt. Aglyka wie beispielsweise Oleanolsäure erschienen bei $R_f = 0,95$ und waren im Extrakt nachweisbar.

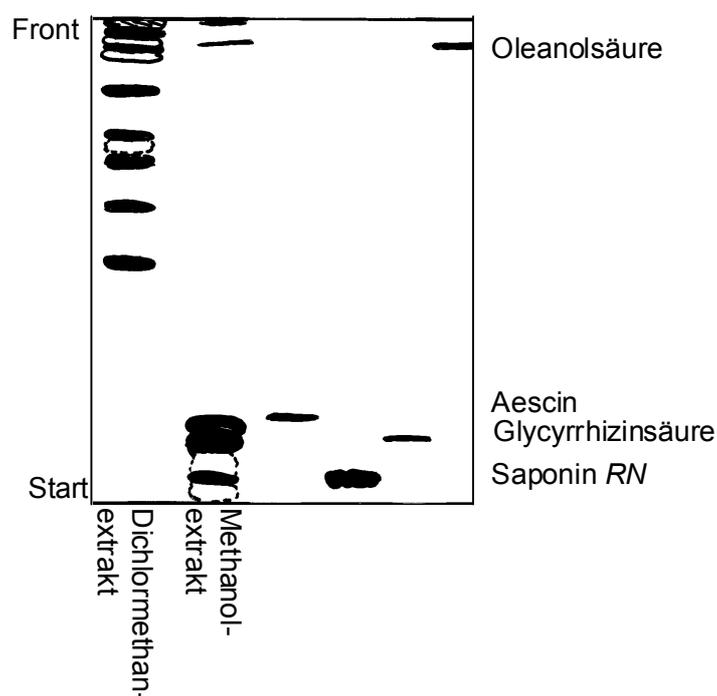


Abbildung E.3: DC-Prüfung auf die Anwesenheit von Saponinen im Dichlormethanextrakt (FMS6; Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; VIS)

2.4. Quantifizierung der Fettsäuren

Aus den wirksamen Fraktionen war als Hauptkomponente Linolsäure isoliert und als pharmakologisch aktive Verbindung identifiziert worden. Deshalb schien es sinnvoll, diese Verbindung auch zu quantifizieren. Eine einfache gaschromatographische Methode nach VAN WIJNGAARDEN (1967), abgewandelt von ZSCHOCKE (1998) erlaubte neben Linolsäure weitere Fettsäuren in Form ihrer Methylester gaschromatographisch zu bestimmen (siehe Kapitel H 2.6.). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des internen Standards Myristinsäure, die nur in sehr wenigen Pflanzen in ungebundener Form vorliegt. Alle Ergebnisse wurden durch Dreifachbestimmungen ermittelt. Der Fettsäuregehalt wurde für

verschiedene aus *Platycodi radix* hergestellte Extrakte aus zwei unterschiedlichen Lieferungen bestimmt. Tabelle E.1 zeigt die Ergebnisse der Bestimmungen für die direkt gewonnenen Dichlormethanextrakte (DCMD) sowie die sukzessiv hergestellten Extrakte der Drogencharge B.

*Tabelle E.1: Fettsäuregehalt in verschiedenen Extrakten aus *Platycodi radix* (Fettsäureanteil in % am getrockneten Extrakt)*

Probe	Linolsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Öl-/ α -Linolensäure
106 A DCMD	20 %	7 %	0,7 %	-
106 B DCMD	11 %	4 %	0,8 %	-
106 B Hex	9,5 %	4,5 %	-	-
106 B DCM	3 %	2 %	-	-
106 B MeOH	-	-	-	-

Bei der Droge **A** (Lieferung aus Kötzing, Aug. 1997) bestand demnach über ein Viertel des Extraktes aus Fettsäuren, wobei Linolsäure mit einem Anteil von 20 % überwog. Ölsäure und α -Linolensäure konnte in keinem Extrakt detektiert werden. Der Linolsäuregehalt der verschiedenen Drogenmuster schwankte stark. In einer zweiten Lieferung, ebenfalls aus Kötzing (Droge **B**), konnten statt 20 % nur 11 % Linolsäure gefunden werden. Dieser Extrakt enthielt auch eine deutlich geringere Menge an anderen Fettsäuren. Der Vergleich von freien Fettsäuren und Gesamtfettsäuregehalt (freie und gebundene Fettsäuren) (siehe Kapitel **H** 2.6.) ergab kaum Konzentrationsunterschiede bezüglich Linolsäure (19,7 % vs. 23,2 %; 10,8 % vs. 10,6 %). Damit war bei den anschließenden pharmakologischen Untersuchungen eine weitere Unterscheidung zwischen freier und gebundener Linolsäure nicht notwendig.

Ungesättigte Fettsäuren waren bereits als kompetitive Inhibitoren der PGHS bekannt (LANDS et al., 1973). Vielfach war auch beschrieben worden, dass PGHS-2 effektiver im Vergleich zur PGHS-1 auch andere Fettsäuren außer Arachidonsäure als Substrate umsetzt. Dies wird durch den weiteren Kanal zum aktiven Zentrum der PGHS-2 begünstigt (LANEUVILLE et al., 1995; BRUNE et al., 1999; OTTO et al., 1995). Die pharmakologischen Untersuchungen wurden deshalb speziell darauf ausgerichtet, zu entscheiden, wieviel Einfluss der Fettsäuregehalt auf die Wirkung des Extraktes in dem PGHS-1/-2 Screeningtestsystem besaß.

2.5. Pharmakologische Untersuchungen

Während der Isolierungsarbeiten wurden alle Extrakte und phytochemisch wichtigen Fraktionen in den PGHS-1/-2 Screening-Assays im Hinblick auf ihr (präferentiell PGHS-2) inhibitorisches Potential getestet. Es wurden bevorzugt die Fraktionen weiterbearbeitet, die wirksame Bestandteile enthielten (vgl. Abbildung E.1).

2.5.1. Wirkung der Extrakte und Fraktionen in den PGHS-1/-2 Screening-Assays

Im Drogenscreening (Kapitel D) waren bereits die sukzessiv gewonnenen Extrakte der Droge A (Lieferung Kötzing August 1997) beschrieben worden. Die zweite Lieferung aus Kötzing (Droge B) wurde ebenfalls sukzessiv mit *n*-Hexan, Dichlormethan, Methanol und zuletzt mit Wasser extrahiert und vergleichend in den PGHS-Testsystemen eingesetzt. Der Vergleich der beiden Drogen zeigte eindrucksvoll, wie groß der Aktivitätsunterschied zwischen zwei Drogenmustern sein kann (Abbildung E.1). Während der Dichlormethanextrakt der Droge A eine sehr starke Wirkung ($70 \pm 7\%$) besaß, war der Dichlormethanextrakt von Droge B nur mäßig wirksam (10-20 %). Der *n*-Hexanextrakt von Droge A war jedoch weniger potent als der von Droge B (signifikant für PGHS-2). Die Wirkunterschiede aller Extrakte im Bezug auf die PGHS-1 und PGHS-2 waren nur gering. Bei den einzelnen Drogenmustern unterschieden sich für den jeweiligen Extrakt die Hemmwerte nicht statistisch signifikant (T-Test). Dünnschichtgraphische Untersuchungen hatten keine qualitativen Unterschiede zwischen den Drogenmustern erkennen lassen. Die Quantifizierung der Fettsäuren hatte jedoch eine große Differenz beim Linolsäuregehalt ergeben. Da aus allen wirksamen Fraktionen Linolsäure isoliert worden war, lässt sich vermutlich der markante Wirkungsunterschied, der bei der sukzessiven Extraktion zu erkennen war, auf diese Differenz zurückführen.

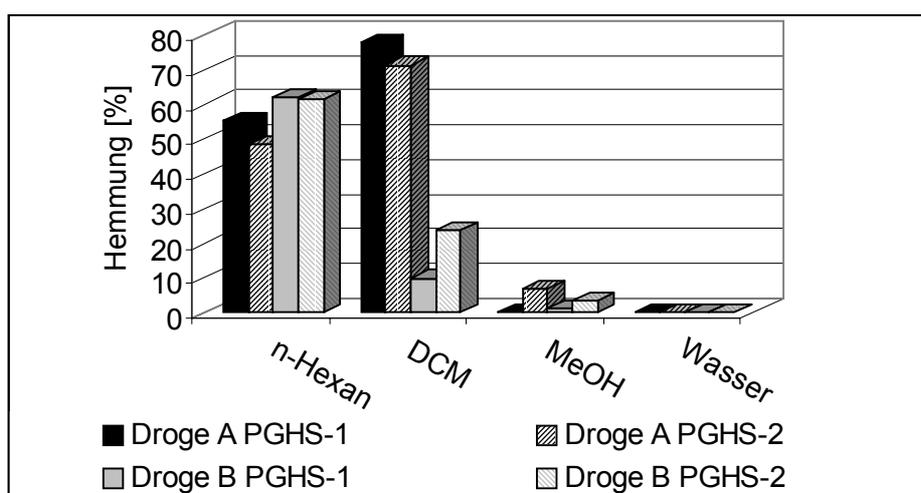


Abbildung E.1: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von sukzessiv hergestellten Extrakten zweier Drogenmuster von *Platycodi radix*

Bei beiden Drogenmustern konnte erkannt werden, dass der Schwerpunkt der Wirkung im lipophilen Bereich der Inhaltsstoffe lag. Aus diesem Grund wurde das trockene Drogenmaterial für weitere Untersuchungen direkt mit Dichlormethan extrahiert und dieser Extrakt ebenfalls in den PGHS-1/-2 Screening-Assays untersucht.

In Kapitel **D** waren bereits Ergebnisse aus den Screeningversuchen zum direkt mit Dichlormethan hergestellten Extrakt (DCMD) aus *Platycodi radix* vorgestellt worden. Die untersuchte Drogencharge **A** hatte hohe inhibitorische Wirkung mit IC_{50} -Werten von 17,6 $\mu\text{g/ml}$ (PGHS-1) und 4,0 $\mu\text{g/ml}$ (PGHS-2) gezeigt. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes des Drogenmusters **B** zeigte zwar ebenfalls deutliche Präferenz für das induzierbare Isoenzym, erreichte jedoch mit IC_{50} -Werten von 77,7 $\mu\text{g/ml}$ (PGHS-1) und 15,7 $\mu\text{g/ml}$ (PGHS-2) nicht die Wirkstärke des Drogenmusters **A**. Für die Drogenchargen **A** bzw. **B** ergaben sich Hemmwertverhältnisse (PGHS-1/PGHS-2) von 4,4 bzw. von 5,0. Die Vermutung, dass der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren für die Wirkung der Droge eine große Rolle spielte, wurde durch diese Befunde erhärtet. Drogencharge **A** enthielt deutlich größere Mengen Fettsäuren, insbesondere Linolsäure, als Drogencharge **B** (vgl. Abschnitt 2.4).

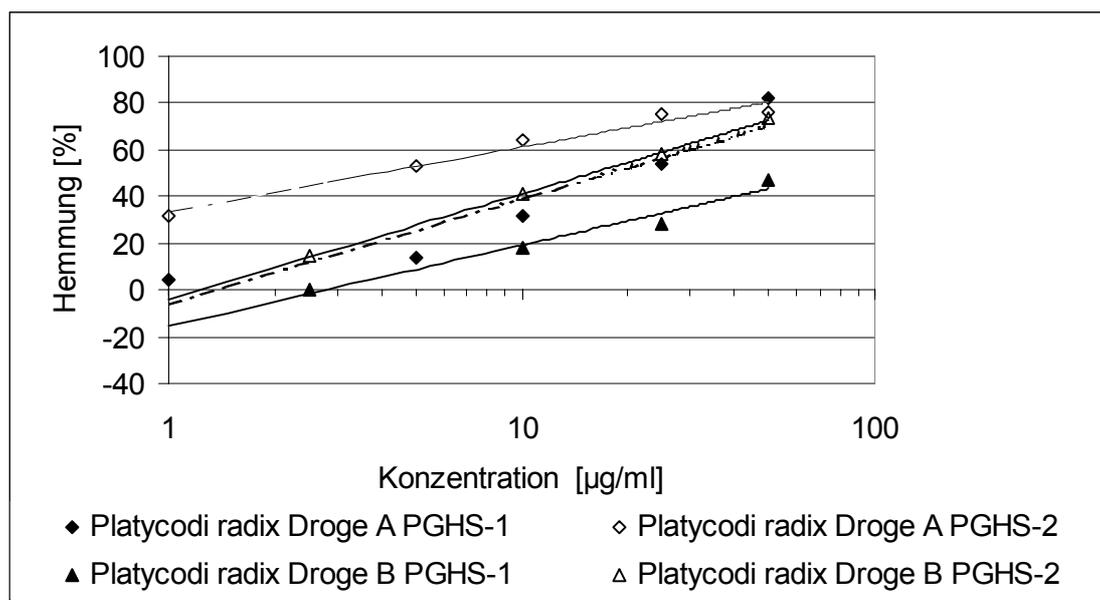


Abbildung E.2: Vergleichende IC_{50} -Bestimmung der Dichlormethanextrakte der beiden *Platycodi radix* Muster A und B

Nach Auftrennung des Dichlormethanextraktes (Droge **A**) durch Vakuumflüssigchromatographie (VLC) an Kieselgel mit *n*-Hexan/Ethylacetatmischungen steigender Polarität wurden die 18 erhaltenen Fraktionen im pharmakologischen Screening in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Die Fraktionen **1-3** wurden nach dünnschichtchromatographischer Prüfung

wegen der gleichen Inhaltsstoffmuster zum Screening vereint. Abbildung E.3 zeigt die Hemmeigenschaften und jeweiligen Ausbeuten für jede einzelne Fraktion.

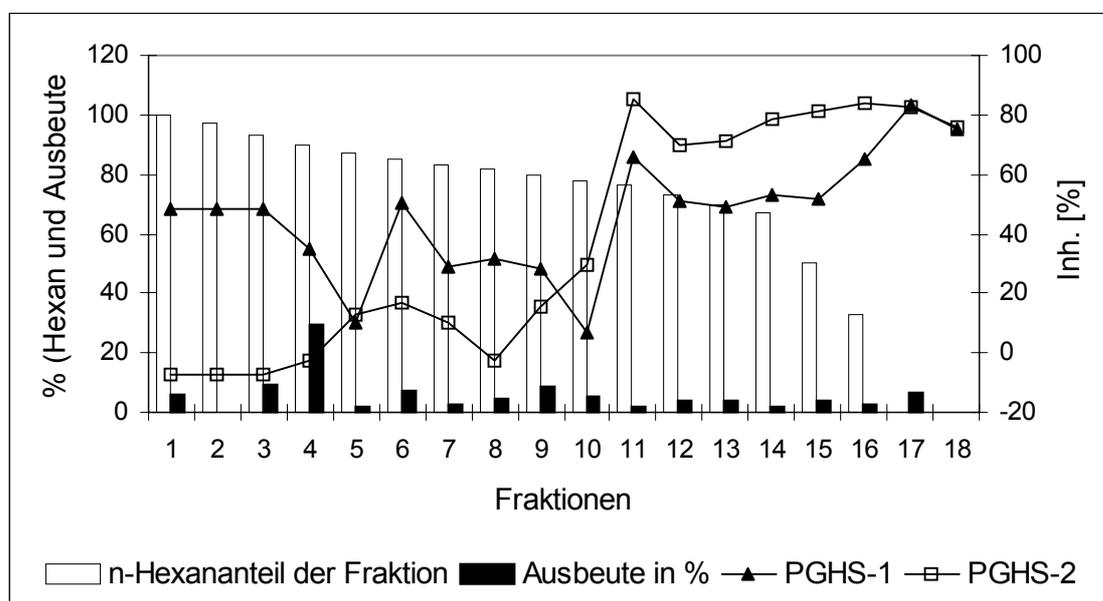


Abbildung E.3: Hemmwirkung der Fraktionen des Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix* (Drogenmuster A) (Testkonzentration: je 50 µg/ml)

Die Fraktionen **1-9** hemmten die PGHS-1 stärker als die PGHS-2. Die durchschnittliche Wirkstärke war aber mit ca. 30 % für PGHS-1 und < 20% für PGHS-2 nur mäßig. Ab Fraktion **10** kehrte sich dieses Verhältnis um. Die Wirkung auf die PGHS-2 dominierte nun. Beide Enzyme wurden durch die Fraktionen **11-18** deutlich gehemmt. Diese Fraktionen wurden wirkungsorientiert weiter bearbeitet (vgl. Abbildung E.1). Als Hauptbestandteil wurde aus allen wirksamen Fraktionen Linolsäure isoliert. Fraktionen, die keine Linolsäure enthielten, zeigten in allen Screeningversuchen nur sehr schwache Wirkung.

Aus Fraktion **8-10** wurden Phytosterole isoliert. Das inhibitorische Potential dieser Fraktionen lag bei ca. 30 %. Das gereinigte Phytosterolmischkristallisat zeigte in einer Testkonzentration von 50 µg/ml jedoch nur gegenüber der PGHS-1 eine 29,9 %ige Hemmung, die PGHS-2 wurde nicht beeinflusst (0 % Hemmung).

2.5.2. Wirkung der Fettsäuren im PGHS-1/-2 Screening-Assay

Linolsäure war während der Fraktionierung als wirkungsbestimmender Bestandteil vermutet worden. Da ungesättigte Fettsäuren bereits als kompetitive Hemmstoffe der PGHS bekannt waren und im Dichlormethanextrakt Linolsäure in großer Menge enthalten war, schien es

besonders wichtig, die Wirkung dieser Verbindungen in unseren PGHS-1/-2 Screening-Assays zu bestimmen.

Linolsäure und α -Linolensäure erwiesen sich dabei als starke und spezifische PGHS-2 Inhibitoren. Ölsäure besaß nur mäßige Wirkung, hemmte aber beide Enzyme gleichermaßen. Palmitin- und Stearinsäure beeinflussten beide Enzyme bis zu einer Konzentration von 200 μ M nur unwesentlich (Hemmung <20 %). Linolsäure zeigte in diesem Test die stärkste Selektivität für das induzierbare Isoenzym.

Tabelle E.1: IC_{50} -Werte der Fettsäuren im PGHS-1/-2 Screening-Assay

IC_{50}-Wert	PGHS-1	PGHS-2	PGHS-1/PGHS-2 Ratio
Linolsäure	19,8 μ M	2,6 μ M	7,6
α -Linolensäure	21,2 μ M	3,0 μ M	7,1
Palmitinsäure	-	-	-
Stearinsäure	-	-	-
Ölsäure	124,5 μ M	122,6 μ M	1,0

Linolsäure und α -Linolensäure hemmen die PGHS-2 kompetitiv und sind somit ebenfalls Substrate für das Enzym (LANEUVILLE et al., 1995). Aus ihrer Umsetzung entsteht jedoch nicht PGE_2 , wie aus Arachidonsäure, sondern es entstehen 13-Hydroxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure (13-HODE) oder 9-HODE bzw. 12-Hydroxy-(9Z,13E/Z,15Z)-octadecatriensäure (12-HOTE). Diese Stoffe können nicht mit dem PGE_2 -EIA detektiert werden. Es wird so trotz Enzymaktivität eine Hemmung der PGE_2 -Bildung beobachtet.

2.5.3. Wirkung von Platycodin D und Platycodin D3

Die beiden Saponine Platycodin D und Platycodin D3 (Strukturformeln siehe Abschnitt 1.3, ISHII et al., 1978b) waren nicht im Dichlormethanextrakt der untersuchten Drogen enthalten (vgl. Abschnitt 2.3). Trotzdem schien ihre Testung interessant, da sie aus dem Methanolextrakt der Droge *Platycodi radix* isoliert und in der Literatur mehrfach als Wirkprinzip genannt worden waren (LEE et al., 1999). Platycodin und Platycodin D3 wurden in einer Konzentration von 50 μ g/ml in den PGHS-1/-2 Screening-Assays eingesetzt. Ihre Löslichkeit in Ethanol p.A. war sehr gering, so dass die Proben lange mit Ultraschall behandelt werden mussten. Platycodin löste sich dadurch vollständig, Platycodin D3 konnte

nicht vollständig in Lösung gebracht werden. Vor dem Test wurden die ungelösten Bestandteile deshalb jeweils resuspendiert.

Platycodin zeigte mit 17,6 % im PGHS-2 Test nur eine sehr geringe Beeinflussung des Enzyms. Die PGHS-2 Testung von Platycodin D3 und die PGHS-1 Untersuchungen beider Substanzen verliefen ohne messbare Hemmung (= 0 %) eines der Isoenzyme.

2.5.4. Korrelation zwischen Extraktwirkung und Linolsäuregehalt

Die pharmakologischen Untersuchungen aus den Abschnitten 2.5.1 und 2.5.2 hatten gezeigt, dass sowohl besonders starke inhibitorische Aktivität als auch PGHS-2 Selektivität vor allem in den Fraktionen zu finden war, in denen Linolsäure die Hauptkomponente darstellte. Fraktionen, in denen keine Linolsäure enthalten war, hatten kaum Wirkung auf die PGHS-2 gezeigt. Reine Linolsäure hatte sich als potenter und selektiver Wirkstoff im PGHS-1/-2 Screening-Assay erwiesen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde ein Vergleich zwischen der Wirkung des Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix* und reiner Linolsäure gezogen. Dazu wurde errechnet, welche Menge Extrakt welcher Menge Linolsäure entsprach. Die molare Einsatzmenge von Linolsäure wurde dabei umgewandelt in die entsprechende Einsatzmenge an Dichlormethanextrakt mit Angabe in $\mu\text{g/ml}$. Die Graphen der IC_{50} -Bestimmungen des Extraktes (Droge A) und von Linolsäure (umgerechnet in entsprechende Extraktmenge) wurden in der folgenden Graphik (Abbildung E.1) zusammen aufgetragen.

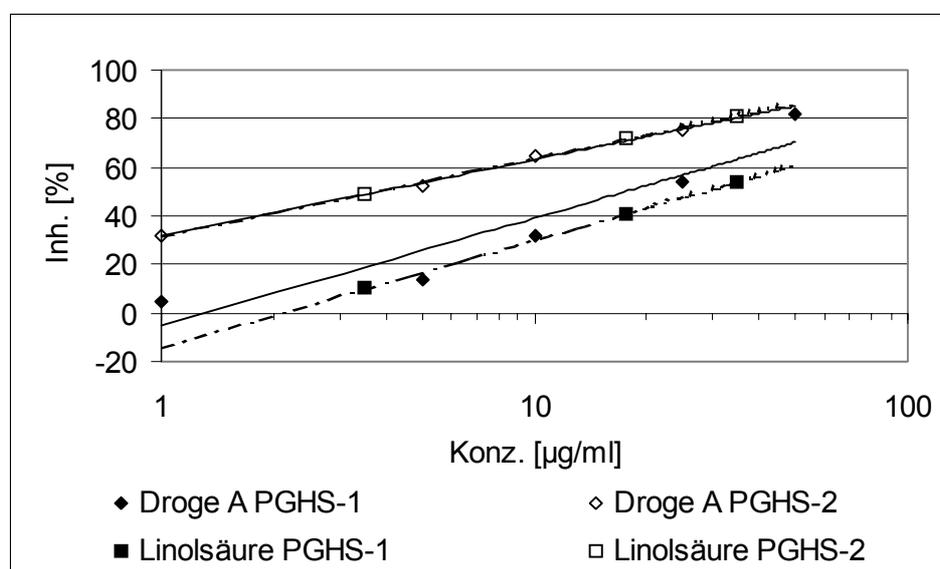


Abbildung E.1: Vergleich der Hemmeigenschaften eines Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix* (Drogenmuster A) und Linolsäure (Konz. entspricht der jeweiligen Extraktmenge)

Hinsichtlich PGHS-2 war Linolsäure in diesem Dichlormethanextrakt offenbar das einzige wirksame Prinzip. Die Kurven ließen sich vollkommen zur Deckung bringen. Kein anderer Inhaltsstoff außer Linolsäure beeinflusste die Hemmung des induzierbaren Isoenzym. PGHS-1 wurde hingegen durch den Dichlormethanextrakt stärker gehemmt als durch die entsprechende Menge reine Linolsäure. Dies bedeutet, dass weitere Inhaltsstoffe die Hemmwirkung auf das konstitutive Isoenzym verstärkten. In Frage dafür kamen beispielsweise die Phytosterole, die ebenfalls in großer Menge im Extrakt zu finden waren und in einer Konzentration von 50 µg/ml die PGHS-1 zu 29,9 % hemmten.

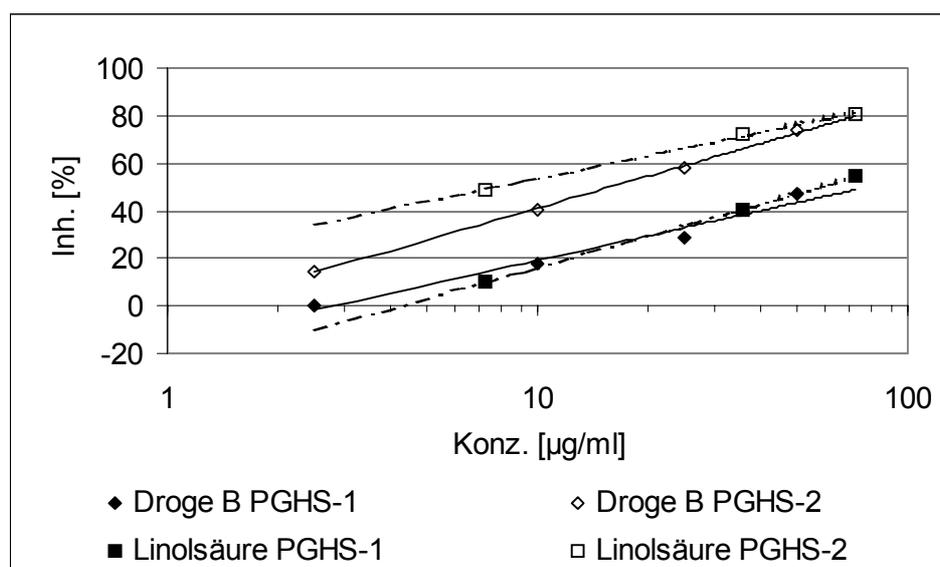


Abbildung E.2: Vergleich der Hemmeigenschaften eines Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix* (Drogenmuster **B**) und Linolsäure (Konz. entspricht der jeweiligen Extraktmenge)

Wurde die hemmende Wirkung der Linolsäure mit den hemmenden Eigenschaften des Dichlormethanextraktes der Drogencharge **B** verglichen; ergab sich ein anderes Bild (Abbildung E.2). Drogenmuster **B** enthielt nur etwa die Hälfte an Linolsäure wie Drogenmuster **A** und hatte dementsprechend deutlich geringere Hemmeigenschaften im Test gezeigt. Die Hemmung des Extraktes erreichte im PGHS-2 Test jedoch nicht die Wirkung, die aufgrund des Gehaltes an Linolsäure möglich wäre. Als Erklärung hierfür kommen beispielsweise Diffusions- und Verteilungsphänomene in Betracht: bei Linolsäure handelt es sich um einen kompetitiven Hemmstoff, der die Aktivität des Enzyms nicht einschränkt, sondern Linolsäure als alternatives Substrat umsetzt. Die Hemmung ist deshalb abhängig von der möglichen Diffusion der Linolsäure in den Kanal der PGHS zum aktiven Zentrum. Bei der Messung der Extrakthemmung bei niedrigen Einsatzmengen und damit einem geringen Gehalt an Linolsäure kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch den großen Überschuss an Arachidonsäure im Test noch im linearen Bereich gemessen wurde. Es könnten deshalb

Abweichungen entstehen. Bei höheren Konzentrationen erreichte nämlich der Extrakt die Hemmwirkung der Linolsäure.

Die Hemmwirkung gegenüber der PGHS-1 des Dichlormethanextrakt von Droge **B** entsprach in etwa der Hemmwirkung der enthaltenen Linolsäure. Betrachtete man die unterschiedlichen Steigungen der Geraden, so wurde jedoch auch bei dieser Drogencharge erkennbar, dass weitere hemmende Stoffe im Dichlormethanextrakt enthalten sein mussten, die PGHS-1 stärker als PGHS-2 beeinflussten.

3. Diskussion

Die getrockneten Wurzeln von *Platycodon grandiflorum* dienen in der traditionellen chinesischen Medizin vor allem zur Behandlung von Lungenleiden. Der direkt mit Dichlormethan hergestellte Extrakt (DCMD) hatte sehr gute Wirkung und Selektivität gegenüber der PGHS-2 gezeigt ($IC_{50\text{ PGHS-1}}$ 17,6 µg/ml; $IC_{50\text{ PGHS-2}}$ 4,0 µg/ml) und somit ein interessantes pharmakologisches Potential angedeutet. Wirkungsorientierte Fraktionierung des DCMD-Extraktes ergab, daß nur Fraktionen, die Linolsäure enthielten, hemmende Eigenschaften auf die PGHS-Isoenzyme zeigten. Linolsäure hemmte mit einer Präferenz von 7,6 :1 bevorzugt die PGHS-2. Fraktionen mit anderen Komponenten zeigten kaum Wirkung auf die PGHS-2 und nur geringen Einfluß auf die PGHS-1. Die ungesättigte Fettsäure Linolsäure war damit der Wirkungsträger des Extraktes und konnte auch die präferentielle *in vitro* Hemmwirkung auf die Prostaglandin-H-Synthase erklären.

Es ist bekannt, daß ungesättigte Fettsäuren zum Teil deutlich bessere Substrate für die PGHS-2 als für PGHS-1 *in vitro* darstellen, und es dadurch zu einer Hemmung der PGE₂ Synthese kommen kann (LANEUVILLE et al., 1995; OTTO et al., 1995; BRUNE et al., 1999). LANEUVILLE bestimmte für beide Enzyme die Effizienz für die Oxygenierung verschiedener Fettsäuresubstrate. Sie nimmt in folgender Reihenfolge ab: Arachidonsäure > Dihomo-γ-linolensäure > Linolsäure > α-Linolensäure. Während Arachidonsäure von beiden Enzymen gleich gut umgesetzt wird, sind für die PGHS-2 die anderen Fettsäuren mit folgenden Umsetzungsraten die effektiveren Substrate: Eicosatriensäuren (C20:3, n-6) 1,4; Linolsäure 3 und α-Linolensäure 40. Danach müßte in unserem Testsystem der IC_{50} -Wert für α-Linolensäure niedriger liegen als der von Linolsäure. In unserem PGHS-1 und -2 Screeningtestsystem wurde aber mit einem Überschuß an Arachidonsäure gearbeitet. Die Umsatzrate war daher von der Diffusion zum aktiven Zentrum abhängig. Diese ist bei beiden Fettsäuren ähnlich groß. Somit wurden die Hemmverhältnisse (PGHS-1/PGHS-2) mit

7,1 bzw. 7,6 etwa gleich groß errechnet, ebenso die IC_{50} -Werte bei ca. 20 μ M (PGHS-1) und 3 μ M (PGHS-2).

Die Bestimmungen der K_m (Michaelis-Menten-Konstante) für PGHS-1 und -2 mit den jeweiligen Fettsäuren ließ vermuten, daß sowohl Linolsäure als auch α -Linolensäure *in vivo* Substrate der PGHS-2 sein können. Diätetische Untersuchungen erhärten diese Vermutung:

Ungesättigte Fettsäuren, zum Beispiel aus Fischöl,

- schützen vor Herzinfarkt durch ihren günstigen Einfluß auf die Blutfettwerte, verhindern die Thrombozytenaggregation, mindern den Blutdruck und zeigen antiarrhythmische Wirkung (GISSI-Studie, 1999; BROWN, 1999);
- besitzen günstige Effekte bei Rheuma (auf entzündliche und immunologische Prozesse), besonders bei rheumatoider Arthritis (SKÖLDSTAM et al., 1992);
- senken das Risiko für Frühgeburten (OLSEN et al., 2000; AL et al., 2000);
- verbessern in der Transplantationsmedizin die Überlebenszeit eines Transplantats (JUNGMAYR, 1999);
- verbessern die Symptome bei Psoriasis und Neurodermitis (BITTNER et al., 1988);
- schützen vor chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) (BELLUZZI et al., 2000);
- verhindern die Progression Multipler Sklerose (MS), beugen erneuten MS-Schüben vor und schützen vor Alzheimer Erkrankung (SWANK et al., 1990);
- fördern die Hirnleistung und verbessern die Sehschärfe bei Neugeborenen (LUCAS et al., 1992);
- beugen allergischen Erkrankungen durch Behinderung der Bildung von asthmatisch wirkenden Leukotrienen und allergischen IgE-Antikörpern vor (KOCH, 1998);

Diese Studien wurden mit Fischöl- oder Schwarzkümmelölkapseln mit einer Tagesdosis zwischen 1 und 3 g durchgeführt.

Auch in der Sportlernahrung nehmen ungesättigte Fettsäuren einen wichtigen Platz ein. Regeneration und Leistungsfähigkeit werden durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren positiv beeinflusst. Es zeigen sich abhängig vom Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Plasma signifikant weniger Muskelstreß- und Entzündungsreaktionen (KREISELMEYER, 1999).

Diese günstigen Eigenschaften wurden bisher hauptsächlich bei n-3 ungesättigten Fettsäuren beobachtet. Sie unterdrücken die Expression der PGHS-2 auf Zellebene und wirken auch als kompetitive Hemmstoffe der PGHS-2 (CURTIS et al., 2000; LARSEN et al., 1997). Den n-6 ungesättigten Fettsäuren - zu denen Linolsäure gehört - streiten dagegen einige Autoren ihre

positiven antiinflammatorischen Eigenschaften ab (JAMES et al., 2000). Durch Elongasen und Desaturasen können Linolsäure und andere n-6 ungesättigte Fettsäuren in Arachidonsäure umgewandelt werden und damit die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren verstärken. Die entsprechenden Enzyme zur Umwandlung sind jedoch nicht in allen Geweben enthalten (z.B. nicht in der Haut und im Muskelgewebe), so daß hier Linolsäure für die Prostaglandin-H-Synthase ebenso wie für die 15-Lipoxygenase direkt als Substrat dienen kann. Linolsäure bzw. γ -Linolensäure können hier zu antiinflammatorisch wirkenden 13-HODE, 9-HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) oder PGE₁ umgesetzt werden. Antiinflammatorische Effekte konnten über diesen Mechanismus beispielsweise für die Haut und bei rheumatoider Arthritis beobachtet werden (ZIBOH et al., 2000; BELCH et al., 2000). Auch Tumorzellen und deren Aktivität konnten über den Metaboliten PGE₁ inhibitorisch beeinflusst werden (COLQUHOUN et al., 1998).

Erwünschte Effekte durch Produktion von PGE₂ aus vorher bereits metabolisierter Linolsäure wurden hingegen in der Niere gefunden: die glomeruläre Filtrationsrate wurde gesteigert, das Fortschreiten von Nierenschädigung verlangsamt und der Blutdruck ließ sich dadurch senken. Ebenso wurde die Plättchenaggregation herabgesetzt (SCHREINER et al., 1991).

Aus diesen vielfältigen Wirkungen geht zwar hervor, daß Linolsäure auch *in vivo* ein Substrat für die PGHS ist, doch ist bisher aus der Literatur nicht ersichtlich, ob sie dabei bevorzugt von der PGHS-2 umgesetzt wird, welche Reaktionsprodukte dabei *in vivo* entstehen und ob sich daraus positive antiinflammatorische Eigenschaften ergeben.

Für die Relevanz zur Wirksamkeit von *Platycodi radix* in der TCM müssen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Die traditionelle Zubereitung der Droge ist der Dekokt, in dem hauptsächlich Saponine enthalten sind. Ihr Vorkommen war in den untersuchten Extrakten ausgeschlossen worden und einzelne Komponenten wie Platycodin D und Platycodin D3 hatten keine direkte Hemmung der PGHS-Isoenzyme gezeigt. Die lipophilen Inhaltsstoffe wie Linolsäure sind dagegen nicht im Dekokt enthalten. Doch wird *Platycodi radix* auch als Gemüse verzehrt, wodurch Linolsäure als Nahrungsbestandteil aufgenommen wird (DANERT et al., 1971). Die Menge, die in den pharmakologischen Studien mit ungesättigten Fettsäuren als Tagesdosis untersucht worden war, würde einer *Platycodi radix* Menge von 5-20 g entsprechen. Dies sind realistische Mengen, die auch bei einem Verzehr als Gemüse bzw. Gewürz auftreten können. Da Linolsäure aber in sehr vielen pflanzlichen Produkten enthalten ist (z.B. Schwarzkümmelöl 50-60 %; LAUTENBACHER, 1997), ist diese Wirkqualität nicht *Platycodon* spezifisch, sondern eher allgemeiner Natur. Für die spezielle entzündungshemmende Wirkung von *Platycodon*-Extrakten sind somit eher andere Verbindungen und Mechanismen verantwortlich.

Der hohe Gehalt an Linolsäure in Platycodi radix bedingte in unseren Testsystemen eine starke, kompetitive und selektive Hemmung der PGHS-2. Linolsäure und auch α -Linolensäure sind art- und gattungsübergreifend in vielen Drogen vornehmlich in Samen oder anderen Speicherorganen zu finden. Um für zukünftige Untersuchungen ausschließen zu können, dass die Hemmwirkung der Gesamtextrakte in den PGHS-1/-2 Screening-Assays ausschließlich durch die hemmenden Eigenschaften der ungesättigten Fettsäuren hervorgerufen wird, sollte jedes Drogenscreening auch von einer Fettsäure-Quantifizierung begleitet werden.

F Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu *Chaenomeles fructus* („Mugua“)

1. Allgemeine Einführung

1.1. Beschreibung der Pflanze und der Droge

Im Chinesischen Arzneibuch (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997) wird *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai als Stammpflanze der Droge *Chaenomeles fructus* geführt. Die Gattung *Chaenomeles* wird zur Unterfamilie der Maloideae und dem Tribus der Maleae innerhalb der Familie der Rosaceae gestellt (DANERT et al., 1971). Sie ist damit nahe verwandt mit der Echten Quitte (*Cydonia oblongata*) und der Birne (*Pyrus communis*). Früher wurde sie zu den Quitten gezählt, was zu einer Reihe von Synonymen in der Literatur geführt hat. So existieren noch die Bezeichnungen *Chaenomeles speciosa* Lindl., *Cydonia japonica* Loisel. non (Thunb.) Pers. und *Cydonia lagenaria* Loisel ex Duham (OHWI, 1965; BAYARD, 1981).

Zierquitten (*Chaenomeles sp.*) stammen ursprünglich aus Ostasien. Sie sind sommergrüne Büsche oder Bäume, teilweise mit dornigen Zweigen. Sie bilden oft Stockausschläge mit wechselständigen, gekerbten oder gezähnten Blättern. Die Blüten stehen einzeln oder gebüschelt. Im zeitigen Frühjahr entfalten sie sich unmittelbar am Sproß leuchtend rot (URANIA, 1971).

Chaenomeles speciosa (Sweet) Nakai ist ein buschiger Strauch mit scharlachroten leuchtenden Blüten am alten Holz. Zahlreiche chinesische Malereien verwenden seine Blüten deshalb als Motiv für dekorative Ornamente. Ihre Blütenpracht im zeitigen Frühjahr, die besonders auffällt, da noch keine Blätter ausgetrieben haben, führte zu einer frühen Kultivierung als beliebte Zier- und Heckenpflanze. Winterharte Sorten wurden auch in Nordamerika und Europa eingeführt und zahlreiche Kreuzungen und Züchtungen sind im Handel erhältlich (BAYARD, 1981).

Die Früchte von *Chaenomeles speciosa* entwickeln sich aus einem unterständigen Fruchtknoten. Bei der sich bildenden Scheinfrucht umwächst saftiges Achsengewebe die Fruchtblätter. Die Zierquitte zeigt durch Bildung vielsamiger Karpelle noch enge Beziehungen zur ursprünglichen Unterfamilie der Spiroideae (FROHNE, 1998).



Abbildung F.1: *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai: Blüte, reife Frucht und Droge (aus CHEN, 1997; WU et al., 1993)

Die Früchte sind 4-7 cm groß und länglich rund, grünlich gelb, oft etwas gerötet und aromatisch duftend (KRÜSSMANN, 1960). Zum rohen Verzehr sind sie ungeeignet, da sie zu hart sind. Sie können jedoch aufgrund des Pectinreichtums zur Gelee- und Marmeladenherstellung verwendet werden (SCHORMÜLLER, 1968).

Als Droge *Chaenomeles fructus* werden die beinahe reifen, längsgeteilten und in der Sonne getrockneten Früchte von *Chaenomeles speciosa* verwendet. Sie werden noch unreif geerntet und vor dem Trocknen in der Sonne so lange in kochendes Wasser gelegt, bis sich auf der Außenhaut weißliche Flecken bilden. Die Droge wird hauptsächlich aus Kulturen in Mittel- und Westchina gewonnen.

Makroskopische Beschreibung der Droge:

Die Früchte kommen nur halbiert oder nochmals in Streifen geschnitten in den Handel. Die Stücke sind 2-5 cm breit und 1-2,5 cm dick. Ihre Außenseite ist violettrot oder braunviolett mit unregelmäßigen, tiefen Runzeln. Die Ränder an den Schnittflächen sind eingerollt. Das Fruchtfleisch ist rotbraun, in der Mitte eingefallen und braungelb gefärbt. Die Samen sind meist ausgefallen. Vom Kernhaus sind glatte, glänzende Stellen sichtbar. Der Geruch ist schwach aromatisch und erfrischend, der Geschmack sauer (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997).

Mikroskopische Beschreibung der Droge:

Das Exokarp besteht aus derbwandigen, teilweise gefensterten, polygonalen Zellen, die braune Substanzen enthalten. Das Mesokarp enthält in den äußeren Lagen kleine Zellen, die zum Endokarp hin etwas weitlumiger werden. Die Zellen sind fast rund und blaßbraun. Im

Fruchtfleisch sind reichlich kleinlumige, stark getüpfelte Steinzellnester vorhanden. Häufig finden sich Netzgefäße, seltener Leitergefäße. Das Endokarp, die das Kernhaus bildende pergamentartige Membran, besteht aus mehreren Lagen dickwandiger Fasern, die in verschiedenen Richtungen gekreuzt sind. Die Sklereiden sind ca. 48-72 µm lang und stark getüpfelt. An der Außenseite liegen Kristallkammerzellen mit tetragonalen Calciumoxalat-Solitärkristallen (vgl. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997).

1.2. Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin

Mugua wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Antirheumatikum, Spasmolytikum und Stomachikum eingesetzt. Folgende Indikationen sind in der Literatur belegt: (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997; STÖGER, 1999; ZHU, 1998)

- Arthritis mit Gelenkversteifung, Schmerzen und Schweregefühl der Lende und der Knie
- Erbrechen und Durchfälle mit krampfartigen Zuständen
- Ödeme und Schwäche in den Beinen

Auch andere Quittenfrüchte werden mit ähnlichen Indikationen in China und Japan verwendet (SCHNEEBELI-GRAF, 1992).

Traditionelle Dosierung und Zubereitung: Dekokt aus 6-9 g Droge pro Tag (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1997)

1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe und pharmakologische Wirkungen

Aus chinesischen Untersuchungen sind folgende Inhaltsstoffe bekannt:

- Saponine und Flavone unbekannter Struktur (ZHU, 1998)
- Verschiedene Pflanzensäuren wie Vitamin C, Fumarsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Weinsäure (KLETTER, 1992)
- Oleanolsäure (ZHU, 1998)
- Sorbit (WALLAART, 1980)

In der chinesischen Literatur finden sich nur wenige pharmakologische Daten. Untersucht wurden bisher (ZHU, 1998):

- Immunologische Effekte: bei oraler Gabe des Dekoktes (25 g/kg) wird der Milz-Index bei Mäusen signifikant gesenkt, intraperitoneal verabreicht verringert ein Extrakt des Krautes

bei Mäusen in einer Dosierung von 85 mg/kg die Phagozytoseaktivität der Makrophagen im Bauchraum.

- Antitumoreffekt: ein 25%iger wäßriger Extrakt aus dem Kraut hemmt intraperitoneal verabreicht das Wachstum von Ehrlich-Ascites-Karzinomen, Lymphosarkomen und Sarkomen bei Mäusen
- Antibakterielle Effekte: der Dekokt aus den Früchten hergestellt, zeigt Hemmwirkung auf *Bacillus dysenteriae*, *Diplococcus pneumoniae* und Staphylococcen.
- Antiinflammatorischer Effekt: ein durch Eiweiß induziertes Mäusepfotenödem wurde gehemmt.

Chaenomelis fructus wurde für weitere phytochemische und pharmakologische Untersuchungen aus der Auswahl an direkt mit Dichlormethan hergestellten Extrakten gewählt, die im pharmakologischen Screening betrachtet worden waren (vgl. Kapitel D). Die Hemmstärke des Extraktes auf beide Isoenzyme war sehr gut und bisher lagen zur Inhaltsstoffführung nur sehr wenige Daten vor. Die Kombination der Anwendung als Antirheumatikum und zugleich auch als Stomachikum weckte besonderes Interesse, ob sich diese Kombination besonders auf die Beeinflussung der Prostaglandin-H-Synthase-2 zurückführen ließ. Über die Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels und im Speziellen über die Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase der Droge *Mugua* sowie der Beurteilung der Wirksamkeit der Droge unter diesem Aspekt war bisher in der Literatur nichts bekannt.

2. Ergebnisse eigener Untersuchungen

2.1. HPLC-Fingerprintanalyse

Hauptziel der HPLC-Untersuchungen war, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe eine rasche und eindeutige Identifizierung der Droge sowie eine optimale Inhaltsstoffauftrennung möglich sein sollte.

2.1.1. Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels

Bei den Untersuchungen der sukzessiv mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol gewonnenen Extrakte wurden die Extrakte auf einer RP-18-Säule mit einem einfachen Fließmittelgradienten mit Acetonitril und Wasser analysiert. Dabei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Das HPLC-Chromatogramm des *n*-Hexanextraktes (Ausbeute 0,42 %; Injektionsmenge: 0,2 mg) war wenig aussagekräftig. Dabei erwies sich das verwendete RP18 Material als ungeeignete stationäre Phase für die Inhaltsstoffe und der verwendete UV-Detektor stellte keine geeignete Detektionsart dar. Die Substanzen waren so lipophil, dass sie im Gradientensystem erst bei 100 % Acetonitril als unspezifischer Anstieg erschienen. Getrennte Peaks konnten auch nach Änderung der Einspritzmenge nicht aufgezeichnet werden. Die Inhaltsstoffe des Extraktes trugen keine chromophoren Gruppen, so dass die bei 210 nm detektierten Peaks nur geringe Intensitäten zeigten und bei 245 und 365 nm keinerlei Verbindungen detektiert werden konnten.

Die HPLC-Trennung des Dichlormethanextraktes (Ausbeute: 0,54 %; Injektionsmenge: 0,2 mg) zeigte eine gute Auftrennung der Inhaltsstoffe an RP18 Material. Eine Messung der Substanzen war aber nur bei 210 nm oder kürzeren Wellenlängen möglich, da die meisten Inhaltsstoffe keine bei höheren Wellenlängen detektierbaren Chromophore besaßen.

Die HPLC-Analyse des Methanolextraktes (Ausbeute 30,2 %; Injektionsmenge 0,2 mg) führte auf RP18 Material mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten-System zu keiner zufriedenstellenden Auftrennung. Die hydrophilen Inhaltsstoffe eluierten trotz flachem Gradienten gleich zu Beginn des Laufes zwischen 0,8 und 3,8 min. Da im hydrophilen Bereich keine Hemmwirkung auf die Prostaglandinsynthese gefunden werden konnte, wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesem Extrakt durchgeführt.

Das pharmakologische Screening der sukzessiven Extraktion ergab die stärksten Hemmwirkungen auf PGHS-1 und -2_{kor} mit 72,1 bzw. 72,6 % für den Dichlormethanextrakt (Testkonzentration 50 µg/ml) (vgl. Kapitel D).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Dichlormethan als bevorzugtes Extraktionsmittel für alle weiteren Untersuchungen gewählt.

2.1.2. Vergleich verschiedener Drogenmuster

Zum Vergleich verschiedener Drogenmuster standen drei unterschiedliche Lieferungen aus der TCM-Klinik in Kötzing und ein Drogenmuster aus einer Pekinger Apotheke zur Verfügung. Die Dichlormethanextrakte der vier Drogenmuster zeigten bei den HPLC-Untersuchungen einen relativ einheitlichen Fingerprint (Abbildung F.1).

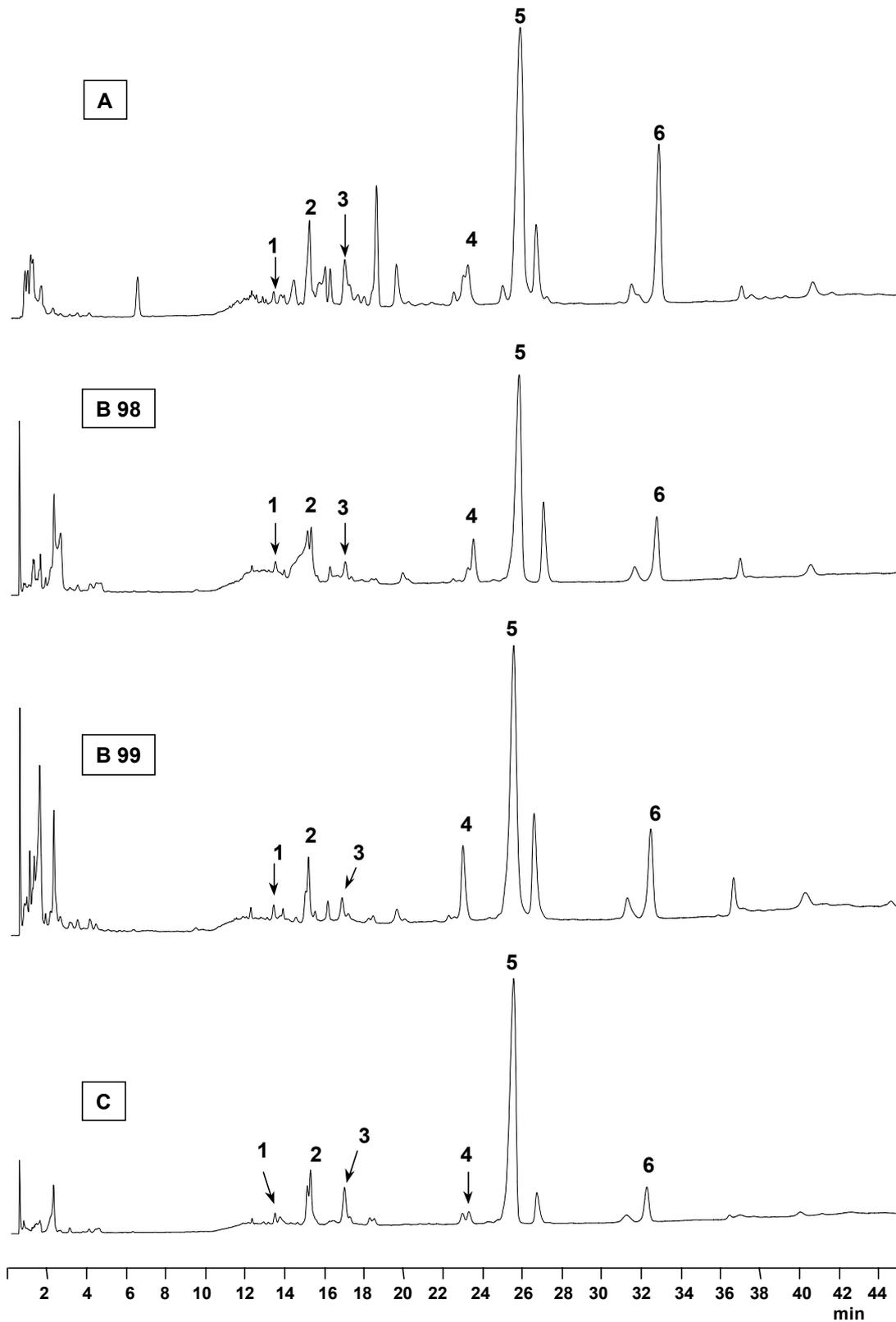


Abbildung F.1: HPLC-Fingerprint-Chromatogramme der Dichlormethanextrakte verschiedener Drogenmuster von Chaenomelis fructus (zur Beschriftung siehe Tabelle F.1)

Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand von Referenzsubstanzen und den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Inhaltsstoffen aus *Chaenomeles speciosa*.

Die Hauptkomponente der untersuchten Drogen im Dichlormethanextrakt war Oleanolsäure (Peak 5). Im Bereich von 12-18 min wurden Phytosterole eluiert. Diese Stoffgruppe ergab keine differenzierten Peaks, sondern ein sehr breites Signal über mehrere Minuten.

Tabelle F.1: Retentionszeiten wichtiger Inhaltsstoffe des Dichlormethanextraktes der Früchte von *Chaenomeles speciosa* im HPLC-Trennsystem **CHAENAN**:

Peak	Rt (min)	Verbindung	
1	13,3	TTS3a	Euscaphissäure
2	15,7	TTS2	Pomolsäure
3	17,1	TTS4	Maslinsäure
4	23,1	TTS6	3 β -O-Acetylpomolsäure
5	25,7	TTS1	Oleanolsäure
6	32,1	TTS5	3 β -O-Acetylursolsäure

Bei 254 nm aufgenommene Chromatogramme zeigten jeweils nur zu Beginn des HPLC-Laufes detektierbare Verbindungen. Diese Peaks finden sich bei allen Drogen, in denen Pflanzenfarbstoffe und Chlorophyll enthalten sind. Sie sind deshalb wenig charakteristisch und nicht aussagekräftig für ein HPLC-Drogenscreening.

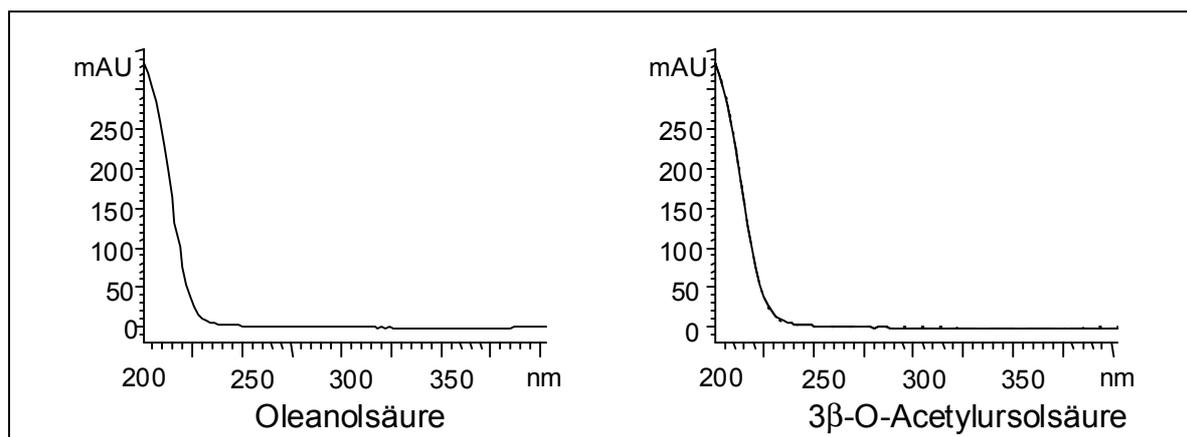


Abbildung F.2: Online aufgezeichnete UV-Spektren von Oleanolsäure und 3 β -O-Acetylursolsäure

Die online-aufgenommenen UV-Spektren zeigten, dass alle Bestandteile, die in größeren Mengen gefunden wurden, keine deutlichen Absorptionen oberhalb 230 nm besitzen. Konjugierte Systeme und andere Chromophore waren dadurch auszuschließen. Beispielhaft sind die UV-Spektren von Oleanolsäure (Peak 5) und 3 β -O-Acetylsäure (Peak 6) abgebildet (Abbildung F.2).

2.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

2.2.1. Fließmittelloptimierung

Nachdem als geeignetes Extraktionsmittel Dichlormethan gewählt worden war, sollte für diesen Extrakt ein optimales DC-Trennsystem entwickelt werden. Dies sollte dazu dienen, verschiedene Drogenmuster zu unterscheiden, Referenzsubstanzen zuzuordnen und die Isolierung der Inhaltsstoffe zu überwachen.

Nach Erprobung verschiedener Fließmittel wurde mit einer Mischung aus **Toluol, Ethylacetat und Eisessig** im Verhältnis **80:15:5 (FMC1)** eine optimale dünnschichtchromatographische Auftrennung an **Kieselgel 60** erzielt. Der Zusatz von Eisessig führte zu deutlich schärferen Banden. Fließmittelmischungen besonders mit *n*-Hexan zeigten ohne Säurezusatz Schlieren über die gesamte Laufstrecke.

Bei der Direktauswertung unter **UV 254 nm** konnten keine fluoreszenzlöschenden Zonen gefunden werden. Konzentrationsabhängig wurden einige Zonen diffus sichtbar. Die Direktauswertung bei **UV 365 nm** zeigte keine fluoreszierenden Zonen. Das Fehlen von aromatischen und anderen chromophoren Verbindungen war bereits in den HPLC-Untersuchungen erkannt worden (vgl. Abschnitt 2.1). Um die Substanzen sichtbar zu machen, wurde deshalb die Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz gewählt. Die Zonen wurden dabei nach Besprühen und Erhitzen unspezifisch violett, blau oder rosa gefärbt. Mit Hilfe der aus dieser Droge isolierten Inhaltsstoffe und einiger Vergleichsubstanzen konnten die wichtigsten Zonen zugeordnet werden (Abbildung F.1).

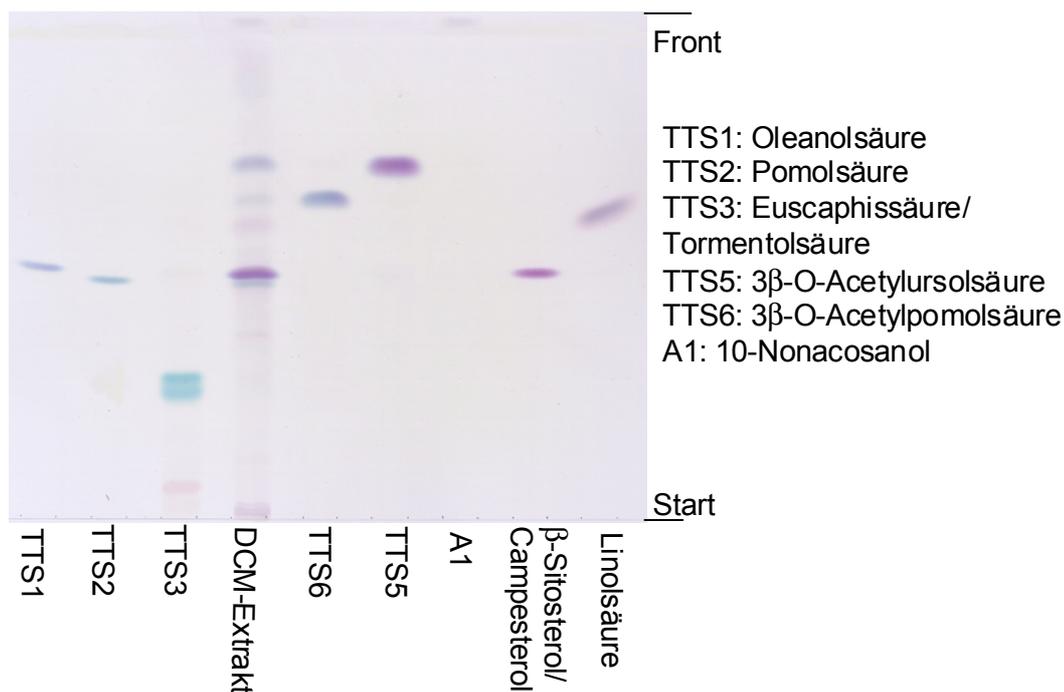


Abbildung F.1: Dünnschichtchromatogramm des Dichlormethanextraktes und isolierter Vergleichsubstanzen; Trennsystem: FMC1; Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; VIS; Zuordnung siehe Tabelle F.1

Tabelle F.1: Rf-Werte verschiedener isolierter Verbindungen

Verbindung		Rf-Wert (FMC1)	Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (VIS)
Oleanolsäure	TTS1	0,49	violett
Pomolsäure	TTS2	0,48	blau
Euscaphissäure / Tormentolsäure	TTS3	0,21/0,20	hellblau
Acetylpomolsäure	TTS6	0,65	blauviolett
Acetylursolsäure	TTS5	0,72	rotviolett
Nonacosan-10-ol	A1	0,98	helllila
β-Sitosterol / Campesterol		0,50	rosa
Linolsäure		0,58	rötlich mit leichtem Tailing

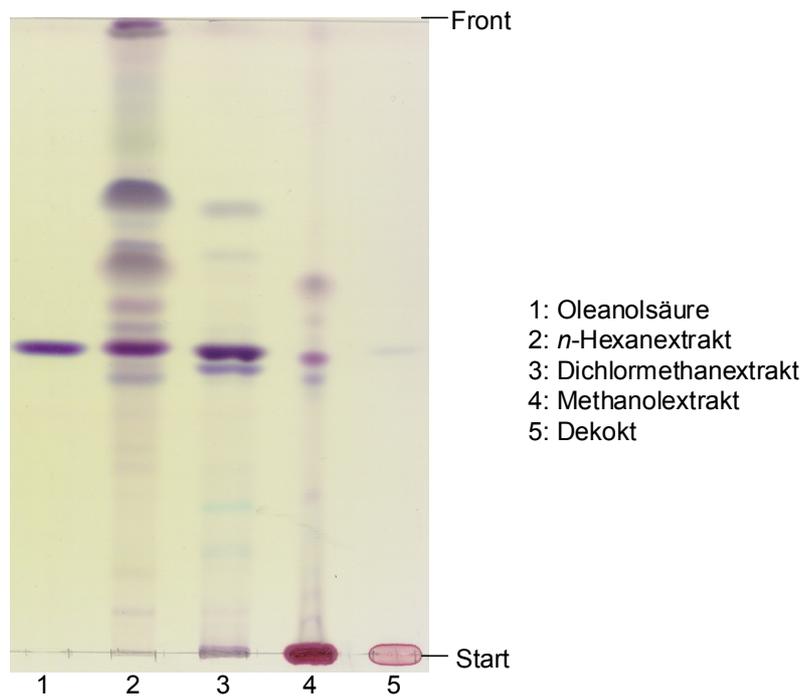


Abbildung F.2: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der sukzessiv gewonnenen Extrakte von *Chaenomelis fructus* (Drogenmuster B99) (FCM1, Detektion: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; VIS)

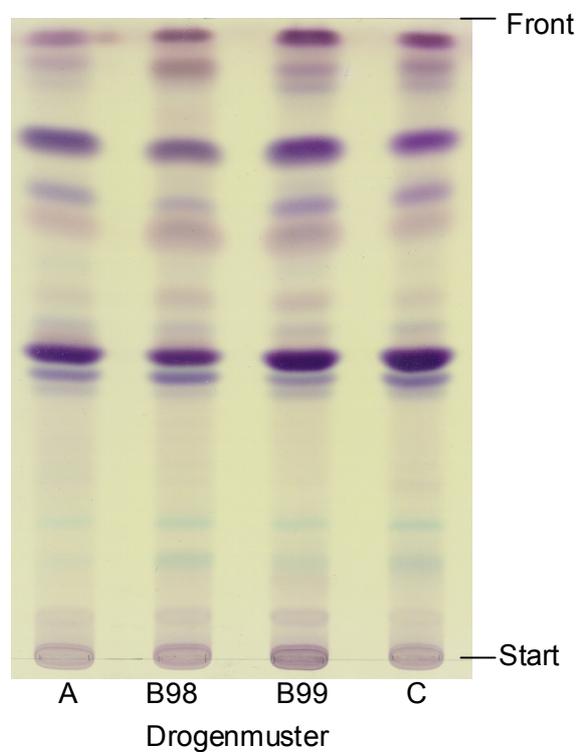


Abbildung F.3: Dünnschichtchromatographischer Vergleich verschiedener Drogenmuster von *Chaenomelis fructus* (FCM1; Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; VIS)

2.2.2. Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Extrakte

Der Vergleich der sukzessiv gewonnenen Extrakte (Abbildung F.2) zeigte, dass der mit *n*-Hexan hergestellte Extrakt sich deutlich vom Dichlormethanextrakt unterschied. An der Laufmittelfront zeigten sich zwei Zonen von Wachsen, die im Dichlormethanextrakt fast nicht sichtbar waren. Auch Acetylsalicylsäure wurde fast quantitativ mit *n*-Hexan extrahiert. Ebenso finden sich die ungesättigten Fettsäuren und Phytosterole zum überwiegenden Teil im *n*-Hexanextrakt.

Der nachfolgend hergestellte Dichlormethanextrakt zeigte deutlich die Zone der Oleanolsäure bei R_f 0,5. Andere hydrophile Triterpensäuren wurden erstmals mit Dichlormethan in so ausreichender Menge extrahiert, dass im R_f -Bereich von 0,1-0,2 deutlich als zwei hellblau gefärbte Zonen detektiert werden konnten. Am Start fand sich eine schon bei Tageslicht gelb gefärbte Zone.

Bei der anschließenden Methanolextraktion konnten nochmals Triterpensäuren extrahiert werden. Der nicht aufgetrennte Startfleck war bei diesem Extrakt in diesem Fließmittel die dominierende Zone. Der Dekokt zeigte ähnlich dem Methanolextrakt einen gefärbten Startfleck, der nicht wanderte. Selbst mit Wasser konnten noch geringe Mengen Oleanolsäure extrahiert werden, die sich aber als sehr schwache Zone präsentierte. Andere lipophile Verbindungen waren jedoch nicht mehr sichtbar.

Diese aus den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse korrelierten mit den Beobachtungen aus den HPLC-Untersuchungen: sowohl Wachse als auch Phytosterole sind für den DAD-UV-Detektor bei 200 nm nicht meßbar. Ungesättigte Fettsäuren werden erst in sehr hohen Konzentrationen sichtbar. So konnten im *n*-Hexanextrakt aufgrund der mengenmäßigen Dominanz dieser Verbindungen nur wenige Substanzen detektiert werden, während im Dichlormethanextrakt die Triterpensäuren mit Endabsorption bei 200 nm gemessen wurden.

2.2.3. Vergleich der Dichlormethanextrakte verschiedener Drogenmuster

Zum dünnschichtchromatographischen Vergleich wurden die in Abschnitt 2.1 beschriebenen Extrakte verwendet und je 0,15 mg aufgetragen. Für diese Drogenmuster ergab sich im Laufmittelsystem Toluol:Ethylacetat:Eisessig (80:15:5) ein sehr einheitliches Bild (Abbildung F.3). Alle oben beschriebenen Bestandteile konnten nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz in allen Extrakten wiedergefunden und zugeordnet werden. Kleine Unterschiede konnten bei niedrigen R_f -Werten festgestellt werden, wo hydrophile, farbige Bestandteile haften bleiben. Quantitative Unterschiede konnten bei den hydroxylierten Triterpensäuren ($R_f = 0,15 - 0,25$) beobachtet werden. Während in den Extrakten **B 98**, **B 99** und **C** die Zonen gut sichtbar waren, blieben sie im Extrakt **A** fast undetektierbar.

2.3. Extraktion zur Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus dem Dichlormethanextrakt

Als Extraktionsmittel wurde Dichlormethan verwendet, nachdem der DCM-Extrakt sich als der am stärksten wirkende Extrakt in den Testsystemen erwiesen hatte, und phytochemisch die HPLC-Analyse und die DC-Untersuchungen die größte Inhaltsstoffvielfalt aufgezeigt hatten.

2.4. Fraktionierung des Dichlormethanextraktes

Die Fraktionierung erfolgte wirkungsorientiert. Dabei wurden jeweils nach säulenchromatographischer Trennung alle Fraktionen auf ihre PGHS-1 und PGHS-2 Hemmung getestet. Die Screeningkonzentration für diese Testungen lag bei jeweils 50 µg/ml. Inhibitorisch und phytochemisch interessante Fraktionen wurden anschließend weiterbearbeitet.

Der Dichlormethanextrakt wurde durch Vakuumflüssigchromatographie (VLC) an Kieselgel mit *n*-Hexan/ Ethylacetat-Mischungen steigender Polarität in 10 Fraktionen aufgetrennt (vgl. Kapitel **H**). Das pharmakologische Screening zeigte für die Fraktionen **I-IV** keine inhibitorischen Effekte auf die PGHS-Isoenzyme. Von einer detaillierten Auftrennung wurde deshalb in diesen Fraktionen abgesehen. Die wirksamen Inhaltsstoffe konnten ausschließlich aus den Fraktionen **VI-X** isoliert werden. Bei diesem ersten Fraktionierungsschritt konnten keine Reinsubstanzen erhalten werden. Deshalb erfolgte eine weitere Auftrennung durch offene Säulenchromatographie entweder an Sephadex[®] LH-20 mit Ethylacetat (**IX**) oder mit Cyclohexan/Ethylacetat-Mischungen (**VI**) oder mit offener Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Ethylacetat-Mischungen als Eluens (**X**). Da sich die zu isolierenden Verbindungen als chemisch verwandt erwiesen, wurden noch weitere Reinigungsschritte an RP18-Material über MPLC oder semipräparativer HPLC mit Acetonitril/Wasser-Gradient oder präparativer DC und anschließender weiterer Reinigung über semipräparative RP-HPLC nötig, um die Inhaltsstoffe analysenrein zu erhalten. Diese Form der Reinigung mußte auch deshalb gewählt werden, weil bei stark begrenzter Fraktionsmenge einige Fraktionen zu fast 50 % nur einen einzigen Inhaltsstoff enthielten, und die Substanzmenge der Nebenkomponenten daher nur sehr gering war. Oleanolsäure war in Fraktion **VII** zu 55 % vorhanden und in Fraktion **VIII** sogar zu fast 70 %. Auf eine weitere Auftrennung dieser beiden Fraktionen wurde deshalb verzichtet. Da Triterpensäuren schwer löslich sind, konnte die Säulenkapazität oft nicht optimal genutzt werden. In diesen Fällen wurde ein kürzeres Programm mit mehreren Durchläufen bevorzugt. Bei der Isolierung wurde auch besonderer Wert darauf gelegt, die nativ im Extrakt vorhandenen Verbindungen zu erhalten. Dies schloss die bei terpenoiden Säuren übliche Arbeitsweise einer vorangehenden Methylierung und anschließender säulenchromatographischen Trennung der Methylester an Kieselgel mit lipophilen Eluenten aus.

Eine grobe Übersicht über die Vorgehensweise gibt das Isolierungsschema in Abbildung F.1. Ausführliche Beschreibungen finden sich im Experimentellen Teil (Kapitel H).

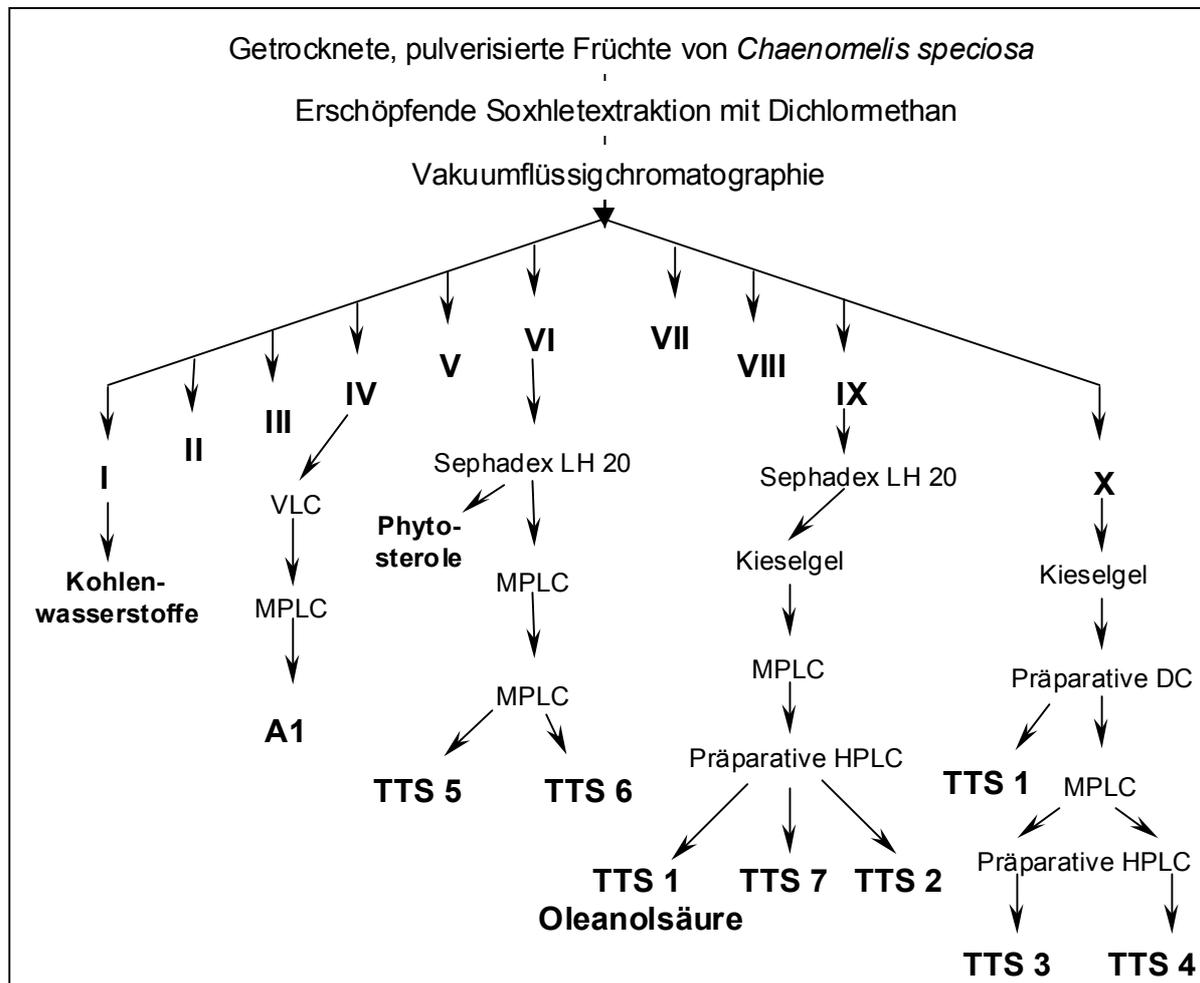


Abbildung F.1: Isolierungsschema der Inhaltsstoffe aus *Chaenomelis fructus*

2.5. Isolierung und Identifizierung der Triterpensäuren

2.5.1. Allgemeines zum Vorkommen von Triterpensäuren in Rosaceen und deren Strukturaufklärung

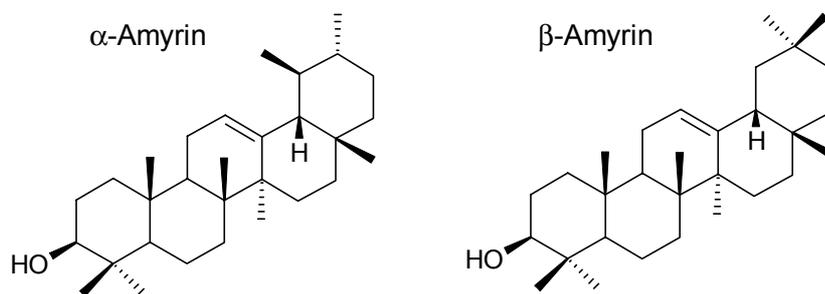
Triterpene und deren Säuren sind bei den Rosaceen weit verbreitet. HEGNAUER (1973) nennt pentazyklische Triterpene als Hauptkomponenten der Cuticularwachse, wobei auch andere Pflanzenteile reichlich Triterpensäuren enthalten. Meist überwiegen dabei Oleanolsäure und Ursolsäure. Sie werden oft von sauerstoffreicheren Triterpenoiden begleitet. Neben freien Triterpensäuren finden sich in zahlreichen Rosengattungen ebenfalls gebundene

Triterpensäuren. Sie gehören entweder zu den sogenannten Pseudosaponinen oder den echten Saponinen.

Biosynthese

Formal sind Triterpene aus sechs Isopren-Einheiten (C₅) aufgebaut. Diese C₃₀-Verbindungen entstehen durch Schwanz-an-Schwanz-Kondensation zweier Sesquiterpene (C₁₅). Dies führt zunächst zum noch azyklischen Präsqalen und weiter zum Squalen (C₃₀), welches nach Oxidation spontan zyklisiert. Das symmetrische Squalen kann in Lösung in verschiedenen Konformationen vorliegen. Durch Enzyme werden in lebenden Zellen bestimmte Konformationen erzwungen. Die Sessel-Sessel-Sessel-Wannen-Konformation bedingt dabei die Bildung pentazyklischer Triterpene vom Lupan-, Oleanan- und Ursantyp.

Der erste Schritt dabei ist eine Oxidation des Squalens zum 2,3-Squalenepoxid. Nach Umsetzung zum 3-Hydroxy-Squalenkation erfolgt spontan Zyklisierung zu tetra- oder pentazyklischen Ringsystemen mit einer OH-Gruppe an der C-3-Position. Bei der Umwandlung des β -Amyrintypes in den α -Amyrintyp wandert in einer Zwischenstufe eine Methylgruppe von C-20 nach C-19. (WAGNER, 1999; RIMPLER, 1999; TEUSCHER, 1997).



Strukturaufklärung

Die **UV-Spektroskopie** ist bei den einfachen Triterpensäuren ungeeignet um Strukturinformationen zu erhalten. Die Absorptionen dieser Verbindungen liegen, soweit keine konjugierten Doppelbindungen vorhanden sind, unter 200 nm. Das UV-Spektrum ist damit nur über Vakuum-UV-Messung zugänglich, während das reguläre UV-Spektrum wenig charakteristisch nur die Endabsorption der Verbindung zeigt (vgl. Abbildung F.2).

IR-spektroskopisch werden Absorptionen der Doppelbindung, der Carbonylfunktion und der Hydroxylgruppe im Bereich der Valenzschwingungen oberhalb 1500 cm⁻¹ gefunden. In der *Fingerprint*-Region lassen sich Ursolsäure- und Oleanolsäurederivate nach SNATZKE et al. (1962) unterscheiden. In den Spektralbereichen zwischen 1392-1355 cm⁻¹ und von 1330-1245 cm⁻¹ finden sich charakteristische Banden. Während Oleanolsäurederivate zwei Banden im oberen und drei Banden steigender Intensität im unteren Bereich zeigen, weisen

Ursolsäurederivate in beiden Bereichen drei Banden auf, die im kürzerwelligem Bereich bathochrom verschoben sind. Diese Beobachtungen können allerdings nur als Unterscheidungskriterien bei Säurederivaten herangezogen werden.

Relativ aussagekräftig sind die **Massenspektren** der Triterpensäuren. Für Δ^{12} -ungesättigte Ursan- und Oleananderivate zeigen sich hier typische Zerfallsmuster. Abbildung F.1 zeigt beispielhaft das Zerfallschema für Oleanolsäure (BUDZIKIEWICZ et al., 1963; KARLINER et al., 1966).

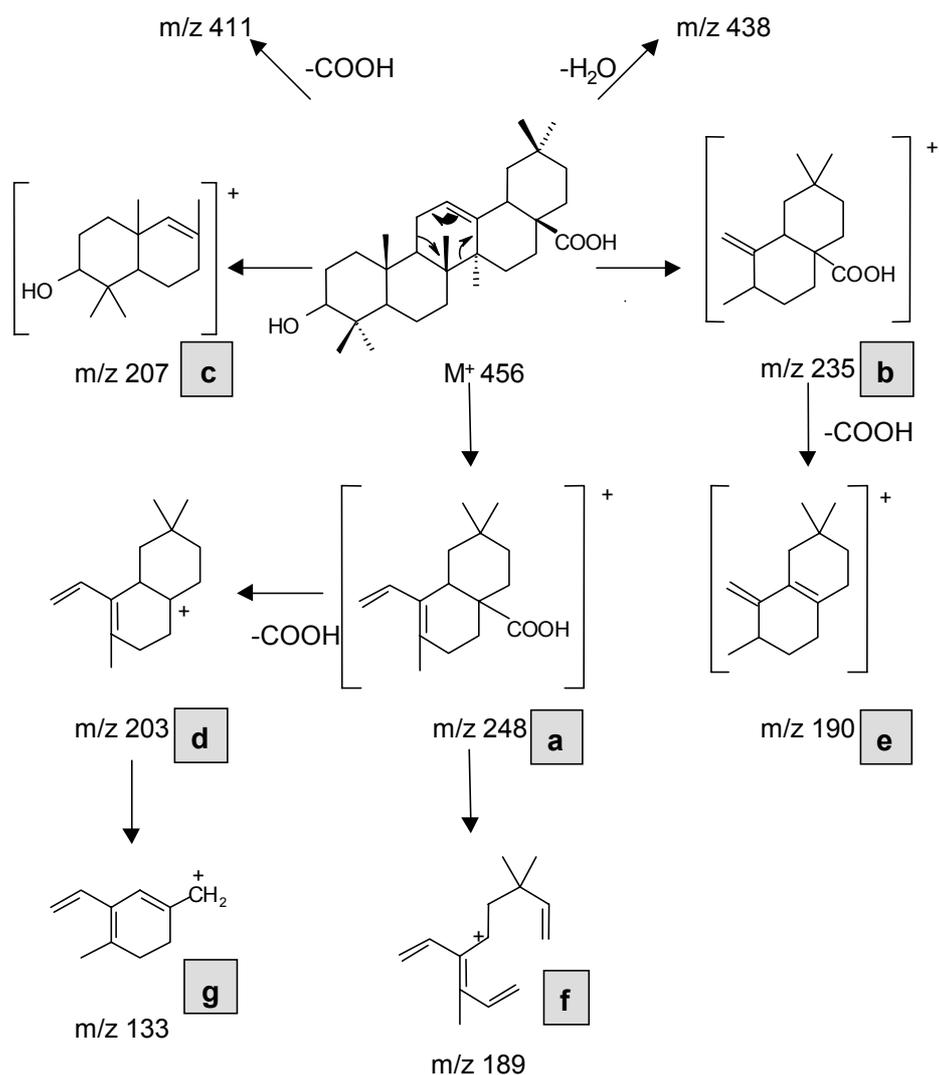


Abbildung F.1: Zerfallschema für Δ^{12} -ungesättigte Oleanane und Ursane am Beispiel der Oleanolsäure (nach BUDZIKIEWICZ et al., 1963)

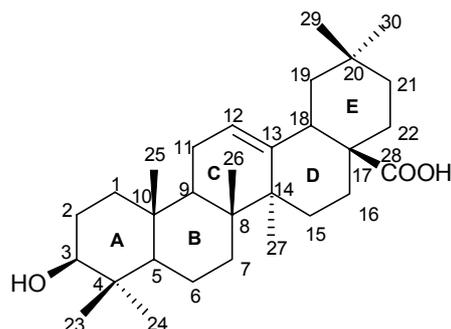
Bedingt durch die Δ^{12} -Doppelbindung entsteht durch Retro-Diels-Alder-Spaltung das Bruchstück m/z 248, aus dessen weiterem Zerfall die charakteristischen Bruchstücke m/z 203,

189 und 133 resultieren. Daneben treten die Spaltprodukte m/z 235 und 207 auf. Der Verlust der Carboxylgruppe führt von Fragment m/z 235 zum Bruchstück m/z 190.

Die **$^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$** liefert weitere Hinweise zur Identifizierung von Triterpensäuren. Da jedoch das Kohlenstoffgerüst meist nicht viele funktionelle Gruppen trägt, sind nur wenige Signale innerhalb des Spektrums tieffeldverschoben. Diese allerdings werden durch umfangreiche Literatur und Interpretationshilfen oft und genau beschrieben (z.B. SHAMMA, et al., 1962). Bei Δ^{12} -ungesättigten Triterpensäuren ist das olefinische Proton am weitesten tieffeldverschoben. Weitere charakteristische Signale zeigen das 3α -Proton und das Proton an C18. Methylgruppen finden sich im Bereich von 1,7 bis 0,7 ppm. Vielfach wurden Derivatisierungen und damit verbundene chemische Verschiebungen als Identifizierungshilfe verwendet (vgl. SHAMMA et al., 1962).

Eine weitere wichtige spektroskopische Methode zur Identifizierung von Triterpensäuren ist die **$^{13}\text{C-NMR-Spektroskopie}$** . MAHATO et al. (1994) haben eine umfangreiche Liste an ^{13}C -Daten von verschiedenen pentazyklischen Triterpenen erstellt. Gut unterscheiden lassen sich Oleanan- und Ursankörper. Die Shifts für die Kohlenstoffe der Δ^{12} -Doppelbindung bei Oleananen liegen bei ca. 122 und 145 ppm. Bei Ursanen ist C-12 um ca. 2 ppm entschirmt, C-13 jedoch um ca. 5 ppm ins höhere Feld verschoben. Mit einem zusätzlichen **DEPT-Spektrum** lassen sich die beiden Grundkörper zusätzlich unterscheiden: im Unterschied zu den Ursanen, die zwei CH-Gruppen an Position C-19 und C-20 besitzen, weisen Oleanane eine CH_2 -Gruppe an C-19 und ein quartäres C-Atom an C-20 auf. Die Säurefunktion liegt deutlich tieffeldverschoben bei ca. 180 ppm.

2.5.2. Identifizierung von TTS1: Oleanolsäure



TTS1 stellte den Hauptpeak ($R_t = 25,7$ min, Methode: **CHAENAN**) im HPLC-Chromatogramm und die intensivste Bande bei den DC-Untersuchungen ($R_f = 0,49$; **FMC1**) des Dichlormethanextraktes dar (vgl. Kap. 2.1 und 2.2).

Ab Fraktion **IV** war die Substanz in allen Fraktionen der VLC-Trennung in größeren Mengen enthalten. Fraktion **VII** enthielt ca. 55 % und Fraktion **VIII** sogar fast 70 %. Sie wurde zuerst

aus Fraktion **IX** nach Trennung über Sephadex[®] LH20 und weiteren Reinigungsschritten isoliert (414 mg). Die Substanz kristallisierte in feinen Nadeln aus Ethanol. Die Nadeln sublimierten bei 242°C und schmolzen bei ca. 277°C. Die Substanz erwies sich als nicht UV-löschend bei 254 nm und nicht fluoreszierend bei 365 nm. Sie färbte sich nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz intensiv violett. Die Liebermann-Burchard-Reaktion verlief positiv. Das online während des HPLC-Laufes aufgenommene UV-Spektrum zeigte nur Endabsorption (vgl. Abbildung F.2).

Das IR-Spektrum (Abbildung F.1) ließ deutlich im Bereich zwischen 3500 und 3300 cm^{-1} die für Carbonsäuren typische sehr breite Bande der OH-Valenzschwingungen bedingt durch Wasserstoff-Brückenbindung erkennen. Im Bereich von 2940 bis 2830 cm^{-1} erschien eine Doppelbande, die auf ein aliphatisches Kohlenstoffskelett mit mehreren CH_2 -Gruppen hinwies, da hier symmetrische und asymmetrische C–H-Valenzschwingungen von CH_2 - und CH_3 -Gruppen Signale liefern. Bei 1693 cm^{-1} erschien scharf die Bande der C=O-Valenzschwingung. Eine erste Zuordnung zu einem Grundtyp von Triterpensäuren ließ sich aus dem Literaturvergleich mit SNATZKE et al. (1962) machen. Im Bereich von 1400-1350 cm^{-1} zeigte die Verbindung nur zwei Banden bei 1387 und 1365 cm^{-1} . Die Bande bei 1387 cm^{-1} wies allerdings noch eine zusätzliche Transmissionsbande auf. Eine äquivalent aufgenommene Vergleichssubstanz zeigte für die Messung in KBr ebenfalls diese Bandenform. Diese Banden rühren von der Überlagerung der geminalen Methylgruppen am Ring E und den Absorptionen der angulären CH_3 -Gruppen her. Im Bereich zwischen 1330 und 1260 cm^{-1} erschienen drei Banden bei 1323, 1306 und 1267 cm^{-1} . Diese Banden liegen bei Ursolsäurederivaten bathochrom verschoben bei 1308-1312, 1270-1276 und bei 1245-1250 cm^{-1} (SNATZKE et al., 1962). Sichtbar wurden ebenso die für trisubstituierte Doppelbindungen typischen Banden zwischen 810 und 833 cm^{-1} was die Zugehörigkeit zum Oleanolsäuregrundkörper wahrscheinlich machte.

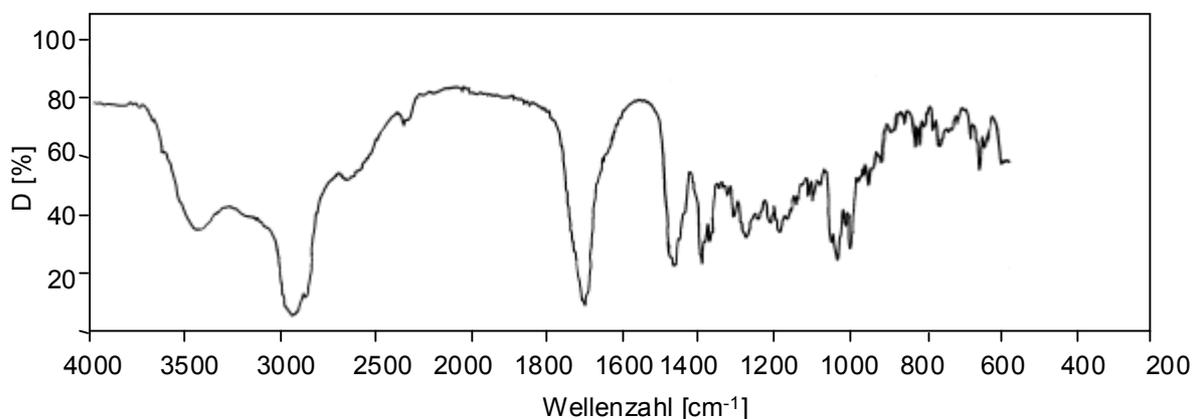


Abbildung F.1: IR-Spektrum von Oleanolsäure in KBr aufgenommen

Über CI-MS ließ sich ein Molekulargewicht von 456 bestimmen. Die Substanz war gaschromatographisch nicht erfaßbar. Deshalb wurde eine LC-MS-Kopplung durchgeführt und online ein EI-MS Spektrum aufgenommen (Abbildung F.2). Es zeigte das typische Fragmentierungsmuster für Δ^{12} -ungesättigte Triterpensäuren mit Hydroxylierung an Ring A (vgl. Abbildung F.1). Der Basispeak war in diesem Spektrum m/z 249. Da in diesem System mit Wasser und Acetonitril gearbeitet wurde, ist diese Massenverschiebung um m/z 1 durch Addition eines Protons erklärbar. Der Basispeak entsteht aus der Retro-Diels-Alder-Spaltung an der Δ^{12} -Doppelbindung. Alle weiteren charakteristischen Bruchstücke für eine Monohydroxytriterpensäure wie m/z 203, 189, 133 waren vorhanden.

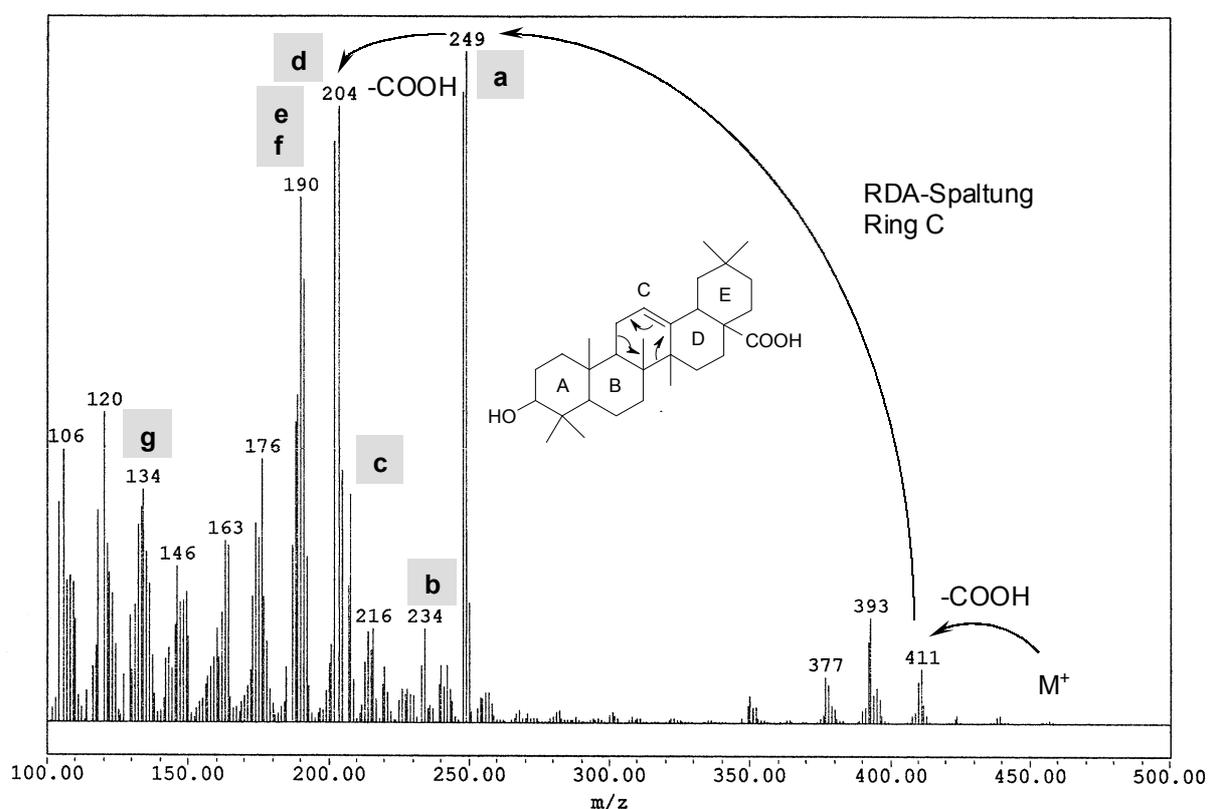


Abbildung F.2: Online aufgenommenes EI-MS-Spektrum von Oleanolsäure

Zur weiteren Absicherung der Massendaten wurde die Triterpensäure nach abgewandelter Methode von FALES et al. (1973) methyliert. Als Methylierungsreagenz diente N-Methyl-N-nitroso-4-toluolsulfonamid in Ether. Durch Zugabe von ethanolischer Natronlauge wurde das saure H-Atom der Carbonsäure durch eine Methylgruppe ausgetauscht (siehe Kapitel H). Nach der Umsetzung war eine gaschromatographische Analyse möglich. Das erhaltene Massenspektrum zeigte als Basispeak m/z 203 und zusätzlich erschien mit hoher Intensität ein Massenfragment bei m/z 262, welches dem Bruchstück m/z 248 aus der Retro-Diels-Alder-

Spaltung äquivalent ist, doch zusätzlich an der Carbonsäure methyliert ist (Abbildung F.3). Diese Ergebnisse wiesen auf das Vorliegen von Oleanolsäure hin.

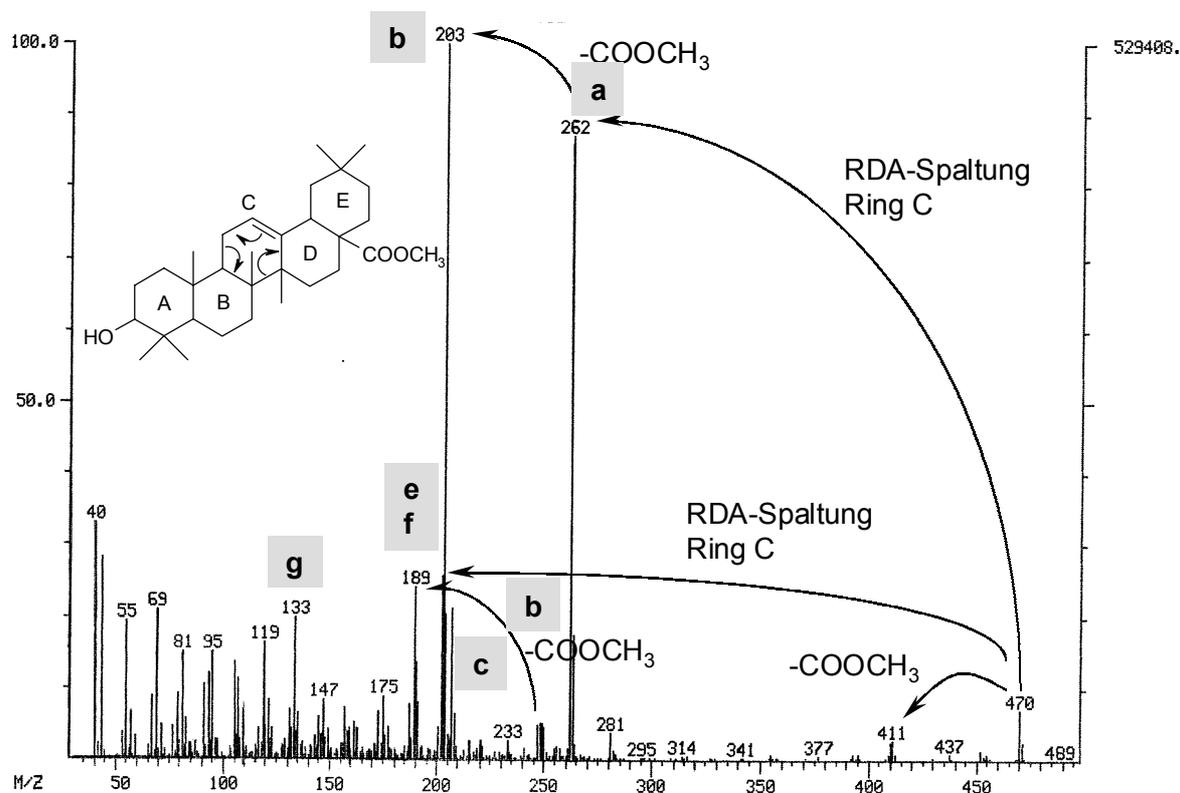


Abbildung F.3: GC-gekoppeltes EI-MS-Spektrum des Oleanolsäuremethylesters

In den meisten Pflanzen findet sich Oleanolsäure zusammen mit Ursolsäure (MERFORT, 1980). Das HPLC-Chromatogramm lieferte dafür jedoch keinerlei Hinweise. Das GC-Chromatogramm nach Methylierung zeigte jedoch einen sehr schlecht aufgelösten zweiten Peak, der direkt vor Oleanolsäuremethylester erschien. Sein MS-Spektrum unterschied sich nicht von dem des Oleanolsäuremethylesters. Seine Peakfläche betrug ca. 1/8 der methylierten Oleanolsäure. Auch lag der Schmelzpunkt einzelner Oleanolsäurekristalle unterhalb des Schmelzpunktes von 310 °C, der in der Literatur angegeben ist (HALSALL et al., 1964). Das Vorhandensein geringer Mengen Ursolsäure schien damit wahrscheinlich.

Im ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung F.4, Tabelle F.1) erschienen alle Signale mit den für Oleanolsäure zu erwartenden chemischen Verschiebungen und Aufspaltungen (Vergleichsspektrum Oleanolsäure aus *Szyzygium aromaticum*, SHAMMA et al., 1962).

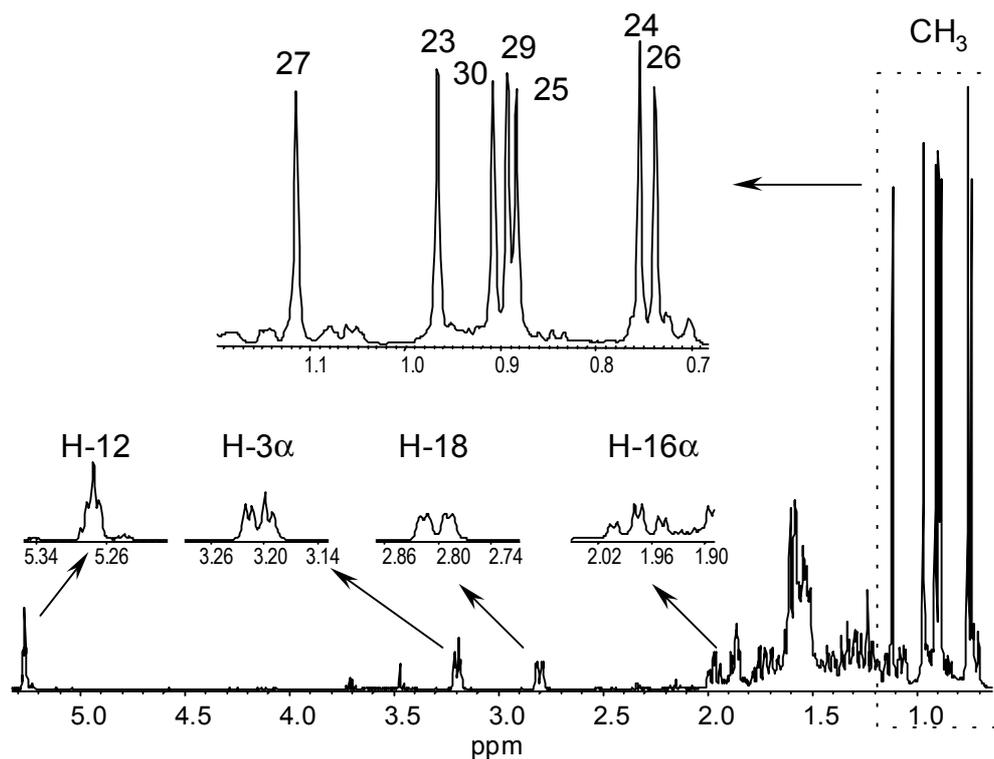


Abbildung F.4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Oleanolsäure

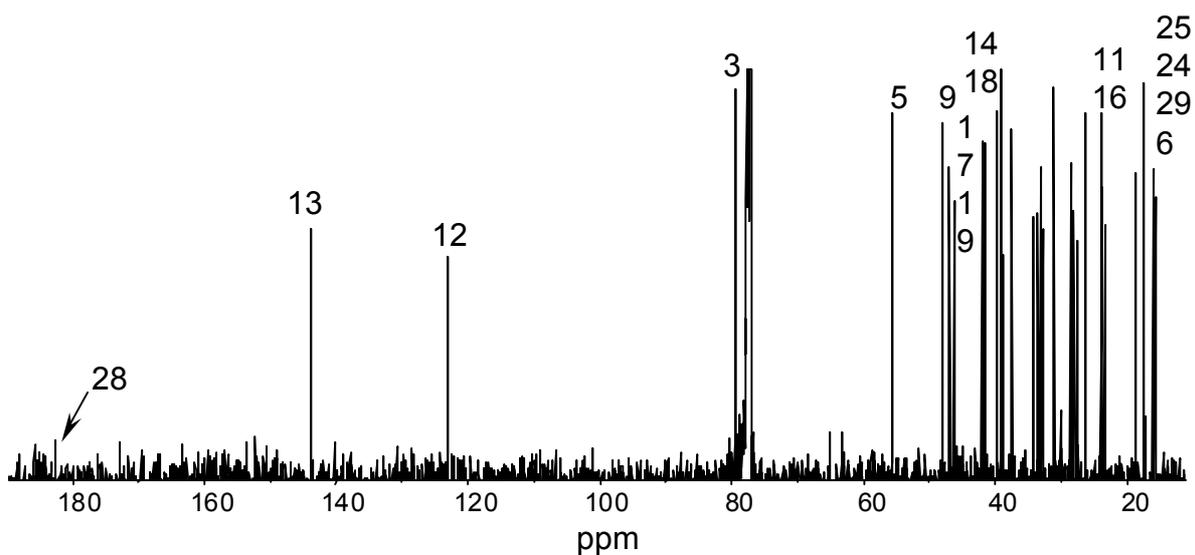


Abbildung F.5: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Oleanolsäure

Tabelle F.1 : NMR-Daten von Oleanolsäure in $CDCl_3$ mit Literaturvergleich nach MAHATO et al. (1994)

C	$^{13}C, \delta$	Lit.	DEPT	$^1H, \delta$	Aufspaltung	Kopplung (Hz)
1	38,4	38,5	CH ₂	0,97 1,60	m m	
2	27,2	27,4	CH ₂	1,58	(m) ^a	
3	79,0	78,7	CH	3,20	dd	4,0; 10
4	38,7	38,7	C			
5	55,2	55,2	CH	0,71	d	10
6	18,3	18,3	CH ₂	1,37 1,54	(m) ^a (m) ^a	
7	32,6	32,6	CH ₂	1,30 1,44	(m) ^a ddd	12,6; 3,2; 3,2
8	39,3	39,3	C			
9	47,6	47,6	CH	1,54	(m) ^a	
10	37,1	37,0	C			
11	23,0	23,1	CH ₂	1,60 1,88	(m) ^a ddd	4,4; 13,3; 13,3
12	122,6	122,1	CH	5,27	t	3,5
13	143,6	143,4	C			
14	41,6	41,6	C			
15	27,7	27,7	CH ₂	1,07 1,37	ddd (m) ^a	5; 5; 13,9
16	23,4	23,4	CH ₂	α 1,97 β 1,54	ddd (m) ^a	3,8; 13,9; 13,9
17	46,5	46,6	C			
18	41,0	41,3	CH	2,8	dd	3,8; 13,9
19	45,9	45,8	CH ₂	1,13 1,61	(m) ^a (m) ^a	
20	30,7	30,6	C			
21	33,8	33,8	CH ₂	1,2 1,34	(m) ^a (m) ^a	
22	32,4	32,4	CH ₂	1,56 1,77	(m) ^a ddd	4,4; 13,8; 13,8
23	28,1	28,1	CH ₃	0,97	s	
24	15,53	15,6	CH ₃	0,75	s	
25	15,30	15,3	CH ₃	0,88	s	
26	17,09	16,8	CH ₃	0,74	s	
27	25,90	26,0	CH ₃	1,12	s	
28	-	181,0	C			
29	33,05	33,1	CH ₃	0,89	s	
30	23,55	23,6	CH ₃	0,91	s	

a: Aufspaltung durch Überlagerungen nicht erkennbar

Die Aufspaltung der tieffeldverschobenen Signale konnte im Gegensatz zu SHAMMA et al. (1962), der seine Messungen an einem 40 MHz NMR-Spektrometer, jedoch mit sehr großen Substanzmengen durchgeführt hatte, in dem bei 500 MHz aufgenommenem Spektrum deutlich erkannt werden. Das Signal für das vinyloge Proton zeigte sich nicht wie beschrieben als breites Signal, sondern spaltete sich in ein Triplett auf (A-X-System), das 3α -Proton

spaltete in ein Doppelduplett bei $\delta = 3,20$, ebenso das Proton an C-18 bei $\delta = 2,84$, beide von SHAMMA et al. (1962) nicht beschrieben.

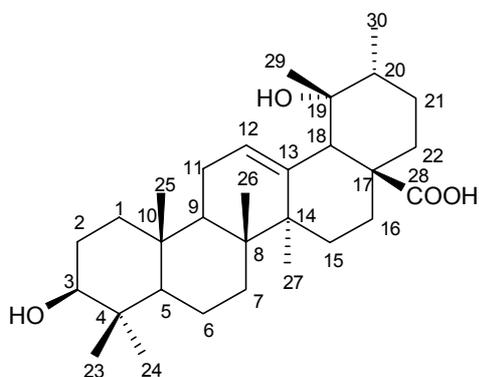
Die ^{13}C -NMR-Signale von TTS1 stimmten mit Abweichungen von 0,1-0,2 ppm mit den Literaturdaten überein (Tabelle F.1. und Abbildung F.5)

Obwohl die gaschromatographische Analyse nach Derivatisierung zwei Peaks gezeigt hatte, konnten im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum keine Hinweise bzgl. des Vorhandenseins von Ursolsäure erhalten werden. Der Hauptbestandteil des Dichlormethanextraktes war damit zweifelsfrei Oleanolsäure.

Nach HPLC-Trennung für die Reinigung von TTS2 war jedoch eine Fraktion mit Oleanolsäure erhalten worden, die im ^1H -NMR ein Duplett bei 2,18 ppm mit relativer Integration von 0,24 bezogen auf H-12 bei 5,27 ppm enthielt. Dieses Signal ist charakteristisch für das H-18 der Ursolsäure (SEO et al., 1975). Nach GC-MS- und NMR-Analyse war also nicht nur Oleanolsäure, sondern auch **Ursolsäure** im Dichlormethanextrakt enthalten.

Oleanolsäure war bereits als Inhaltsstoff von *Chaenomeles speciosa* beschrieben worden (ZHU, 1998), für Ursolsäure konnte kein Literaturhinweis gefunden werden.

2.5.3. Identifizierung von TTS2: Pomolsäure



Im HPLC-Chromatogramm (Detektion bei 200 nm) des Dichlormethanextraktes von *Chaenomeles fructus* konnten weitere Verbindungen mit ähnlichem UV-Verhalten wie Oleanolsäure detektiert werden. Bei $R_t = 15,7$ min erschien ein kleiner Peak, der nach VLC und Sephadex[®] LH 20 Trennung der Fraktion **IX** angereichert werden konnte. Um die Verbindung TTS2 sauber zu erhalten, mußte weiter über MPLC und schließlich semipräparative HPLC getrennt werden, was zur Isolierung von 8,1 mg TTS2 führte. Ein online aufgenommenes EI-MS-Spektrum (Abbildung F.2) von einer Mischfraktion aus TTS1

und TTS2 hatte ergeben, dass Verbindung TTS2 nicht den in Ring A monosubstituierten Triterpensäuren angehörte. Der Basispeak dieser Verbindung war m/z 146 und nicht m/z 248. Nach BRIESKORN et al. (1967) und PORTIER et al. (1966) führte eine weitere alkoholische Substitution an Ring E zu einer RDA-Spaltung an selbigem und lieferte m/z 146 als wichtiges Spaltprodukt. Abbildung F.1 beschreibt beispielhaft für an Ring E hydroxylierte Ursolsäurederivate den Zerfall von Pomolsäure.

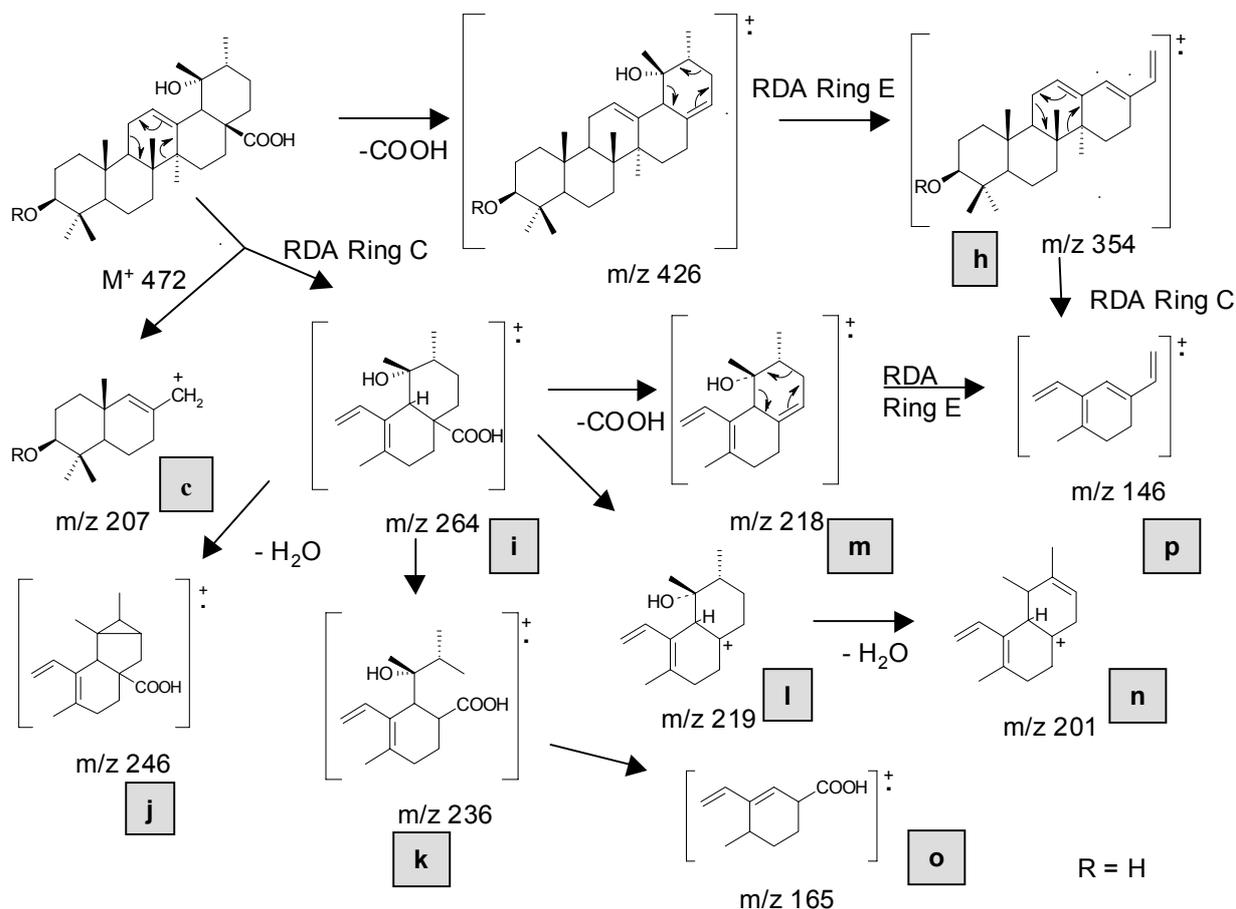


Abbildung F.1: Zerfallsschema für Δ^{12} -ungesättigte Ursane mit weiterer alkoholischer Substitution an Ring E am Beispiel der Pomolsäure (nach BRIESKORN et al., 1967)

Wie bei Oleanolsäure zerbricht das Molekül im Ring C durch Retro-Diels-Alder-Spaltung. Es erscheinen die Bruchstücke m/z 207, das dem Bruchstück **c** aus Abbildung F.1 entspricht und m/z 264 (**i**), das Bruchstück **a** entspricht, jedoch eine weitere OH-Gruppe trägt. Spaltet hiervon nun ein Molekül Wasser ab, erhält man Bruchstück **j**. Bei Ringöffnung von Ring E kann dieser über m/z 236 (**k**) ohne Verlust der Carboxylfunktion komplett verloren gehen (Bruchstück **o**, m/z 165).

Verliert das Bruchstück **i** jedoch zuerst die Carboxylfunktion, entstehen einerseits die Fragmente **l** und **n**, andererseits kann eine Doppelbindung in Ring E entstehen (m/z 218; **m**),

Die grobe Zuordnung der Verbindung zur Gruppe der Triterpensäuren durch das Massenspektrum konnte durch ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung F.3) weiter abgesichert werden. Das Doppelduplett bei 3,16 ppm zeigte durch seine Verschiebung und die Kopplungskonstanten von 4,4 Hz und 11,4 Hz, dass es sich um eine Verbindung mit einer 3β -Hydroxylgruppe vom Oleanan- oder Ursantyp handeln mußte (AL-HAZIMI et al., 1987). Das tieffeldverschobene Triplet bei 5,28 ppm bestätigte die massenspektrometrischen Befunde einer Doppelbindung zwischen C-12 und C-13.

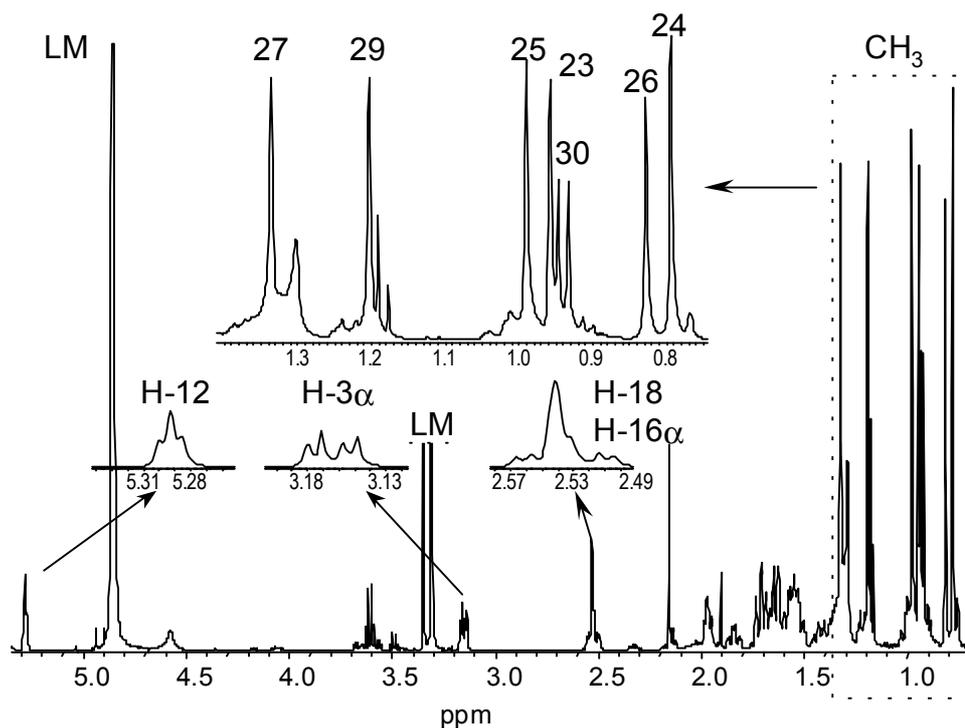


Abbildung F.3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pomolsäure in d_4 -Methanol

Im hohen Feld konnten sieben Methylsignale erkannt werden. Das weiteste ins Hochfeld verschobene Methylsignal lag bei 0,78 ppm. Dies war nach SHAMMA et al. (1962) ein Hinweis auf eine Carbonsäurefunktion an Position C-28. Sechs der Signale erschienen als scharfe Singulets, während das Signal bei 0,93 ppm zum Duplett aufgespalten war. Dies war ein Hinweis auf das Vorliegen eines α -Amyrin-Grundkörpers, wobei eine der beiden Methylgruppen kein Proton in Nachbarschaft tragen durfte.

Aus dem Massenspektrum konnten keinerlei Hinweise auf die Position und Stellung der OH-Funktion an Ring E erhalten werden. Das ^1H -Spektrum zeigte deutliche Hinweise auf die Existenz einer tertiären Alkoholgruppe. Neben der Aufspaltung von nur einer Methylgruppe, war das bei der Oleanolsäure als Duplett auftretende Signal des Protons an C-18 als Singulett vorhanden und um 0,27 ppm zu 2,53 ppm ins höhere Feld verschoben. Damit konnte gezeigt werden, dass die Alkoholgruppe sich an Position 19 befinden mußte. Die paramagnetisch

induzierte Entschirmung der Methylgruppen Me-29 (1,23 ppm) und Me-27 (1,19 ppm) gegenüber Ursolsäure für geminale und vicinale Gruppen beschrieb DELAGO et al. (1989) als typisch für 19 α -OH.

Auffällig war das Signal zwischen 2,49 und 2,57 ppm, bei dem neben dem Singulett von H-18 ein weiteres Signal mit dreifacher Kopplung erkannt werden konnte. Das $^1\text{H},^1\text{H}$ - und das $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum gaben Aufschluß über die Zuordnung dieses Signals. Aus dem $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Spektrum war ersichtlich, dass das Signal bei 1,84 ppm mit dem C-Atom bei 30,01 ppm korreliert, das nach dem ^{13}C DEPT 135 einer CH_2 -Gruppe entspricht. Gemäß Literatur konnte diese CH_2 -Gruppe dem Kohlenstoff an C-15 zugeordnet werden. Daraus ließen sich weitere Signale über ihr Kopplungsmuster zuordnen. Da sich die fünf Cyclohexanringe der Triterpensäuren energetisch möglichst günstig anordnen, liegen alle Ringe in Sesselform vor, wobei allerdings die Ringe C und D leicht verdrillt sind. Durch diese starre Konformation lassen sich drei unterschiedliche vicinale Kopplungen beobachten (nach HESSE et al., 1995).

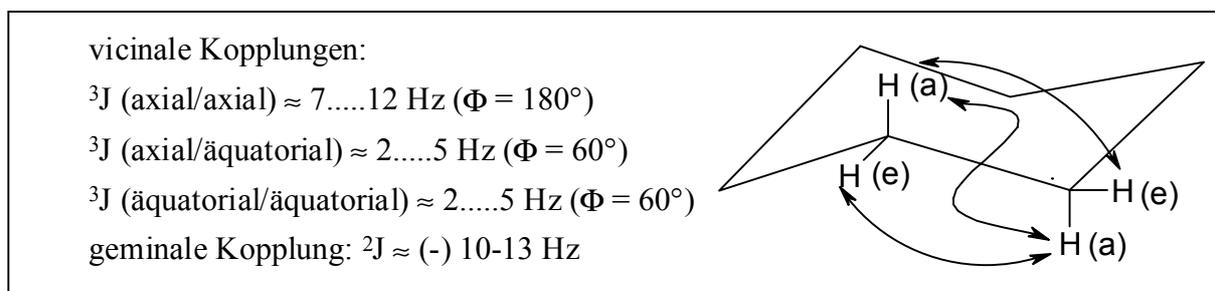


Abbildung F.4: NMR- $^1\text{H},^1\text{H}$ -Kopplungen in starren Sechsringen in Sessel-Konformation

Über diesen Zusammenhang konnte weiterhin zugeordnet werden: das Proton 15 α bei 0,98 ppm mit großer geminaler Kopplung von 13,2 Hz zu H-15 β und das Signal von H-16 β bei 1,53 ppm mit kleiner Kopplungskonstante. H-16 β zeigte wiederum eine große Kopplung zum Signal H-16 α bei 2,52 ppm, das sich mit dem Signal des Protons an C-18 überlagerte. GUANG-YI et al. (1989) beschrieben das Proton von 16 α an dieser Stelle, während NUMATA et al. (1989) dem Signal bei 2,52 ppm das Proton 16 β zuordneten. Eigene Strukturaufklärung führten eindeutig zum Proton 16 α , da ein Proton nur dann zwei große und eine kleine Kopplungskonstante aufwies, wenn eine Kopplung zwischen zwei axialen Protonen stattfand.

Das Aussehen und die Verschiebung dieses Signals beschrieben AIMI et al. (1989) als Doppeltriplett, das durch den Anisotropieeffekt von 19 α und zusätzlich noch durch den gleichen Effekt der Δ 12- Doppelbindung ins Tieffeld verschoben wird. Dieser Effekt konnte nur auftreten, wenn die Ringe D und E *cis*-verknüpft waren. Aus dem $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY konnten weitere Signale zugeordnet werden (vgl. Abbildung F.5), die in Tabelle F.1 zusammengefaßt sind.

Tabelle F.1: NMR-Daten von Pomolsäure in *d*₄-Methanol

C	¹³ C, δ	DEPT	¹ H, δ	Aufspaltung	Kopplung (Hz)	HMBC
1	39,5	CH ₂		(m) ^a		
2	28,2	CH ₂		(m) ^a		
3	80,1	CH	3,16	dd	4,4; 11,4	
4	40,1	C				
5	57,1	CH	0,77	d	10	
6	19,9	CH ₂	1,40	(m) ^a		
7	34,6	CH ₂	1,57 1,31	(m) ^a (m) ^a		
8	42,9	C				
9	49,0*	CH	1,71	(m) ^a		
10	38,5	C				
11	25,0	CH ₂	1,97	(m) ^a		
12	129,6	CH	5,28	t	3,1	
13	140,5	C				
14	41,4	C				
15	30,0	CH ₂	α 0,98 β 1,84	(m) ^a ddd	3,8; 13,2; 13,8	
16	27,7	CH ₂	α 2,52 β 1,53	ddd m	4,4; 13,8; 13,9	
17	*	C				
18	55,6	CH	2,53	s		
19	74,1	C				
20	43,4	CH	1,35	(m) ^a		
21	27,5	CH ₂	α 1,63 β 1,00	(m) ^a ddd	8,8; 5,0; 10,0	
22	40,2	CH ₂	α 1,69 β 1,21	(m) ^a (m) ^a		
23	29,1	CH ₃	0,98	s		24, 4, 5, 3
24	16,6	CH ₃	0,78	s		23, 4, 5, 3
25	16,2	CH ₃	0,95	s		10, 9, 5
26	17,9	CH ₃	0,82	s		7, 8, 9
27	25,1	CH ₃	1,32	s		15, 8, 13
28		C				
29	27,1	CH ₃	1,19	s		20, 18, 19
30	16,9	CH ₃	0,93	d	5,1	21, 20, 19

* unter Methanolsignal, Angabe aus 2D-Spektren, a: Aufspaltung durch Überlagerungen nicht erkennbar

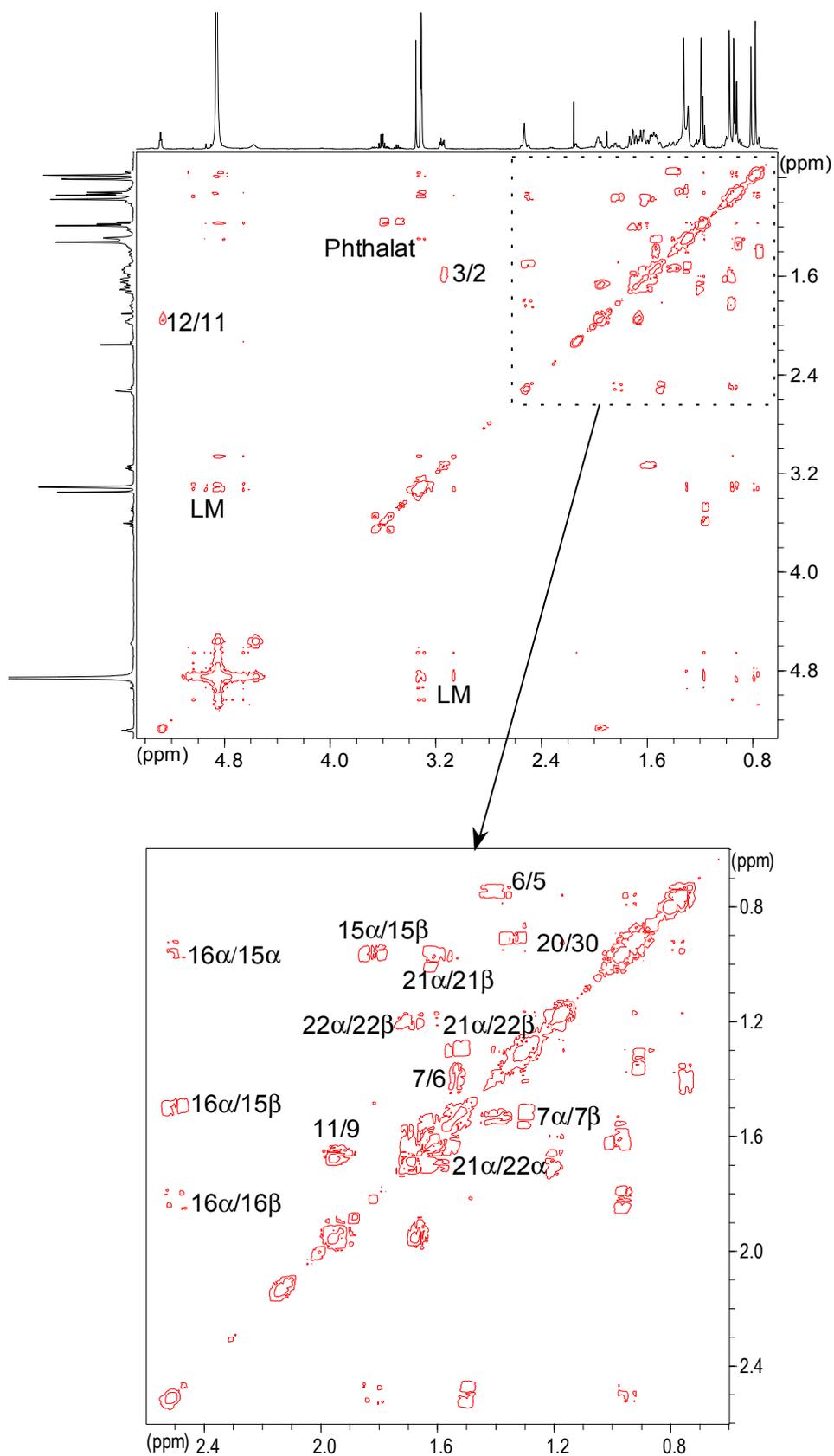


Abbildung F.5: ^1H - ^1H -COSY von Pomolsäure in d_4 -Methanol

Im ^{13}C -Spektrum von Pomolsäure (TTS2) erschienen 29 Signale. Das Signal des sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffs der Carboxylfunktion war aufgrund der schlechten Signal/Noise Verhältnisse nicht erkennbar. Das DEPT 135 zeigte 9 CH_2 Gruppen und 13 positive Signale für CH- oder CH_3 -Gruppen (siehe Abbildung F.6). Im Tieffeld erschienen zwei Signale, die nochmals als Beweis für einen Δ^{12} -ungesättigten Ursangrundkörper dienen. Die Shiftdifferenz zwischen C-12 und C-13 war deutlich geringer als bei Oleanentriterpenen.

Über ein HMBC-Spektrum konnten die Signale der Methylgruppen und deren Korrelationspartner zugeordnet werden. Das Signal von C-9 lag unter dem Lösungsmittel-signal, erschien aber als deutlich differenzierbarer Peak im DEPT 135. In Tabelle F.1 sind die Daten im Überblick dargestellt.

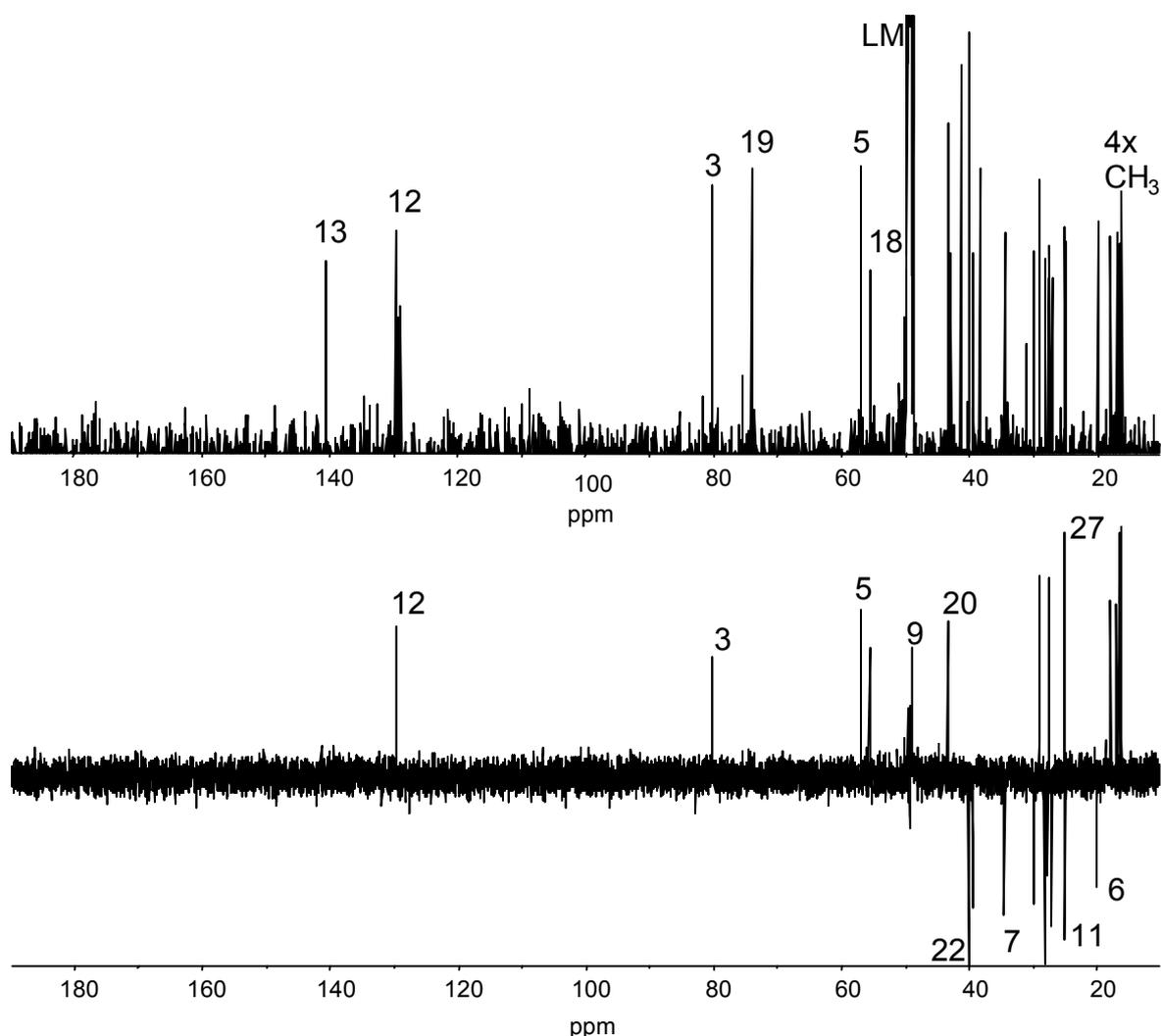


Abbildung F.6: ^{13}C - und DEPT 135-Spektrum von Pomolsäure in d_4 -Methanol

Da in der Vergangenheit die meisten Spektren der Vergleichssubstanz in d_5 -Pyridin oder der Pomolsäuremethylester in deuteriertem Chloroform gemessen worden waren, fiel der Literaturvergleich schwer (möglicher Vergleich mit LIANG et al. (1990) mit $3\beta,6\alpha,19\alpha$ Trihydroxyurs-12-en-28-säure). Eine zusätzlich durchgeführte Messung in d_5 -Pyridin erbrachte schließlich den Beweis der Struktur von TTS2 als Pomolsäure. Tabelle F.2 gibt die ^{13}C -Daten wieder.

Tabelle F.2: ^{13}C -NMR Daten von Pomolsäure mit Literaturvergleich nach KAKUNO et al. (1992) gemessen in d_5 -Pyridin

Position	δ [ppm]	δ [ppm] Lit.	Position	δ [ppm]	δ [ppm] Lit.
1	38,9	38,9	16	26,3	26,3
2	27,9	28,0	17	48,2	48,2
3	78,2	78,2	18	54,9	54,5
4	39,2	39,3	19	72,6	72,7
5	55,8	55,8	20	42,3	42,3
6	18,8	18,9	21	27,0	27,0
7	33,5	33,6	22	38,4	38,4
8	40,2	40,3	23	28,7	28,7
9	47,6	47,7	24	16,7	16,7
10	37,2	37,3	25	15,4	15,5
11	23,9	24,0	26	17,1	17,1
12	127,9	128,1	27	24,6	24,6
13	139,9	139,9	28	n.b.	180,6
14	42,0	42,1	29	27,0	26,8
15	29,2	29,2	30	16,4	16,4

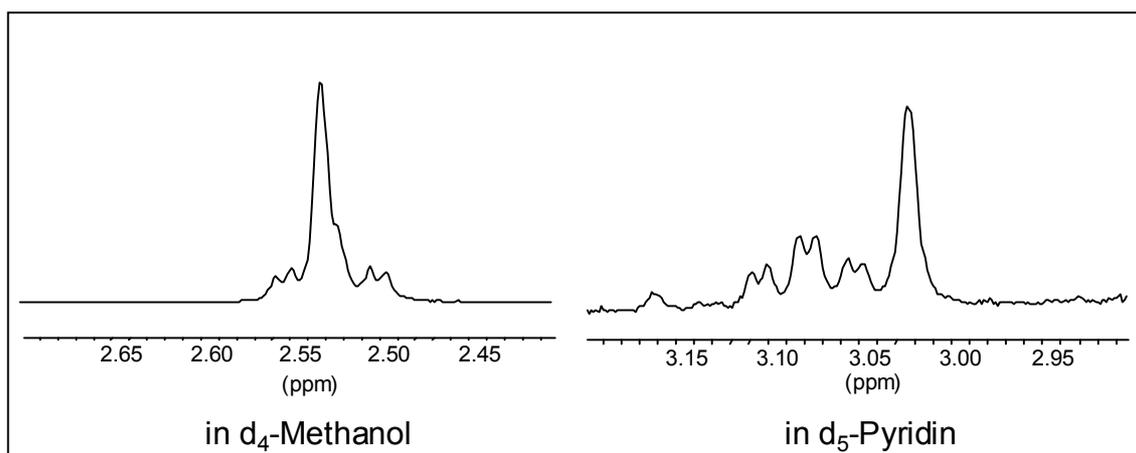


Abbildung F.7: Protonensignale von H18 und H16 α in deuteriertem Methanol im Vergleich zu Pyridin bei Pomolsäure

In deuteriertem Pyridin waren die Signale für die Protonen 18 und 16 α ins Tieffeld verschoben, jedoch nicht gleichmäßig, so dass beide Signale gut aufgelöst erschienen. AIMI et al. (1989) beschrieben diesen durch Anisotropie bedingten Shift zu 3,02 bzw. 3,08 ppm (Abbildung F.7).

Dieses Signal konnte bei allen im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärten Triterpensäuren wiedergefunden werden, deren Ringe D und E *cis*-verknüpft waren und in Position 19 α eine zusätzliche Hydroxylgruppe trugen. Neben dem typischen MS-Aufspaltungsmuster war das ¹H-NMR-Spektrum damit wertvolle Identifizierungshilfe.

2.5.4. Identifizierung von TTS3: Euscaphissäure und Tormentolsäure

Bei den DC-Analysen (**FCM1**, Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz) fielen im unteren R_f-Bereich hellblaue Zonen auf. Diese Substanzen wurden durch offene Kieselgel-Säulenchromatographie angereichert, ließen sich jedoch nicht von den violetten Zonen im Bereich R_f = 0,5 trennen. Die Abtrennung dieser Verbindungen gelang durch präparative DC auf DC-Platten mit 1000 μ m Schichtdicke im Laufmittelsystem **Chloroform : Methanol 90 : 3**. Hieraus resultierte ein Substanzgemisch mit mindestens drei Verbindungen. Diese waren mit HPLC auf RP18-Material teilweise trennbar, waren aber wegen ihrer geringen Konzentration im HPLC-Chromatogramm des Extraktes bisher nur schwach sichtbar gewesen. Über MPLC auf RP-18-Material konnte eine weitere Anreicherung von zwei Substanzen erreicht werden, und anschließende Reinigung mit präparativer HPLC auf RP18-Material ermöglichte die Aufklärung der drei Hauptkomponenten TTS3a, TTS3b und TTS4.

Die Liebermann-Burchard-Reaktion verlief bei allen Verbindungen positiv. Die online aufgenommenen UV-Spektren zeigten wiederum nur Endabsorption.

Massenspektrometrisch konnte für das Gemisch aus TTS3a und TTS3b mit Direkteinlaß und chemischer Ionisation für beide Verbindungen das Molekulargewicht von MG = 488 bestimmt werden. Das DEI-Massenspektrum lieferte als Basispeak m/z 146 (Abbildung F.1). Dieses Fragment war ein deutlicher Strukturhinweis auf Δ 12-ungesättigte Oleanan- oder Ursangrundkörper mit weiterer OH-Gruppe an Ring E. Im EI-MS-Spektrum waren zweimal Wasserabspaltungen zu m/z 470 und 452 sowie die Abspaltung des Bruchstückes m/z 46 zu erkennen. Dies ließ eine Carboxylfunktion erwarten. Charakteristisch war das Fragment bei m/z 370, das dem Bruchstück **h** aus Abbildung F.1 entspricht, jedoch noch eine weitere alkoholische Substitution trägt. Weitere Bruchstücke aus diesem Zerfallsschema konnten ebenfalls gefunden werden, wobei die Fragmente von Ring D und E ohne Abweichungen zur Pomolsäure auftraten. Die zusätzliche OH-Gruppe mußte damit an Ring A oder B positioniert sein.

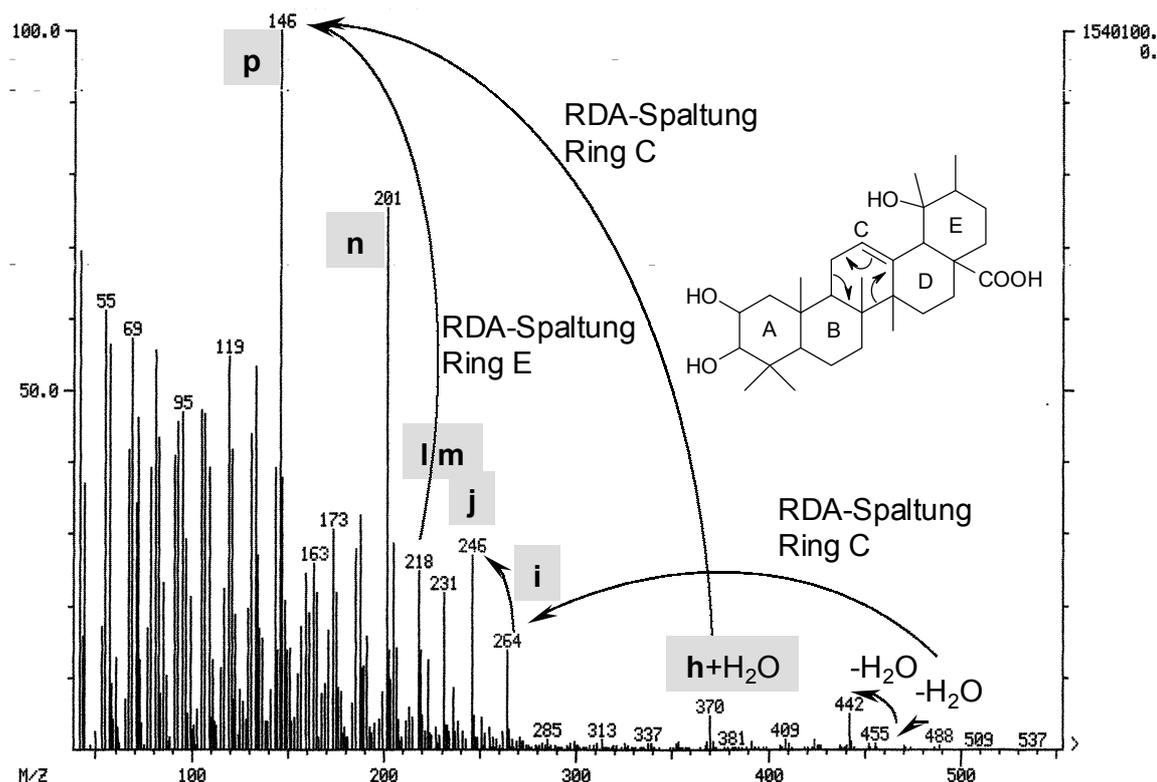
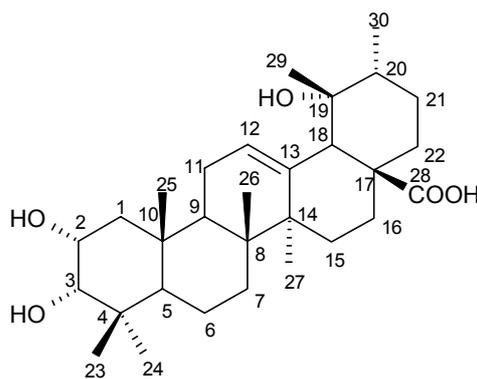


Abbildung F.1: EI-MS-Spektrum von Euscaphissäure und Tormentolensäure

TTS3a: Euscaphissäure



Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung F.2) zeigte im Hochfeld 6 Singulettssignale für Methylgruppen bei 0,80, 0,87, 0,99, 0,99, 1,19 und 1,35 ppm. Das Methylsignal bei 0,93 ppm war zum Duplett ($J = 6,9$) aufgespalten. Dies war ein Hinweis auf eine sekundäre Methylgruppe. Erwartungsgemäß konnte so auch bei 2,52 ppm ein Singulett für das Proton an C-18 beobachtet werden. Im tiefen Feld ließ sich bei 5,30 ppm ein Signal mit Tripletstruktur

erkennen, das Merkmal eines Δ^{12} -ungesättigten Oleanan- oder Ursangrundkörpers ist. Daraus ergab sich eine Struktur, die im Ring D und E der Pomolsäure gleich.

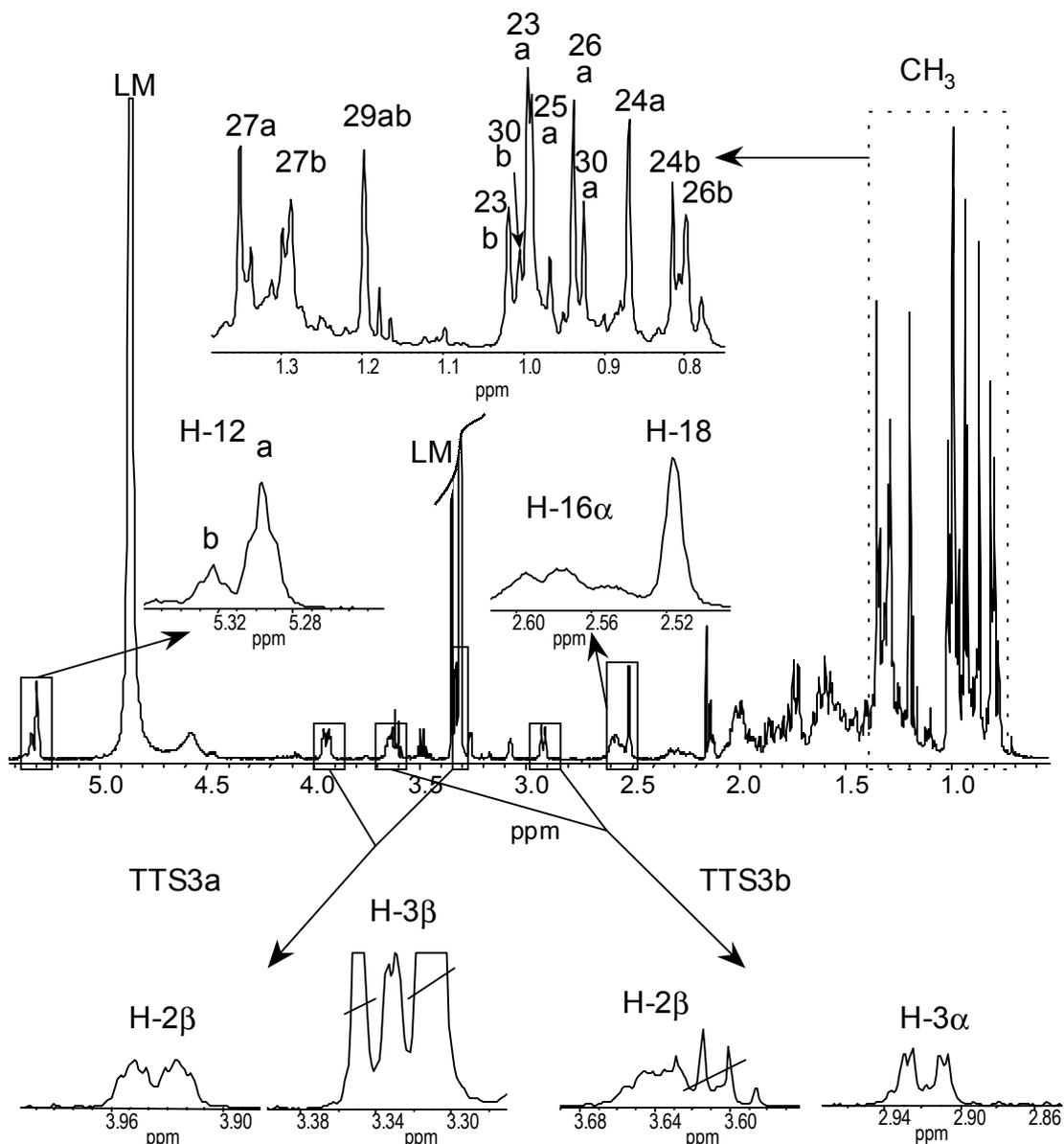


Abbildung F.2: ^1H -NMR-Spektrum von Euscaphissäure und Tormentolsäure in d_4 -Methanol

Aus dem EI-MS Spektrum war hervorgegangen, dass sich am Ring A oder B eine weitere Hydroxylgruppe befinden mußte. Die benachbarten Protonen mußten im ^1H -NMR-Spektrum tieffeldverschoben liegen. Das ^1H - ^1H -Korrelationsspektrum zeigte Kopplungen zwischen dem „Duplett vom Duplett vom Duplett“ bei 3,93 ppm und dem Duplett bei 3,33 ppm. Dieses Aufspaltungsmuster war nur zu erwarten, wenn beide OH-Gruppen vicinal lagen, wie dies an den Positionen 2 und 3 oftmals zu beobachten ist. Literaturvergleiche mit den verschiedenen Konfigurationen $2\alpha,3\beta$ -OH, $2\beta,3\beta$ -OH und $2\beta,3\alpha$ -OH, harmonisierten aufgrund der Kopplungskonstanten und der Verschiebungen der Methylgruppen nicht mit dem

vorliegenden Spektrum. Durch die Studie von KOJIMA et al. (1988) über Dihydroxyursol-säurederivate war für TTS3a aufgrund der Kopplungskonstanten 11,3, 3,5 und 3,1 Hz nur die Konfiguration 2 α ,3 α möglich.

Die Konfiguration 2 α ,3 β würde das Signal für das Proton an C-2 in ein ddd mit zwei großen und einer kleinen Kopplung spalten, 2 β ,3 α erschien in ähnlicher Aufspaltung, 2 β ,3 β hätte dagegen nur kleine Kopplungskonstanten.

In der folgenden Tabelle sind die Zuordnungen der einzelnen Signale aus den ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC und HMBC-Experimenten für Euscaphissäure zusammengefaßt.

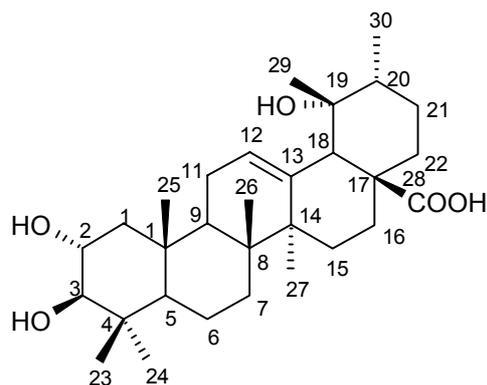
Tabelle F.1: NMR-Daten von Euscaphissäure in d_4 -Methanol gemessen

Position	^{13}C , δ	DEPT	^1H , δ	Aufspaltung	Kopplung (Hz)	HMBC
1	42,8	CH ₂	1,20 1,52	(m) ^a (m) ^a		
2	67,5	CH	3,93	ddd	11,3; 3,5; 3,1	
3	80,4	CH	3,33	d	3,1	
4	39,7	C				
5	49,6	CH	0,78	d	10,1	
6	19,6	CH ₂		(m) ^a		
7	34,4	CH ₂		(m) ^a		
8	42,9	C				
9	43,4	CH	1,74	(m) ^a		
10	39,7	C				
11	27,0	CH ₂	2,0	(m) ^a		
12	129,6	CH	5,30	t	3,1	
13	140,4	C				
14	48,4*	C				
15	29,9	CH ₂		(m) ^a		
16	25,0	CH ₂	α 2,58 β 1,78	ddd (m) ^a	4,4; 13,8; 13,9	
17	49,3*	C				
18	55,4	CH	2,52	s		
19	74,0	C				
20	43,4	CH	1,76	(m) ^a		
21	27,6	CH ₂	1,41 1,23	(m) ^a (m) ^a		
22	39,3	CH ₂	1,22 1,09	(m) ^a (m) ^a		
23	29,6	CH ₃	0,99	s		24, 4, 5, 3
24	22,7	CH ₃	0,87	s		23, 4, 5, 3
25	16,9	CH ₃	0,99	s		10, 9, 5
26	17,2	CH ₃	0,94	s		7, 8, 9
27	25,2	CH ₃	1,35	s		15, 8, 13
28	183,0	C				
29	27,4	CH ₃	1,19	s		20, 18, 19
30	17,2	CH ₃	0,93	d	6,9	21, 20, 19

a: Aufspaltung durch Überlagerung nicht erkennbar

Vergleichende ^{13}C -Daten aus der Literatur waren nur für Messungen in deuteriertem Pyridin zu finden, welches weitere pharmakologische Untersuchungen gestört hätte und deshalb nicht als Lösungsmittel eingesetzt werden sollte (vgl. GUANG-YI et al., 1989; TAKAHASHI et al., 1974).

TTS3b: Tormentolsäure



Das DCI-MS-Spektrum hatte für TTS3a und b einen einheitlichen Quasimolekülpeak von $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 506$ geliefert. Jedoch wies das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung F.2) von TTS3 neben den Signalen von Euscaphissäure weitere Protonensignale im Tieffeld auf. Bei 5,32 ppm war ein Triplett zu finden, das von einer weiteren Verbindung aus derselben Klasse wie TTS3a stammen musste. Mit gleicher Intensität erschien ein nicht ganz deutliches ddd-Signal bei 3,64 ppm und ein damit koppelndes Duplett bei 2,92 ppm. DE TOMMASI et al. (1996) fanden diese Signale bei Tormentolsäureglycosiden in *Margyricarpus setosus*. Da Tormentolsäure im MS-Spektrum nicht unterscheidbar von Euscaphissäure ist, war das NMR-Spektrum sowie ^1H - und $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren entscheidend für die weitere Strukturklärung.

Das ^1H -Korrelationsspektrum zeigte Kopplungen zwischen den Signalen bei 3,64 ppm und 2,92 ppm. Das tieffeldverschobene Signal hatte die typische Aufspaltung für die Stellung $2\alpha\text{-OH}$, $3\beta\text{-OH}$ mit zwei großen und einer kleinen Kopplung von 10, 11 und 3 Hz. Trotz der weiteren Aufspaltung für das Signal bei 2,92 konnten keine Korrelationen im 2D-Experiment beobachtet werden. Möglich wäre, dass es bei diesem Signal - ermöglicht durch die Stellung der OH-Gruppe an Position 3 - zu einer W-Kopplung zum Proton an C5 kam und dadurch eine weitere Aufspaltung des Signals bedingt wurde.

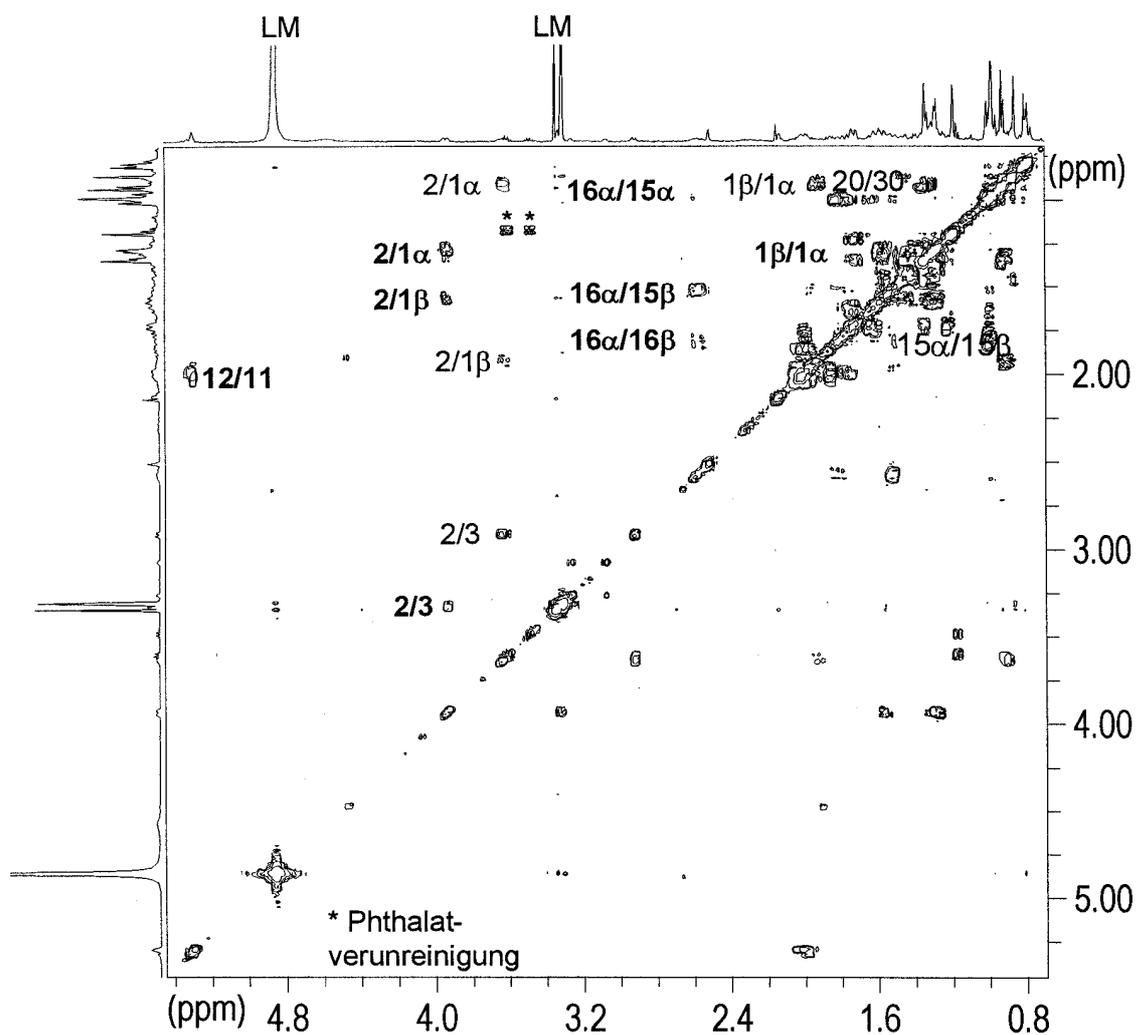


Abbildung F.3: $^1\text{H}^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum von Euscaphissäure und Tormentolensäure in d_4 -Methanol
 Über das HMBC-Spektrum konnten die Methylgruppen lokalisiert und auch weitere Peaks zugeordnet werden.

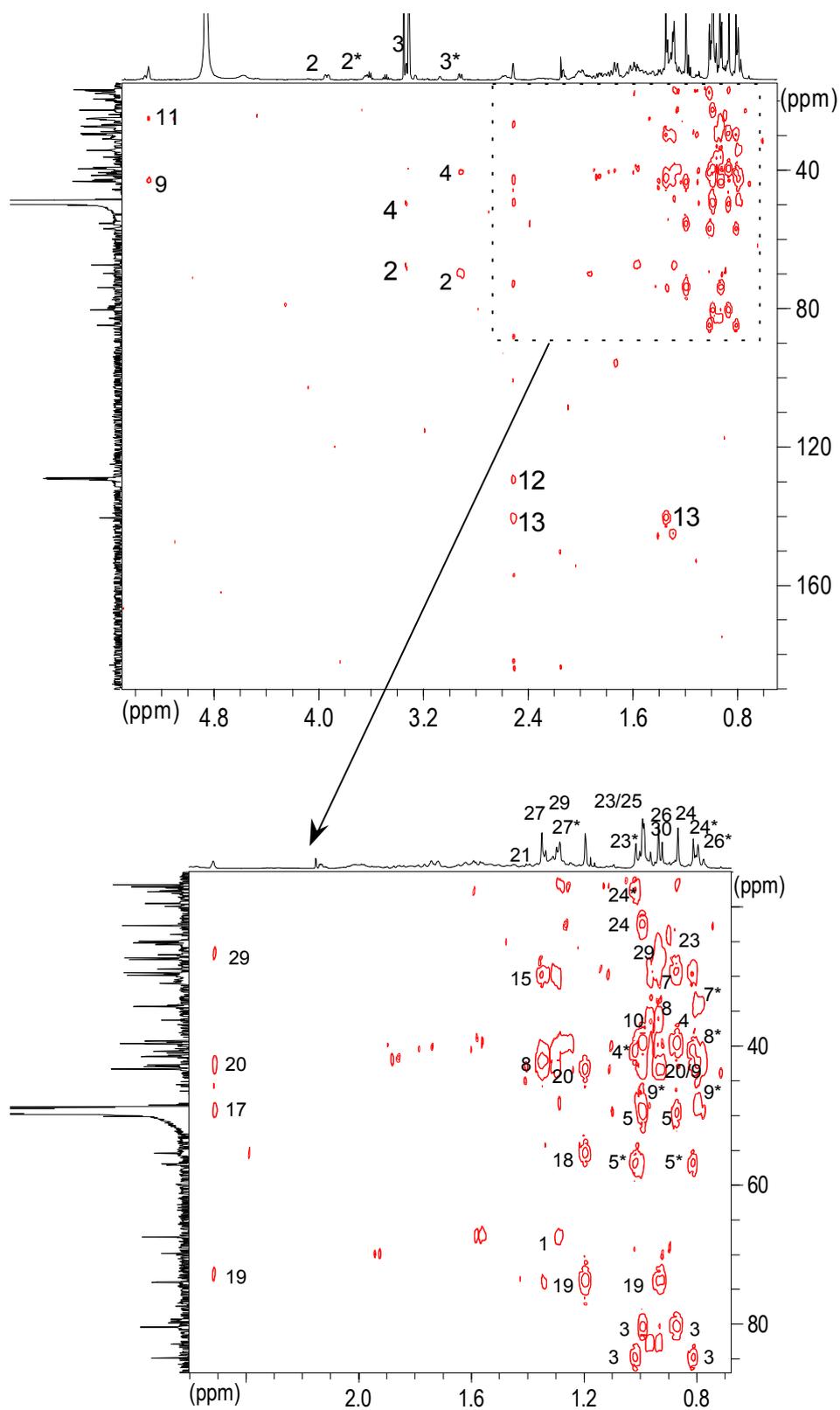


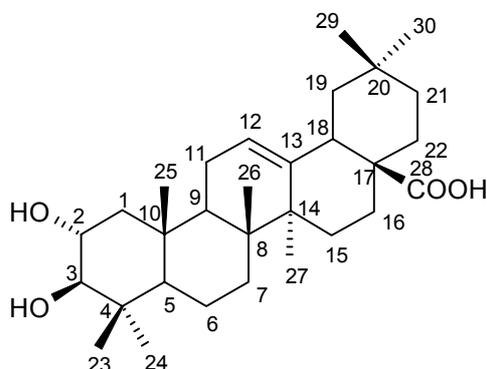
Abbildung F.4: HMBC-Spektrum von Euscaphissäure und Tormentolsäure in d_4 -Methanol

Tabelle F.2: NMR-Daten zu Tormentolsäure in *d*4-Methanol mit Literaturvergleich DE TOMMASI et al. (1996)

Position	¹³ C, δ	Lit.	DEPT	¹ H, δ	Aufspaltung	Kopplung (Hz)	HMBC
1	48,3*	48,41	CH ₂	α 1,87 β 1,31	(m) ^a (m) ^a		
2	69,8	69,91	CH	3,64	ddd	10; 11; 3	
3	84,8	85,96	CH	2,92	d	10	
4	39,5	39,40	C				
5	57,0	54,74	CH	0,77	d	10	
6	20,0	21,10	CH ₂		(m) ^a		
7	34,2	34,24	CH ₂		(m) ^a		
8	43,0	41,00	C				
9	48,5	47,68	CH		(m) ^a		
10	40,4	38,44	C				
11	27,0	26,88	CH ₂		(m) ^a		
12	129,5	129,52	CH		(t)	3	
13	140,4	139,46	C				
14	48,4*	48,10	C				
15	29,7	29,46	CH ₂		(m) ^a		
16	25,2?	24,84	CH ₂	α 2,58	ddd	4; 14; 14	
17	49,3*	48,06	C				
18	55,4	54,86	CH	2,52	s		
19	74,0	72,88	C				
20	43,4	42,34	CH		(m) ^a		
21	27,6	26,45	CH ₂		(m) ^a		
22	39,3	38,10	CH ₂		(m) ^a		
23	17,7	19,13	CH ₃	1,02	s		24, 4, 5, 3
24	29,0	27,76	CH ₃	0,81	s		23, 4, 5, 3
25	17,9	17,80	CH ₃	0,96	s		10, 9, 5
26	17,7	17,46	CH ₃	0,80	s		7, 8, 9
27	25,5	25,00	CH ₃	1,30	s		15, 8, 13
28	181,9	182,08	C				
29	27,4	25,74	CH ₃	1,20	s		20, 18, 19
30	17,2	15,90	CH ₃	1,01	d	5,7	21, 20, 19

* unter Methanolsignal, Angabe aus den 2D-Experimenten; a: Aufspaltung durch Überlagerungen nicht erkennbar

2.5.5. Identifizierung von TTS4: 2 α ,3 β -Dihydroxyoleanolsäure (Maslinsäure)



Eine weitere Hauptkomponente aus der präparativen DC-Auftrennung, MPLC-Anreicherung und präparativer HPLC-Reinigung (vgl. TTS3a und b) erschien bei HPLC-Trennungen mit der Methode **CHAENAN** bei 16,3 min und zeigte im online aufgenommenen UV-Spektrum ausschließlich Endabsorption. Auf dem DC konnte sie bei einem R_f-Wert von ca. 0,3 mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz hellblau detektiert werden. Sie ließ sich auch mit Liebermann-Burchard-Reagenz anfärben. Diese Beobachtungen zeigten, dass es sich bei der Verbindung wiederum um eine Triterpensäure handeln mußte.

Über Direkteinlaß konnte mit chemischer Ionisation der Quasimolekülpeak [M+NH₄]⁺ bei 490 detektiert werden, was einem Molekulargewicht von 472 entspricht. Das mit Direkteinlaß gemessene EI-MS-Spektrum (Abbildung F.1) zeigte als Basispeak m/z 203. Dieser Peak war bereits bei TTS1 aufgetaucht. Vergleiche mit dem Zerfallschema in Abbildung F.1 ließen alle charakteristischen Signale für ein Δ^{12} -ungesättigtes Oleanol- oder Ursolsäurederivat erkennen. Alle Bruchstücke der Ringe D und E aus der Retro-Diels-Alder-Spaltung waren analog der Oleanolsäure vorhanden, jedoch war das Bruchstück **c** (m/z 207) nicht sichtbar, sondern es erschien bei m/z 223 ein Peak, der dem Bruchstück **c** mit einer weiteren Hydroxylgruppe entsprach. Die Hydroxylgruppe mußte daher an Ring A oder B lokalisiert sein.

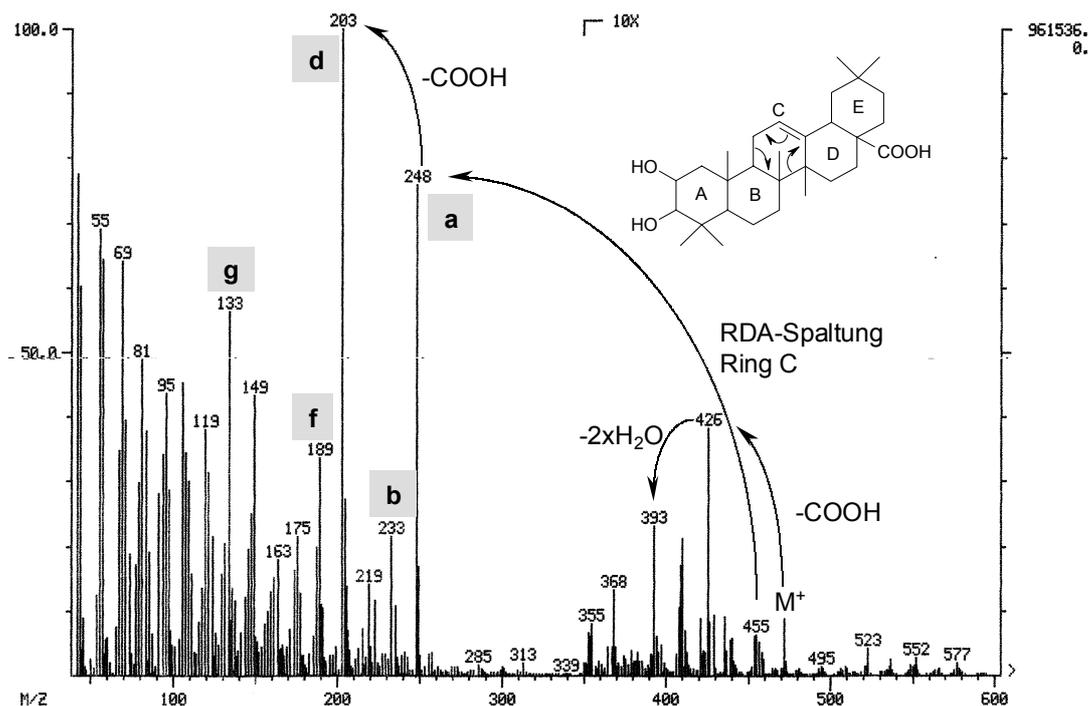


Abbildung F.1: EI-MS-Spektrum von Maslinsäure

Das ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung F.2) von TTS4 zeigte ein Tripletts bei 5,28 ppm. Die Verschiebung und die Kopplungskonstante von 3 Hz bestätigten das Vorliegen eines Urs-12-en oder Olean-12-en-Derivates. Ein als ddd aufgespaltenes Signal bei 3,68 ppm und ein Duplett bei 2,99 ppm zeigten bezüglich ihrer Aufspaltung, dass die im MS beobachteten Hydroxylgruppen nebeneinanderliegen mußten. Nur wenn Position 2 ebenfalls substituiert ist, spaltet das Signal für das Proton an C-3 zum Duplett. Das ddd-Signal für das Proton an C-2 war leider durch ein Signal eines mittelierten Phthalates verdeckt, so dass aus dem ¹H-Spektrum keine genaue Aufspaltung erkannt werden konnte.

Ein Doppelduplett bei 2,81 ppm war das vierte tieffeldverschobene Signal, das dem Proton an C-18 zuzuordnen war. Da für Ursolsäurederivate dieses Proton als Duplett ohne weitere Aufspaltung erscheint, hier aber eine Kopplung von 9 Hz und 3 Hz sichtbar wurde, konnte es sich nicht um ein Ursolsäurederivat handeln. Eine Aufspaltung der Methylgruppen im Hochfeld war ebenfalls nicht zu erkennen. Hier lagen sieben Singulets für CH₃-Gruppen zwischen 1,12 ppm und 0,76 ppm. Dazwischenliegend waren weitere mehrfach aufgespaltene Protonensignale sichtbar.

Um die Konfiguration der beiden OH-Gruppen zu bestimmen, wurden die vorliegenden Daten mit der Literatur nach KOJIMA et al. (1989) verglichen. Das Aufspaltungsmuster des Protons H-2 entsprach weder 2 α ,3 α - noch 2 β ,3 β - Konfiguration. Die anderen beiden Möglichkeiten waren danach nicht unterscheidbar. Die chemischen Verschiebungen bestätigten jedoch die Annahme, dass es sich um das biogenetisch begünstigte 2 α ,3 β -Derivat handeln mußte.

Literaturvergleich mit den von YAGI et al. (1978) aus Zizyphi fructus isolierten Maslinsäurederivaten bestätigten das Vorhandensein von $2\alpha,3\beta$ -Dihydroxyoleanolsäure.

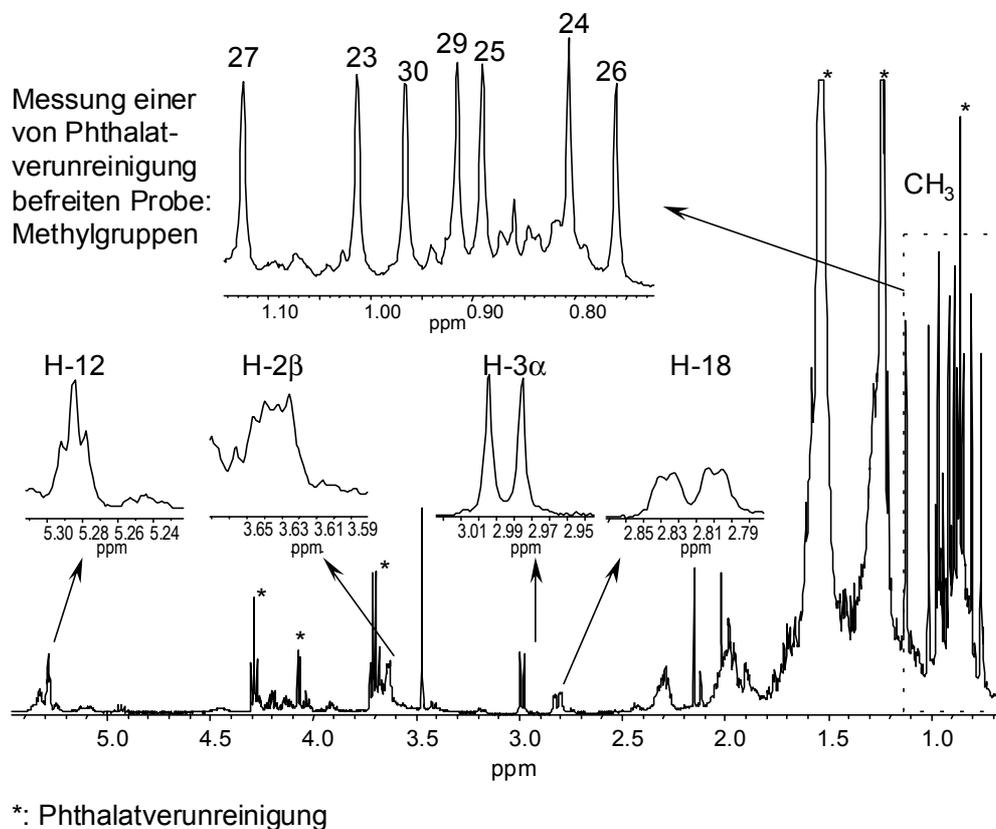


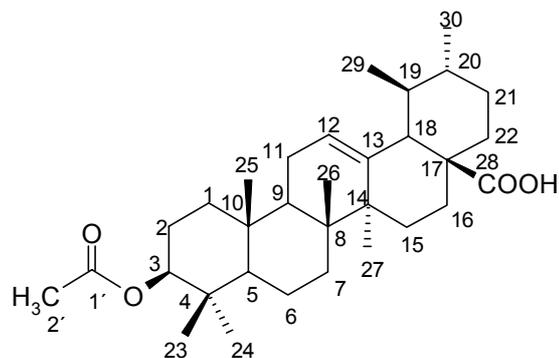
Abbildung F.2: ^1H -NMR-Spektrum von Maslinsäure in CDCl_3

Tabelle F.1: ^1H -NMR-Daten von $2\alpha,3\beta$ -Dihydroxyoleanolsäure gemessen in CDCl_3 mit Literaturvergleich

Protonensignal	$2\alpha, 3\beta$ -Dihydroxyoleanolsäure (Maslinsäure)	Lit.: YAGI et al.,1978 Methylmaslinat
2β -H	3,64 ppm (1H; ddd)	3,66 ppm (1H; m)
3α -H	2,99 ppm (1H; d; $J = 9,5$)	2,97 ppm (1H; d; $J = 10$ Hz)
12-H	5,28 ppm (1H; t; $J = 3,5$)	5,28 ppm (1H; t; $J = 4$ Hz)
18-H	2,81 ppm (1H; dd; $J = 13,9; 3,8$)	2,85 ppm (1H; dd; $J = 14; 4$)
23-H_3	1,01 ppm (3H, s)	1,02 ppm (3H, s)
24-H_3	0,80 ppm (3H, s)	0,81 ppm (3H, s)
25-H_3	0,89 ppm (3H, s)	0,89 ppm (3H, s)
26-H_3	0,76 ppm (3H, s)	0,71 ppm (3H, s)
27-H_3	1,12 ppm (3H, s)	1,12 ppm (3H, s)
29-H_3	0,91 ppm (3H, s)	0,92 ppm (3H, s)
30-H_3	0,97 ppm (3H, s)	0,97 ppm (3H, s)

Euscaphissäure, Tormentolsäure und Maslinsäure als mehrfach hydroxylierte Triterpensäuren waren bisher noch nicht als Inhaltsstoffe von *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai beschrieben worden.

2.5.6. Identifizierung von TTS5: 3 β -O-Acetylursolsäure



Die Fraktion VI aus der VLC wies drei Substanzzonen auf, die sich mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz violett anfärben ließen. In dieser Fraktion konnte auch Linolsäure gefunden werden, das auf DC durch einen Fleck mit leichtem Tailing bei $R_f = 0,58$ (FMC1) erkennbar war und nach Derivatisierung mit GC-MS nachgewiesen wurde. Zwei Substanzen konnten mittels Sephadex[®] LH20 von Linolsäure und anderen Begleitstoffen abgetrennt werden. Ihre online aufgenommenen UV-Spektren deuteten an, dass es sich dabei wiederum um Triterpensäuren handeln könnte, da nur Endabsorbtion sichtbar war. Die Triterpensäuren wurden mit MPLC gereinigt, isoliert und identifiziert.

Die Substanz mit dem höchstem R_f -Wert von 0,8 färbte sich nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz rotviolett.

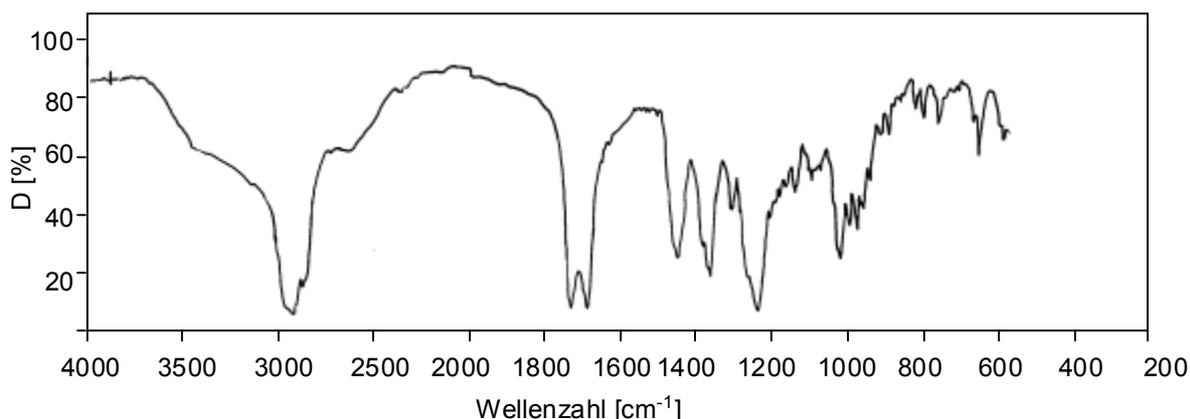


Abbildung F.1: IR-Spektrum von 3 β -O-Acetylursolsäure aufgenommen als KBr-Preßling

Ein weiteres charakteristisches Duplett lag bei $\delta = 2,16$ ppm mit einer Kopplungskonstante von 11 Hz. Dieses Duplett wies leichte Peakverbreiterung auf, jedoch zeigte es im Gegensatz zur Oleanolsäure (vgl. Abbildung F.4) keine weitere Aufspaltung. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich am Ring E in Nachbarschaft zu C-18 ein einzelnes Proton befand. Da dies beim α -Amyringrundkörpertyp möglich ist, wurde die Lage der Methylgruppen genauer analysiert. Im Bereich zwischen 1,05 ppm und 0,76 ppm konnten sieben Signale mit einer Intensität für je drei Protonen detektiert werden. Zwei dieser Signale waren zu Dupletts aufgespalten. Das Vorliegen eines Ursanderivates war damit wahrscheinlich. Eine CH_3 -Gruppe befand sich bei 2,02 ppm (s). Die Vermutung, dass eine Acetylgruppe vorlag, erhärtete sich damit. Da sich am Skelett nur eine Möglichkeit einer Acetylierung befand, war die Position 3β sicher.

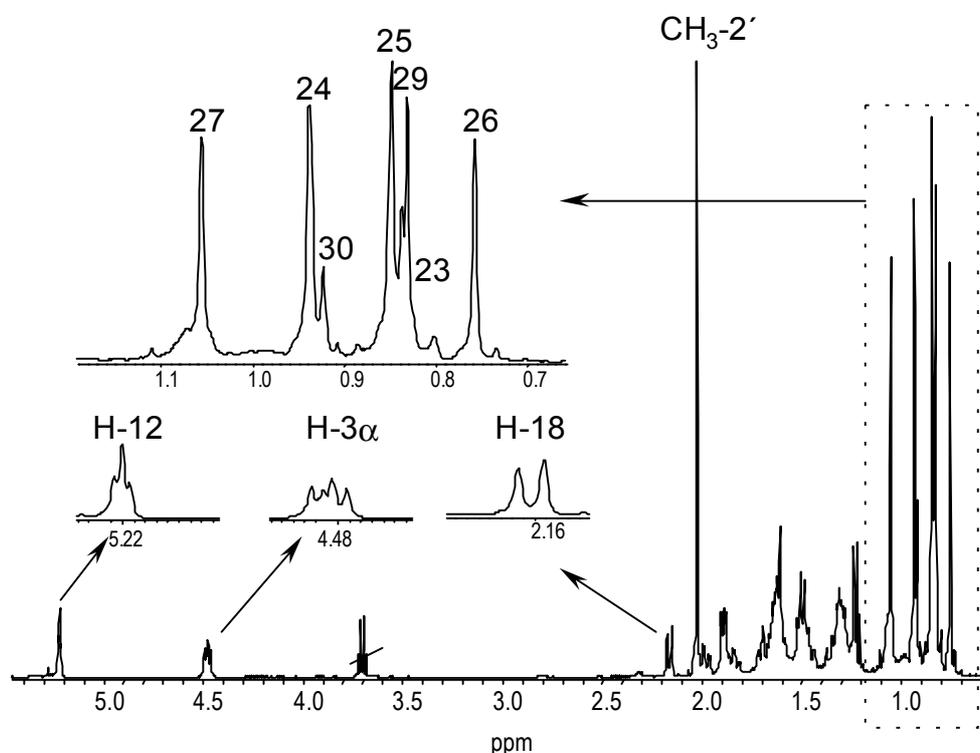


Abbildung F.3: ^1H -NMR-Spektrum von $3\beta\text{-O-Acetyloleanic Säure}$ in CDCl_3 gemessen

Im ^{13}C -Spektrum traten 32 Signale auf. Über ein DEPT 135-Spektrum konnten diese in 15 CH/CH_3 , 9 CH_2 und 8 quartäre Kohlenstoffe unterschieden werden (Abbildung F.4). Über das HMBC-Spektrum und das HSQC-Spektrum wurden die Kohlenstoffe zugeordnet. Eine Auflistung findet sich in Tabelle F.1.

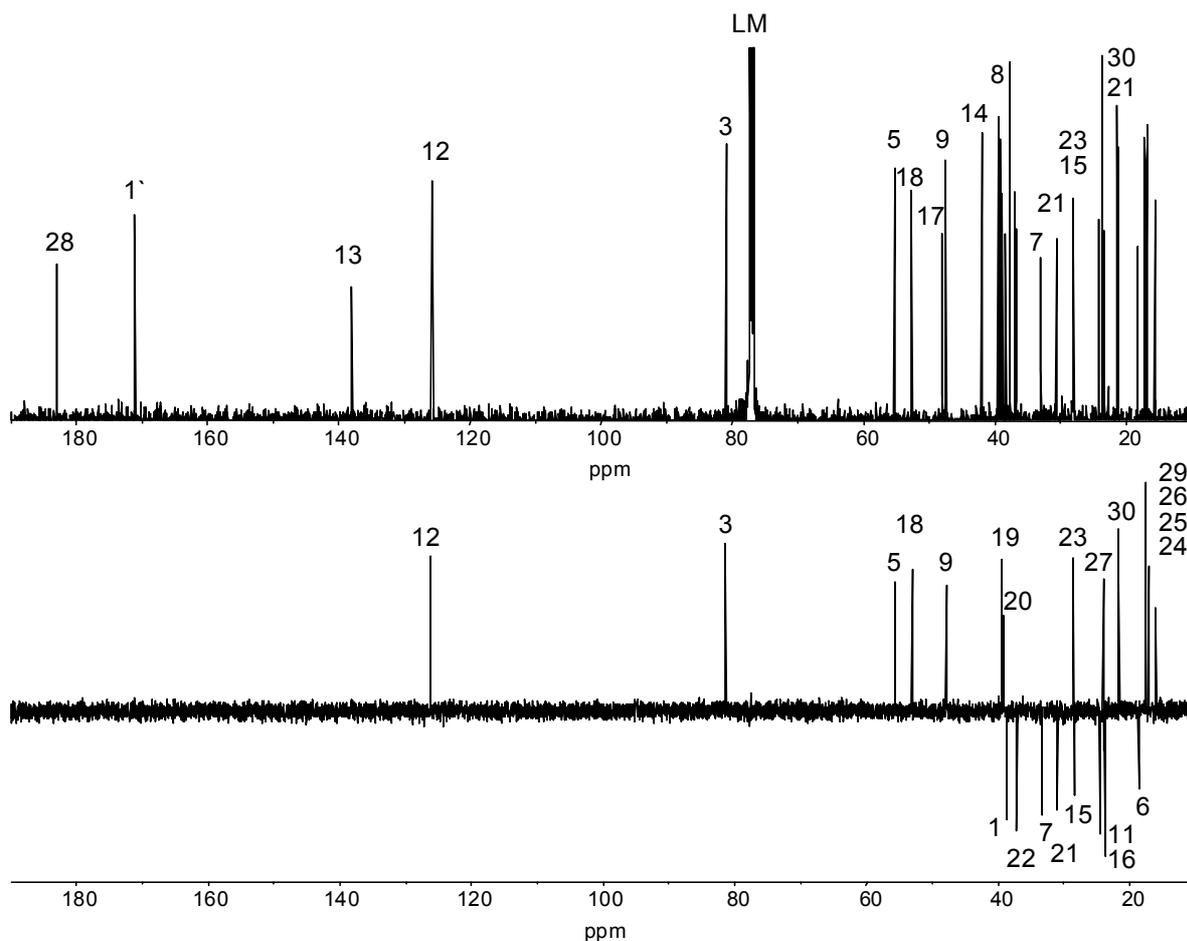


Abbildung F.4: ^{13}C und DEPT 135-Spektrum von $3\beta\text{-O-Acetylursolsäure}$

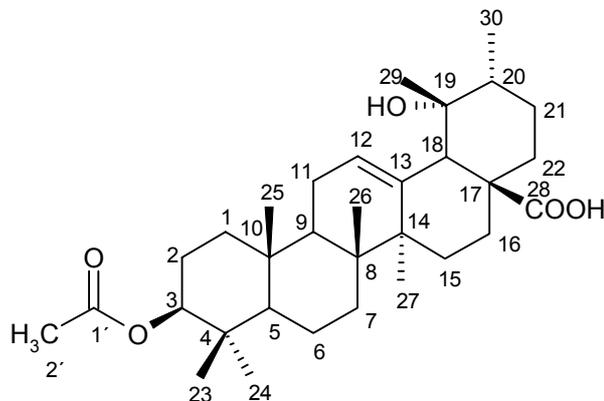
Der Vergleich mit den Literaturangaben, sowie der Schmelzpunkt bei 283°C (Beilstein: Smp. $284\text{-}286^\circ\text{C}$) bewiesen, dass es sich bei Verbindung TTS5 um $3\beta\text{-O-Acetylursolsäure}$ handeln musste.

Bei der Lagerung einer gesättigten ethanolischen Lösung im Eisfach bei -20°C fielen farblose Nadeln aus. Unter dem Mikroskop konnte erkannt werden, dass es sich um einzelne Kristalle handelte. Eine anschließende Röntgenstrukturanalyse bestätigte, dass sich ein Einkristall gebildet hatte mit einem Achsenabstand in einer Ebene von ca. $8,2 \text{ \AA}$. Leider wurde der Kristall durch die notwendige lange Bestrahlungszeit zerstört, so dass keine weiteren röntgendiffraktometrischen Daten erhalten werden konnten.

Tabelle F.1: NMR-Daten von 3 β -O-Acetylsolsäure und Vergleich mit den Literaturangaben von SANTOS et al. (1997)

Position	¹³ C, δ	Lit.	DEPT	¹ H, δ	Aufspaltung	Kopplung (Hz)
1	38,2	38,2	CH ₂	1,61 0,93	(m) ^a (m) ^a	
2	24,1	23,5	CH ₂	1,07	(m) ^a	
3	80,9	80,9	CH	4,48	dd	6,3; 9
4	38,8	37,6	C			
5	55,3	55,3	CH	0,82	(m) ^a	
6	18,1	18,2	CH ₂		(m) ^a	
7	32,8	32,9	CH ₂	1,28 1,46	(m) ^a (m) ^a	
8	39,5	39,5	C			
9	47,4	47,4	CH	1,51	(m) ^a	
10	36,9	36,8	C			
11	23,3	23,3	CH ₂	1,89 1,59	dd	3,2; 8,8
12	125,7	125,4	CH	5,22	t	3,5
13	137,9	138,1	C			
14	41,9	41,9	C			
15	28,1	28,0	CH ₂	α 1,06 β 1,84	(m) ^a ddd	4,4; 13,9; 14,8
16	23,6	24,2	CH ₂	α 1,99 β 1,63	ddd (m) ^a	4,4; 13,9; 13,2
17	47,9	48,1	C			
18	52,5	52,8	CH	2,16	d	11
19	39,0	39,0	CH	0,93	(m) ^a	
20	38,8	38,8	CH	1,63	(m) ^a	
21	30,6	30,6	CH ₂	1,50 1,27	(m) ^a (m) ^a	
22	36,7	36,6	CH ₂	1,69 1,65	ddd (m) ^a	3,2; 4,2; 12,6
23	28,1	28,0	CH ₃	0,83	s	
24	15,5	16,7	CH ₃	0,94	s	
25	16,7	15,5	CH ₃	0,84	s	
26	17,0	16,9	CH ₃	0,76	s	
27	23,6	23,5	CH ₃	1,05	s	
28	183,0	178,7	C			
29	17,1	17,0	CH ₃	0,84	d	5,7
30	21,2	21,3	CH ₃	0,93	d	7,6
Acetyl-1'	171,0	171,0	C			
Acetyl-2'	21,3	21,2	CH ₃	2,02	s	

a: Aufspaltung durch Überlagerungen nicht erkennbar

2.5.7. Identifizierung von TTS6: 3 β -O-Acetylpomolsäure

Die zweite Substanz, die aus VLC-Fraktion VI nach Reinigung an Sephadex[®] LH20 abgetrennt werden konnte, kristallisierte nach weiterer MPLC-Reinigung in feinen Nadeln aus Ethanol aus.

Das online aufgenommene UV-Spektrum ergab keinerlei Hinweise auf konjugierte Doppelbindungen und andere chromophore Systeme. Die positive Reaktion mit Liebermann-Burchard-Reagenz deutete auf das Vorhandensein einer weiteren triterpenoiden Verbindung hin.

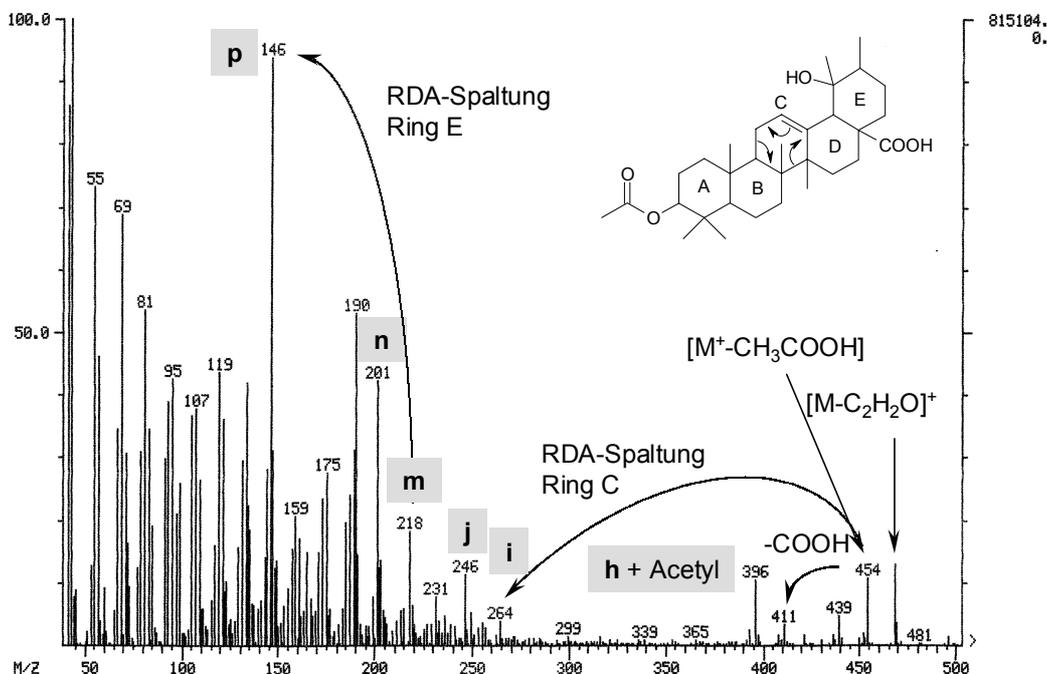


Abbildung F.1: EI-MS-Spektrum von 3 β -O-Acetylpomolsäure. Erklärungen im Text und in Abbildung F.1

Das DCI-MS-Spektrum (Abbildung F.1) zeigte als Quasimolekülpeak $[M+NH_4]^+ = 532$ und damit eine Molekülmasse von 514. Das EI-Massenspektrum nach Direkteinlaß zeigte zwar keinen Molekülpeak, aber Abspaltungsprodukte von m/z 42 $[C_2H_2O]^+$ und m/z 60 $[CH_3COOH]^+$, was auf eine O-Acetylgruppe deutete. Das charakteristische Fragment von m/z 146 zeigte an, dass sich am Ring E eine OH-Gruppe befand. Die Spaltprodukte der Retro-Diels-Alder-Spaltung von Ring E (vgl. Abbildung F.1) waren gut sichtbar. Die Doppelbindung zwischen C-12 und C-13 war belegbar über die Bruchstücke m/z 264, 246 und 218.

Das 1H -Spektrum (Abbildung F.2) zeigte bei $\delta = 5,33$ ppm ein Triplett mit einer Kopplung von 3,5 Hz. Dies konnte als weiterer Beweis für die Doppelbindung zwischen C-12 und C-13 gewertet werden. Bei $\delta = 4,48$ war ein Duplett vom Duplett ($J = 6,3$ und 9 Hz) zu erkennen. Diese Kopplungskonstanten und auch die Verschiebung bedeuteten, dass sich an C-3 in β -Position eine alkoholische Gruppierung befinden mußte. Aus dem MS-Spektrum lagen erste Hinweise auf ein Essigsäurederivat vor. Dies wurde über das Signal bei 2,03 ppm mit einer Intensität von drei Protonen bestätigt. Die Acetylierung mußte sich wie bei TTS5 an Position 3 befinden.

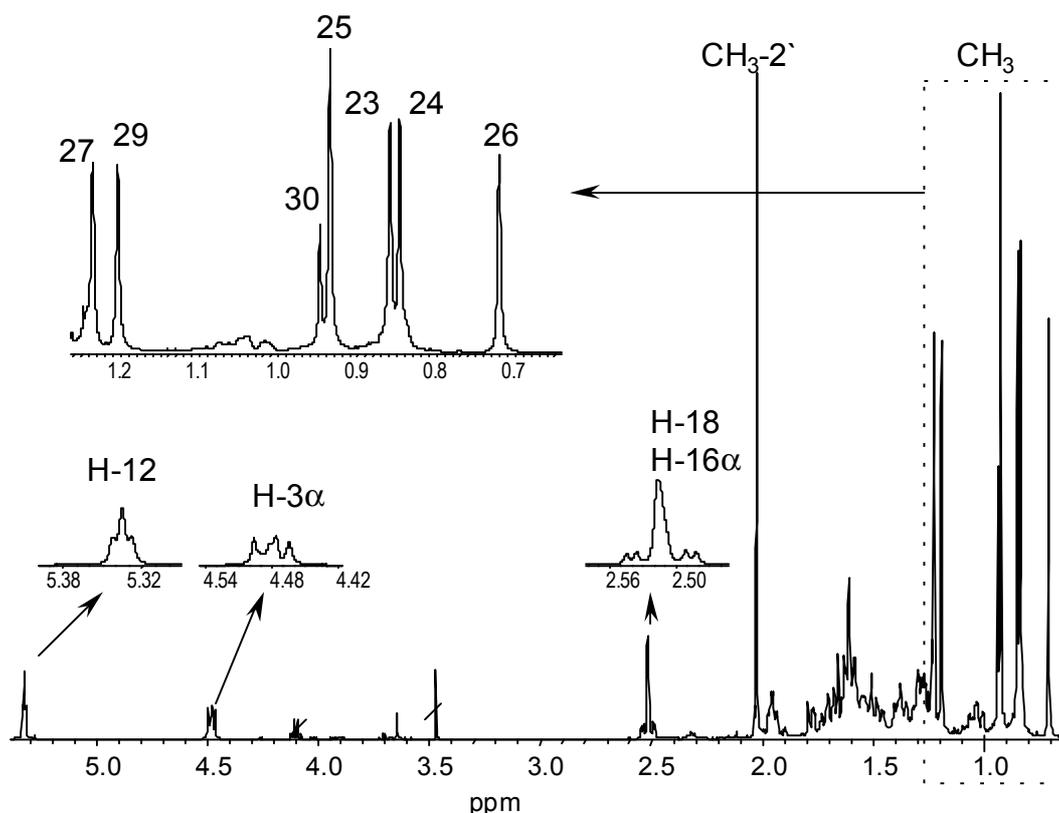


Abbildung F.2: 1H -NMR von 3β -O-Acetylpomolsäure in $CDCl_3$

Im hohen Feld waren sieben Signale für Methylgruppen erkennbar. Das Signal für die Protonen an C-26, der am stärksten abgeschirmten Gruppe, war bei 0,76 ppm detektierbar. Bei 0,93 ppm waren ein Singulett und ein Duplett für zwei Methylgruppen sichtbar. Am weitesten tieffeldverschoben trat CH₃-27 als Singulett auf. CH₃-29 wurde bei 1,19 ppm gefunden. Über ein HMBC-Spektrum (Abbildung F.3) konnten die Methylgruppen zugeordnet werden:

Als einzige Methylgruppe koppelte CH₃-27 mit der Doppelbindung. Nur CH₃-23 und CH₃-24 korrelierten mit dem tieffeldverschobenen Kohlenstoff an C-3. Die Methylgruppen des Ringes E zeigten Kopplungen zum Kohlenstoff an C-19. Das Duplett bei 0,93 ppm sollte CH₃-30 entsprechen, da diese Methylgruppe durch ein geminales Nachbarproton als einzige CH₃-Gruppe aufspaltete. Die Methylgruppe von C-25 hatte den ins tiefe Feld verschobenen Kohlenstoff C-5 als Kopplungspartner. Da eine zusätzliche Kopplung zwischen C-9 und dem Methylsignal bei 0,93 ppm beobachtet werden konnte, mußte das Duplett von CH₃-30 mit CH₃-25 zusammenfallen. Die Intensität des Signals im ¹H-NMR-Spektrum über sechs Protonen bestätigte diese Annahme. Die Methylgruppe CH₃-26 war erwartungsgemäß am weitesten ins Hochfeld verschoben und ließ sich leicht über Kopplungen mit C-9, C-14 und C-7 bestimmen.

Das weit tieffeldverschobene Signal des Protons an C-18 war als Singulett bei 2,52 ppm erkennbar. Das Singulett des Protons an C-18 wurde von einem weiteren Signal überlagert (Integration: 2H über das gesamte Signal!). Dieses war bereits bei Pomolsäure als typisches Signal aufgetaucht. Das zweite darunterliegende Signal war dem Proton 16 α zugeordnet worden. Im HMBC-Spektrum konnten über das Protonensignal bei 2,52 ppm fast alle Kohlenstoffe der Ringe D und E zugeordnet werden. Das Signal koppelte mit den Kohlenstoffen C-28, 13, 12, 19, 17, 20 und 29. Diese umfangreichen Korrelationen waren nur möglich, weil die Ringe C und E *cis* verknüpft vorliegen (AIMI et al., 1989).

Das HSQC-Spektrum (Abbildung F.4) besaß leider trotz verlängerter Meßzeit keine befriedigende Auflösung. Die beiden Protonen der CH₂-Gruppen lagen oft durch verschiedene Verschiebungen getrennt vor und lieferten dabei meist breite Signale. Dadurch waren ihre Intensitäten sehr gering. Die Kopplungen der CH₃-Gruppen und CH-Gruppen waren aber als intensive Signale sichtbar. Eine Übersicht über alle Verschiebungen und die ¹³C-Daten sind in Tabelle F.1 zu finden. Da nicht alle Protonen Korrelationspartner besaßen, konnte die Zuordnung nicht ganz vollständig vorgenommen werden. Wegen vielfältiger Überlagerung war meist kein Kopplungsmuster sichtbar.

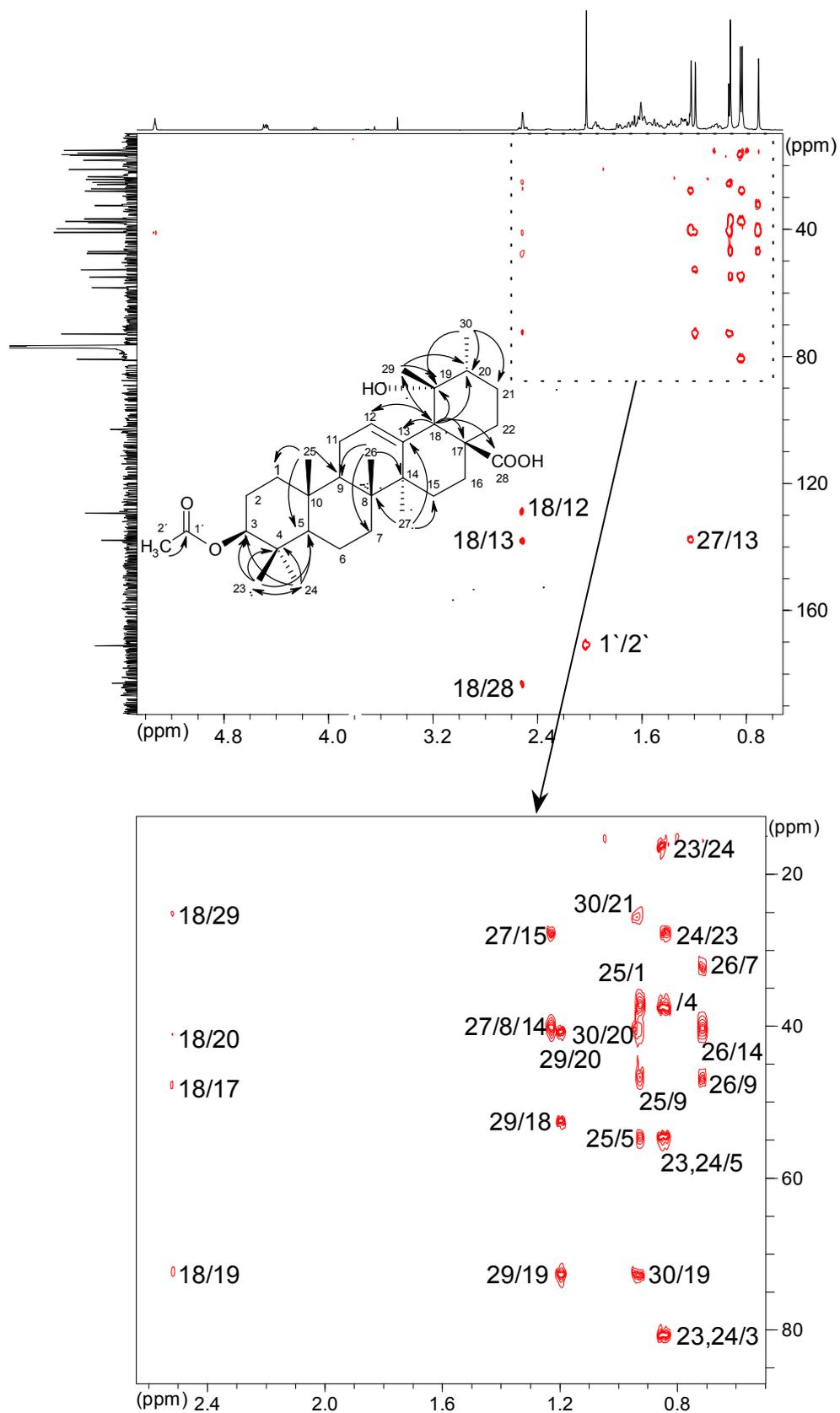


Abbildung F.3: HMBC-Spektrum von 3β-O-Acetylpomolsäure in CDCl₃

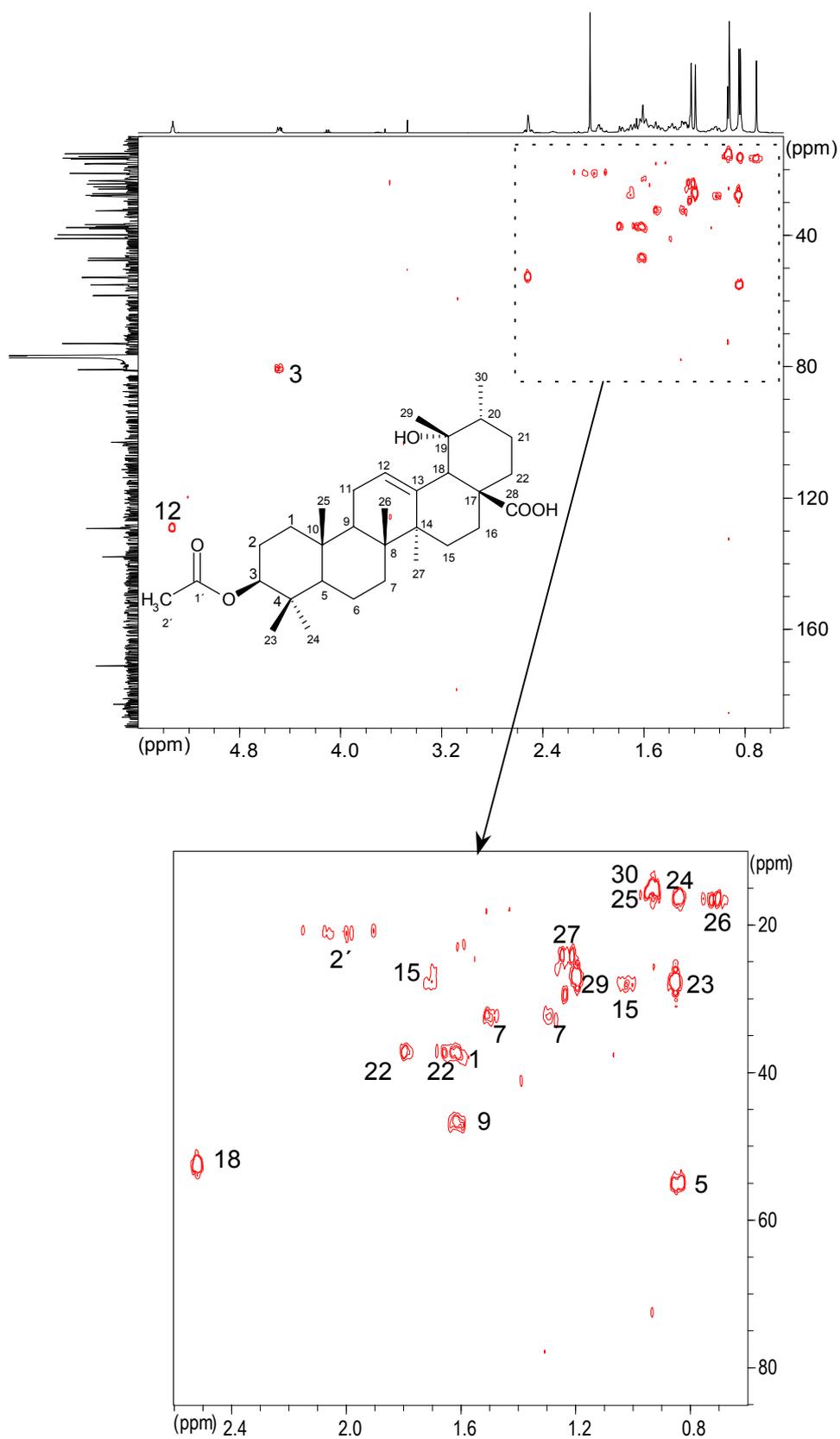


Abbildung F.4: HSQC-Spektrum 3β-O-Acetylpomolsäure in CHCl₃

Tabelle F.1: NMR-Daten von 3 β -O-Acetylpomolsäure in CDCl₃ verglichen mit den Daten aus YAMAGUCHI (1970) von Pomolsäuremethylester in CDCl₃

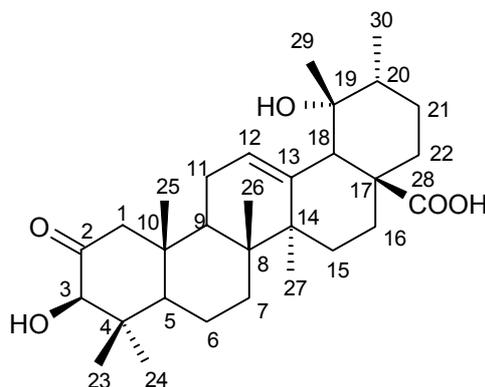
Position	¹³ C, δ	Lit.	DEPT	¹ H, δ	Aufspaltung	Kopplung (Hz)
1	38,1	38,7	CH ₂	1,63	(m) ^a	
2	23,6	27,4	CH ₂	α 1,96 β 1,79	(m) ^a (m) ^a	
3	80,9	79,0	CH	4,48	dd	6,8; 9,2
4	37,7	38,5	C			
5	55,2	55,2	CH	0,85	(m) ^a	
6	18,3	18,4	CH ₂	1,51 1,46	(m) ^a (m) ^a	
7	32,6	32,8	CH ₂	1,29 1,52	(m) ^a (m) ^a	
8	39,9	40,3	C			
9	47,1	47,2	CH	1,61	(m) ^a	
10	36,9	36,9	C			
11	23,5	23,7	CH ₂	1,06	(m) ^a	
12	129,3	129,1	CH	5,33	t	3,5
13	137,9	138,0	C			
14	41,1	41,1	C			
15	28,2	28,1	CH ₂	1,04 1,69	(m) ^a (m) ^a	
16	25,4	25,5	CH ₂	1,59 2,52	(m) ^a ddd	4,6; 13,6; 13,6
17	47,7	47,9	C			
18	52,9	53,2	CH	2,52	s	
19	73,1	73,1	C			
20	41,1	41,1	CH	1,38	(m) ^a	
21	25,9	26,0	CH ₂	1,26 1,55	(m) ^a (m) ^a	
22	37,5	37,4	CH ₂	1,61 1,78	(m) ^a (m) ^a	
23	28,0	28,2*	CH ₃	0,85	s	
24	16,7	15,2*	CH ₃	0,84	s	
25	15,3	15,5*	CH ₃	0,93	s	
26	16,9	16,6*	CH ₃	0,71	s	
27	24,4	24,5	CH ₃	1,03	s	
28	182,7	177,7*	C			
29	27,4	27,2	CH ₃	1,19	s	
30	16,1	16,1	CH ₃	0,93	d	6,6
Acetyl-1'	21,3	-	C			
Acetyl-2'	18,4	-	CH ₃	2,03	s	

a: Aufspaltung durch Überlagerungen nicht erkennbar

Der Schmelzpunkt der Substanz TTS6 wurde mit 248°C bestimmt (Beilstein: Smp. 245-248°C)

Die Substanz TTS6 entsprach damit der Verbindung 3β-O-Acetylpomolsäure, die bereits aus der verwandten Gattung *Chaenomeles lagenaria* (Loisel.) Koidz. zusammen mit 3β-O-Acetylsolsäure isoliert worden ist (GUO et al., 1998).

2.5.8. Identifizierung von TTS7: Pirolonsäure



Bei Nachisolierung von TTS2 konnte noch eine weitere Substanz mit ähnlichem UV-Spektrum über präparative HPLC erhalten werden. Von dieser Verbindung wurden weniger als 2 mg erhalten. Die Substanz wurde auf dem DC knapp oberhalb der Oleanolsäure detektiert. Sie färbte sich mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz violett und mit Liebermann-Burchard-Reagenz schwach rötlich-braun. Diese Eigenschaften führten zu der Vermutung, dass wiederum eine Triterpensäure vorlag. Ein online aufgenommenes EI-MS-Spektrum zeigte als Basispeak m/z 146. Über DCI konnte ein Molekulargewicht von $MG = 486$ bestimmt werden. Damit wurde die Summenformel $C_{30}H_{46}O_5$ angenommen.

Das IR-Spektrum (Abbildung F.1) zeigte bei 3567 cm^{-1} deutlich die O-H-Valenzschwingungen, bei 2926 bis 2855 cm^{-1} die typische Doppelbande der C-H-Valenzschwingungen von Oleananen oder Ursanen. Im Spektralbereich zwischen 1400 und 1200 cm^{-1} waren bei 1395 , 1376 und 1361 cm^{-1} drei Banden sichtbar, dann erst bei 1339 cm^{-1} eine weitere. Dieses Muster entsprach allen Kriterien, die SNATZKE, G. et al. (1962) zur Unterscheidung zwischen Oleanolsäure und Ursolsäure erstellt hatten, um eindeutig ein Ursolsäurederivat zu identifizieren.

Im Bereich der Carbonyl-Valenzschwingungen traten zwei starke und eine schwache Bande auf. Die Bande bei 1686 cm^{-1} entsprach der Carbonylschwingung der Carbonsäure, jedoch musste noch eine weitere C=O-Gruppierung vorhanden sein, die bei 1716 cm^{-1} absorbierte. In

diesem Bereich finden sich Ketone an gesättigten offenkettigen und zyklischen Kohlenwasserstoffen. Zwischen 1653 und 1600 cm^{-1} erschienen schwach die Valenzschwingungen der Doppelbindung. Die kleineren Banden entstammten asymmetrischen C-H-Deformationsschwingungen der Methylgruppen.

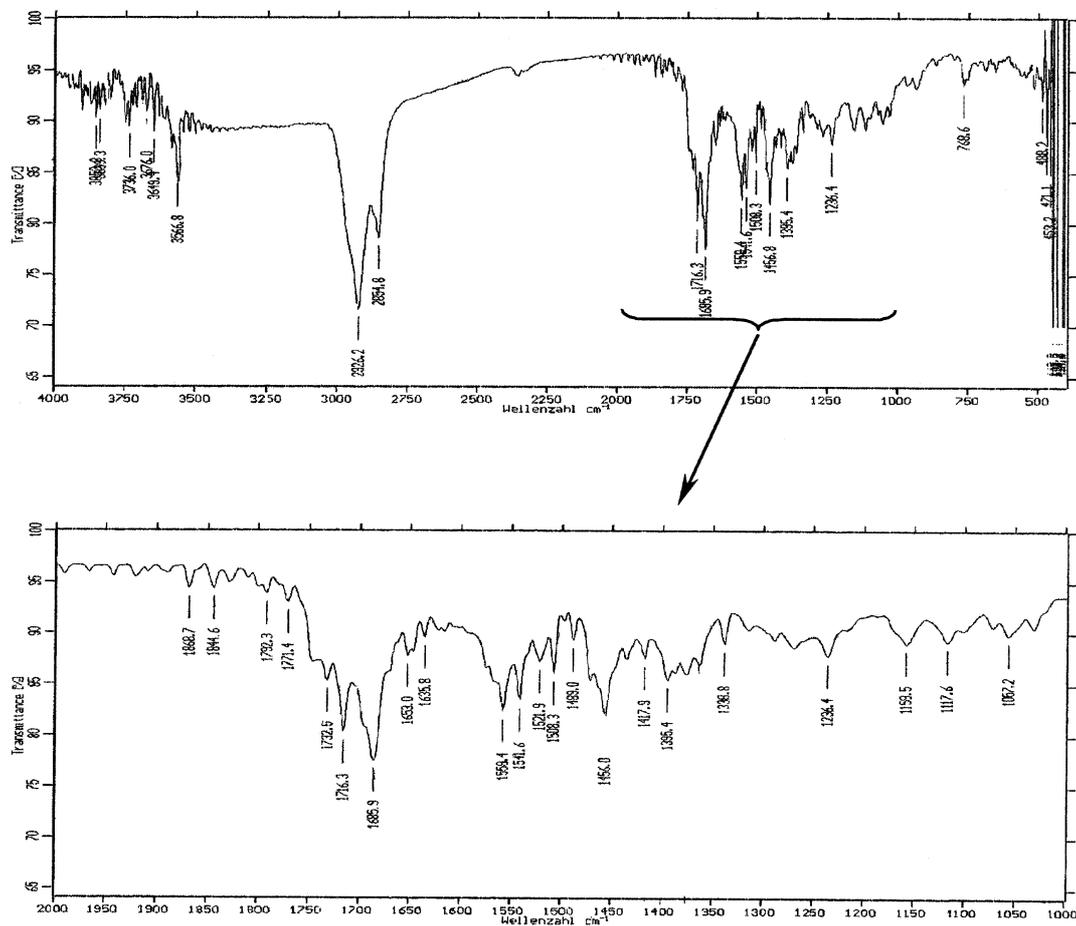


Abbildung F.1: IR-Spektrum von Pirolonsäure

Im ^1H -Spektrum (Abbildung F.2) wurde das für Δ^{12} -ungesättigte Ursan- und Oleananderivate typische Triplet bei $\delta = 5,29$ ppm gefunden. Ebenfalls gut detektierbar war das charakteristische Signal des Protons von C-18, allerdings überlagert vom α -Proton an C-16, das bei allen Pomolsäurederivaten erschienen war. Im Hochfeld konnten wiederum 6 Methylgruppen als Singulets und eine Methylgruppe als Duplett erkannt werden.

Im Tieffeld erschien ein Singulett bei $\delta = 3,99$ ppm. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Carbonylfunktion neben dem Alkohol positioniert sein mußte und kein weiteres Proton mehr mit dem geminalen Proton koppeln konnte. Dies war nur möglich, wenn die OH-Gruppe an Position 3 und die Carbonylgruppe an Position 2 stand. Die biogenetisch begünstigte $3\beta,19\alpha$ -

Dihydroxy-urs-12-en-2-on-17-säure wurde erstmals von BRIESKORN et al. (1974), als Bestandteil von Birnen- und Apfelschalen beschrieben und dafür der Name Pirolonsäure vorgeschlagen. Aus der Droge *Chaenomelis fructus* wurde sie bisher noch nicht isoliert.

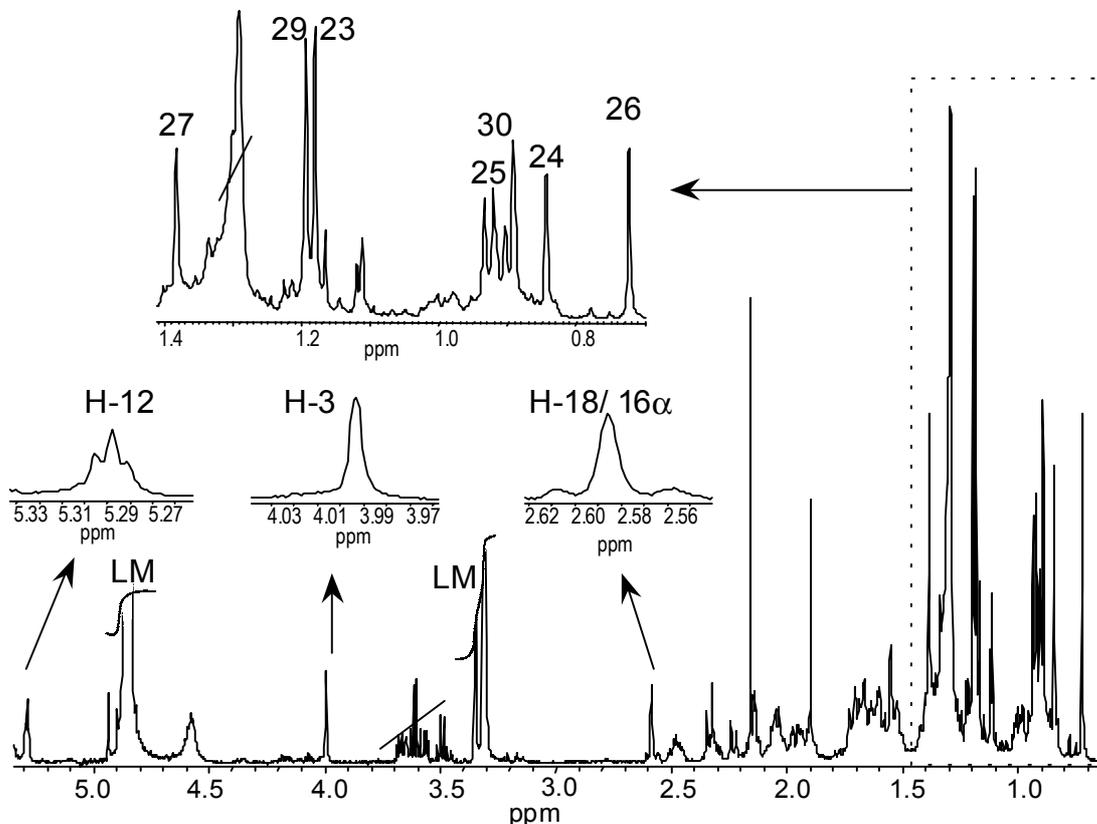
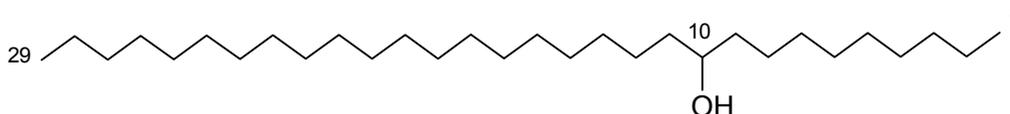


Abbildung F.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pirolonsäure in CDCl_3

2.6. Weitere Verbindungen

2.6.1. Identifizierung von A1: Nonacosan-10-ol



VLC-Fraktion **III** trennte sich im Laufmittel **FMC1** kaum auf. An der Laufmittelfront war eine Hauptzone erkennbar. Mit Hilfe des lipophilen Laufmittels **FMC4** wurden mehrere Zonen bei $R_f = 0,73$, $0,45$ und $0,23$ bis $0,10$ sichtbar. Nach weiterer Trennung über eine kleine Vakuumsäule mit Dichlormethan und Cyclohexan als Eluens fielen aus der Fraktion

mit DCM : Cyclohexan 6 : 4 Kristalle aus, die mit MPLC gereinigt wurden. Sie erschienen im Laufmittel **FMC4** bei $R_f = 0,45$. Die erhaltene Substanz hatte ein Molekulargewicht von 424. Sie zeigte im GC-gekoppelten EI-MS-Spektrum ein Fragment der Masse m/z 406, das durch Wasserabspaltung zustande kam. Weitere auffällige Spaltprodukte waren m/z 297 und m/z 157. Diese Bruchstücke entstehen bei sekundären Alkoholen, wenn beidseitig des Alkohols gespalten wird. Eine Spaltung mit den Fragmenten m/z 297 und 157 war nur möglich, wenn sich eine OH-Gruppe an Position 10 befand.

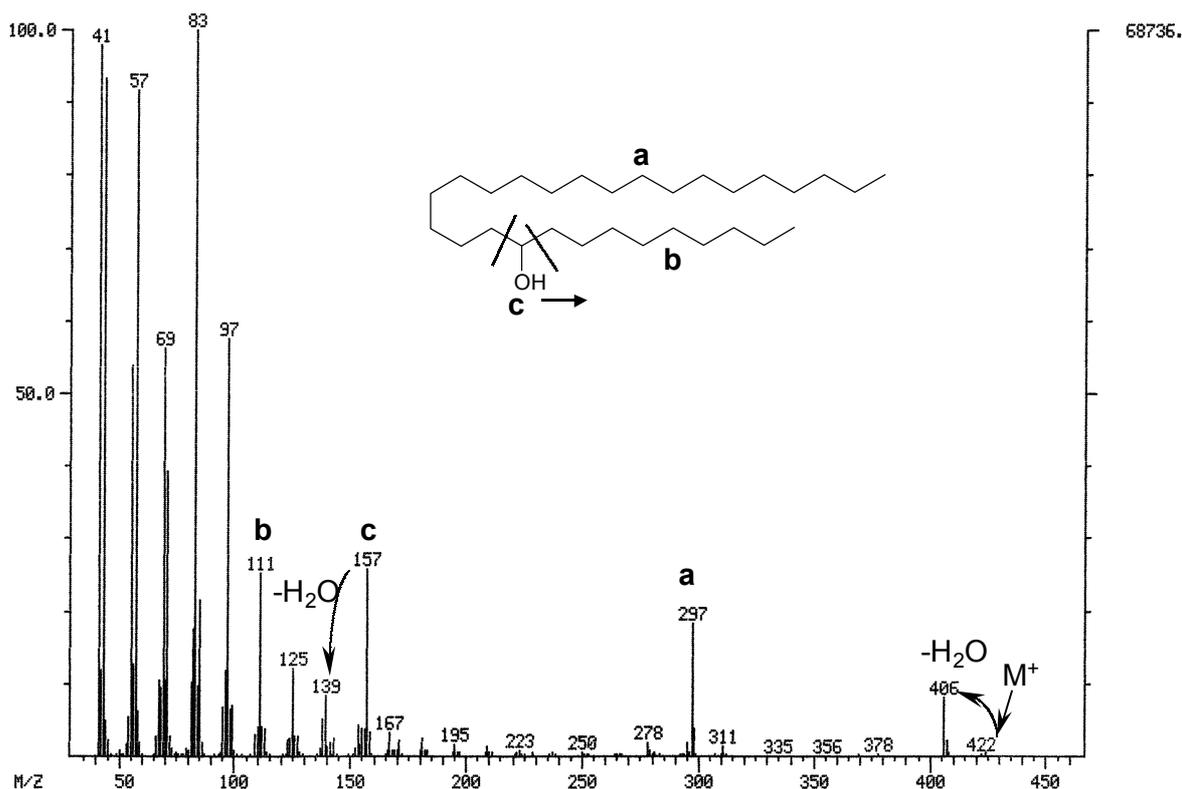


Abbildung F.1: EI-MS-Spektrum von Nonacosan-10-ol

Aus dem IR-Spektrum war weiterhin ersichtlich, dass keine anderen funktionellen Gruppen im Molekül vorhanden waren. Zwischen 3500 und 3100 cm^{-1} war die OH-Valenzschwingung in H-Brücken sichtbar. Bei 2920 und 2850 cm^{-1} erschienen die CH_2 -Valenzschwingungen der Alkanketten und bei 1470 cm^{-1} konnten C-H-Deformationsschwingungen erkannt werden.

Aus diesen Befunden ergab sich das Vorliegen von Nonacosan-10-ol.

Dieser sekundäre Alkohol war bereits von WOLLRAB (1968) als Bestandteil des Wachses der Apfelschalen beschrieben worden. Er hatte Apfelschalen verschiedener Sorten untersucht und erhielt daraus weiterhin Alkohole mit kürzeren und längeren Kettenlängen von 22 bis 31 Kohlenstoff, wobei jedoch Nonacosanole mit 86 % den größten Anteil ausmachten. Ebenso

waren jeweils die zugehörigen Ketone enthalten. Vergleichende GC-MS-Untersuchungen mit Kohlenwasserstoffen verschiedener Kettenlängen (vgl. Tabelle F.1) bestätigten die Befunde von WOLLRAB, dass auch in *Chaenomelis fructus* Ketten mit 29 Kohlenstoffatomen den überwiegenden Anteil der enthaltenen Paraffine ausmachen.

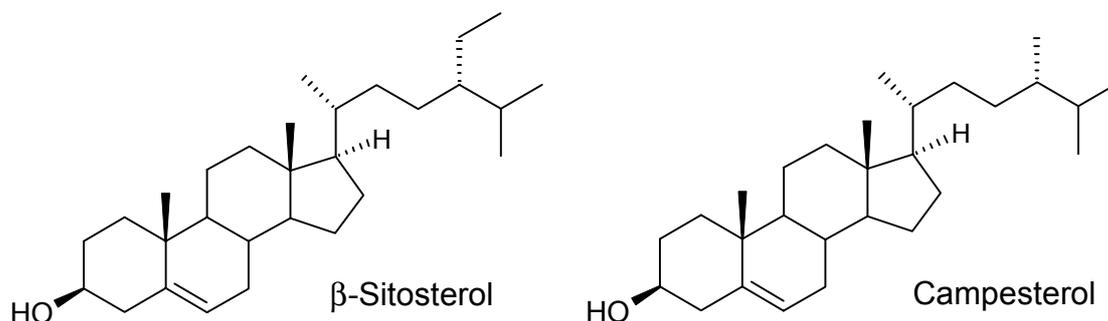
2.6.2. Paraffine

Die in den VLC-Fractionen I enthaltenen Komponenten besaßen sehr lipophilen Charakters. Sie waren direkt an der Laufmittelfront zu finden und ließen sich über RP-Material nicht auftrennen. Aufgrund fehlender Chromphore waren sie auch nicht mit einem UV-DAD-Detektor erfaßbar. Mittels GC-MS-Analytik wurde die Fraktion I in 11 Komponenten aufgetrennt. Das MS-Spektrum zeigte reine Paraffine mit Kettenlängen zwischen 19 und 29 Kohlenstoffen, wobei Verbindungen mit 23-25 Kohlenstoffen überwogen und Paraffine mit 29 Kohlenstoffen den größten Anteil ausmachten. Die Kettenlängen wurden Mithilfe eines Referenzgemisches eingegrenzt.

Tabelle F.1: Retentionszeiten und Flächenverhältnisse der n-Alkane im GC3; Methode I

Kettenlänge	Rt- Referenz (min)	Rt-VLC-Fraktion I (min)	Fläche (%) ca.
C10-C13	< 3 min	-	-
C14	3,9	-	-
C15	4,8	-	-
C16	5,7	-	-
C17	6,6	-	-
C18	7,55	-	-
C19	8,5	8,6	<1
C20	9,4	9,5	2
C21-C27	-	10,4; 11,2; 12,15; 12,9; 13,75; 14,5; 15,2	4, 8, 9, 13, 14, 18, 7, 11, 5, 9
C28	15,8	15,8	3
C29	-	16,85	25
C30	17,7	-	-
C32	20,3	-	-
C34	24,1	-	-

2.6.3. Phytosterole (β -Sitosterol, Campesterol)



Die dritte intensive Zone in der VLC-Fraktion **VI** färbte sich mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz rosa. Ihr R_f -Wert lag bei ca. 0,50 im Laufmittel **FMC1**. Nachdem die Fraktion einige Zeit bei -20°C gelagert worden war, fielen dünne Nadeln aus, die abgetrennt und nochmals umkristallisiert wurden. Aufgrund fehlender UV-Absorption konnten sie nicht mit DAD-HPLC detektiert werden. Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit einer Phytosterolmischung aus β -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol zeigte für beide Mischkristallisate übereinstimmendes DC-Verhalten. Im direkten Vergleich mit authentischen Verbindungen konnte durch GC und GC-MS-Analyse als Hauptbestandteil β -Sitosterol identifiziert werden. Als Nebenkomponekte lag in sehr geringer Konzentration Campesterol vor. Diese Verbindungen sind im Pflanzenreich weit verbreitet (BUCKINGHAM et al., 1994) und sind nach HEGNAUER (1973) allgemein in Rosaceen vorzufinden.

2.7. Quantitative Bestimmung des Fettsäuregehaltes

Wie die Ergebnisse in Kapitel **E** eindrücklich deutlich machen, kann die PGHS-1/-2 hemmende Wirkung stark vom Fettsäuregehalt eines Extraktes abhängig sein. Um auszuschließen, dass Fettsäuren bei *Chaenomelis fructus* das Wirkprinzip darstellten, wurde der Gehalt an gebundenen und freien Fettsäuren quantitativ ermittelt. Als Vorschrift diente die abgewandelte Methode nach VAN WIJNGAARDEN (1967) und ZSCHOCKE (1998) (siehe Kap. I, Exp. Teil). Die Quantifizierung erfolgte mittels gaschromatographischer Analyse der aus den Fettsäuren durch Methylierung gewonnenen Fettsäuremethylester mit Hilfe des internen Standards Myristinsäure. Myristinsäure wird in Pflanzen nur äußerst selten als freie Fettsäure gefunden.

Der Gesamtgehalt des Extraktes ergab sich aus der Bestimmung des Fettsäuregehaltes nach Kochen mit methanolischer Natronlauge, der Gehalt an freien Fettsäuren wurde durch Kochen mit reinem Methanol bestimmt.

Tabelle F.1: Quantifizierung der Fettsäuren verschiedener *Chaenomelis fructus* Extrakte

	Gehalt (%)		
	Droge A		Droge B98
Fettsäure	Gesamtgehalt	freie Fettsäuren	Gesamtgehalt
Palmitinsäure	6,2	3,9	4,6
Linolsäure	7,1	4,1	1,6
Ölsäure	10,6	5,7	2,6
Stearinsäure	< 0,5	< 0,5	0,6

Aufgrund des relativ niedrigen Gesamtgehaltes von Fettsäuren im Extrakt **B98** wurde auf die Quantifizierung der freien Fettsäuren verzichtet. Die stark hemmende Linolsäure war nur mit 4,1 % bzw. mit 1,6 % im Extrakt zu finden und konnte in dieser Konzentration nicht die pharmakologische Wirkung des Extraktes erklären.

2.8. Pharmakologische Untersuchungen

Alle Isolierungsschritte bei der Arbeit mit dem Dichlormethanextrakt von *Chaenomelis fructus* wurden wirkungsorientiert vorgenommen und Extrakte, Fraktionen und Reinsubstanzen wurden der Testung auf die Beeinflussung der PGHS-Isoenzyme unterworfen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mind. drei Tests. Zur Detektion wurde der PGE₂-Testkit der Fa. R&D-Systems verwendet, für die Testungen wurde die optimierten Screening-Assays (Phase 3) genutzt.

2.8.1. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Extrakte

Im vergleichenden Screening verschiedener Drogen wurden die sukzessiv hergestellten Extrakte mit *n*-Hexan, Dichlormethan, Methanol, Wasser sowie der nach dem chinesischen Arzneibuch hergestellte Dekokt von *Chaenomelis fructus* getestet. Als Screeningkonzentration wurde jeweils 50 µg/ml gewählt. So erhielten wir einen guten Überblick über die Hemmwirkung der Extrakte abhängig von der Lipophilie des Lösungsmittels und der Polarität der enthaltenen Substanzen. Die statistische Auswertung der Testergebnisse ergab für alle Extrakte gleiche Varianzen. Damit konnte ein T-Test durchgeführt werden.

Tabelle F.1: PGHS-Hemmung (%) durch sukzessiv hergestellte Extrakte aus *Chaenomelis fructus*, Droge A

Extraktionsmittel	Hemmung (%)	
	PGHS-1	PGHS-2
<i>n</i> -Hexan	34,9 ± 6,7	64,9 ± 11,5
Dichlormethan	72,1 ± 3,4	60,6 ± 5,1
Methanol	31,8 ± 10,1	36,8 ± 6,8
Wasser	-	-
Dekokt	10,1 ± 8,6	12,3 ± 14,0

Die besten Hemmeigenschaften dieser Droge wurden im mittelpolaren Bereich (Dichlormethanextrakt) beobachtet. Bei diesem war jedoch keine selektive Hemmwirkung bzgl. der PGHS-2 festzustellen (die Messwerte waren im T-Test nicht signifikant unterschiedlich). Für den *n*-Hexanextrakt war die Hemmung zugunsten der PGHS-2 verschoben. Eine Erklärung für die Selektivität des *n*-Hexanextraktes könnte im Vorhandensein von Linolsäure zu finden sein. Für den Methanolextrakt zeigte der durchgeführte T-Test, dass die Selektivität nicht signifikant war. Die Hemmung des wäßrigen Extrakts und des Dekokts waren sehr niedrig. Beim Dekokt war interessanterweise noch geringe Hemmung messbar, während der Wasserextrakt keine positiven Hemmergebnisse auswies. Dies zeigt, dass sich die beiden Zubereitungsformen unterscheiden, und der Dekokt somit auch eine andere Wirkqualität als der Wasserextrakt hat.

Diese Vorversuche wurden als Hinweis darauf gewertet, dass ein mittelpolares Extraktionsmittel am günstigsten für die Isolierung der im Test aktiven Komponenten sein sollte. Der DC-Vergleich (Abbildung F.2) der sukzessiv hergestellten Extrakte hatte gezeigt, dass sowohl im methanolischen wie im *n*-Hexanextrakt die Substanzen enthalten waren, die mit Dichlormethan verstärkt extrahiert wurden. Diese waren jedoch durch sehr hydrophile (Startfleck) oder lipophile Substanzen (an der Laufmittelfront) in ihrer Konzentration im Methanol- bzw. *n*-Hexanextrakt erniedrigt.

Der anschließend unmittelbar aus der Droge **B99** hergestellte Dichlormethanextrakt zeigte sowohl im PGHS-1- (**90,8 %**) als auch im PGHS-2-Test (**90,6 %**) maximale Hemmung in der Screeningkonzentration von 50 µg/ml. Vergleichend eingesetzte weitere Drogenmuster (Tabelle F.2) bestätigten die guten Hemmeigenschaften der Dichlormethanextrakte von *Chaenomelis fructus*.

Tabelle F.2: Prostaglandin-H-Synthase-Hemmung [%] der Dichlormethanextrakte verschiedener Drogenmuster (Konz. 50 µg/ml)

Drogenmuster	A	B98	B99	C
PGHS-1	85,9	> 90	90,8	69,0
PGHS-2	71,6	> 90	90,6	91,6

Um die Aktivität besser vergleichen zu können, wurden von ausgewählten Dichlormethanextrakten IC₅₀-Werte bestimmt.

Tabelle F.3: IC₅₀-Werte von Dichlormethanextrakten im PGHS-1 und PGHS-2 Test

IC ₅₀ -Wert	B99	C
PGHS-1	5,1 µg/ml	9,1 µg/ml
PGHS-2	2,3 µg/ml	1,6 µg/ml

Der bereits in den Screeningversuchen beobachtete Trend wurde dabei bestätigt: die Extrakte im mittelpolaren Bereich waren hochwirksam und zeigten leichte Selektivität gegenüber der Prostaglandin-H-Synthase-2. Deutliche Differenzen bezüglich der hemmenden Eigenschaften verschiedener Drogenmuster konnten nicht gemessen werden.

Diese Ergebnisse gaben Anlaß, die folgenden Arbeiten mit dem direkt hergestellten Dichlormethanextrakt von Drogencharge **B99** fortzusetzen.

2.8.2. Untersuchungen der Fraktionen des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus* (Drogenmuster B99)

Die Untersuchung der Fraktionen auf die Prostaglandin-H-Synthase-Isoenzyme begleitete sämtliche Auftrennungsschritte des Dichlormethanextraktes. Nach der ersten Grobfraktionierung über Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel (vgl. Kapitel H) wurden die Rohfraktionen **I** bis **X** in einer Screeningkonzentration von 50 µg/ml getestet. Schon hier zeichnete sich ab, dass die hydrophilen Fraktionen **VI** bis **X** den lipophilen Fraktionen **I** bis **V** deutlich an Wirkung überlegen waren (vgl. Abbildung F.1). Innerhalb der Fraktionen **VI** bis **X** wurde eine gewisse PGHS2-Selektivität beobachtet.

Gleichzeitig korrelierte aber die maximale Hemmung nicht mit der maximalen Selektivität. Während in den Fraktionen **VI**, **VII** und **VIII** die Hemmung besonders hoch war, konnte die größte PGHS-2 Selektivität in Fraktion **X** gefunden werden. Die Fraktionen **I** bis **V** zeigten keinen hemmenden Einfluß auf die Isoenzyme. In Fraktion **I** bis **IV** konnte sogar ein leichter

stimulierender Effekt gemessen werden. Dabei wurde die PGHS-2 stärker beeinflusst als die PGHS-1. Fraktion V erwies sich deutlich als Übergangsfraction: das induzierbare Enzym wurde bereits leicht gehemmt, während die konstitutive Isoform noch gesteigerte Umsätze zeigte.

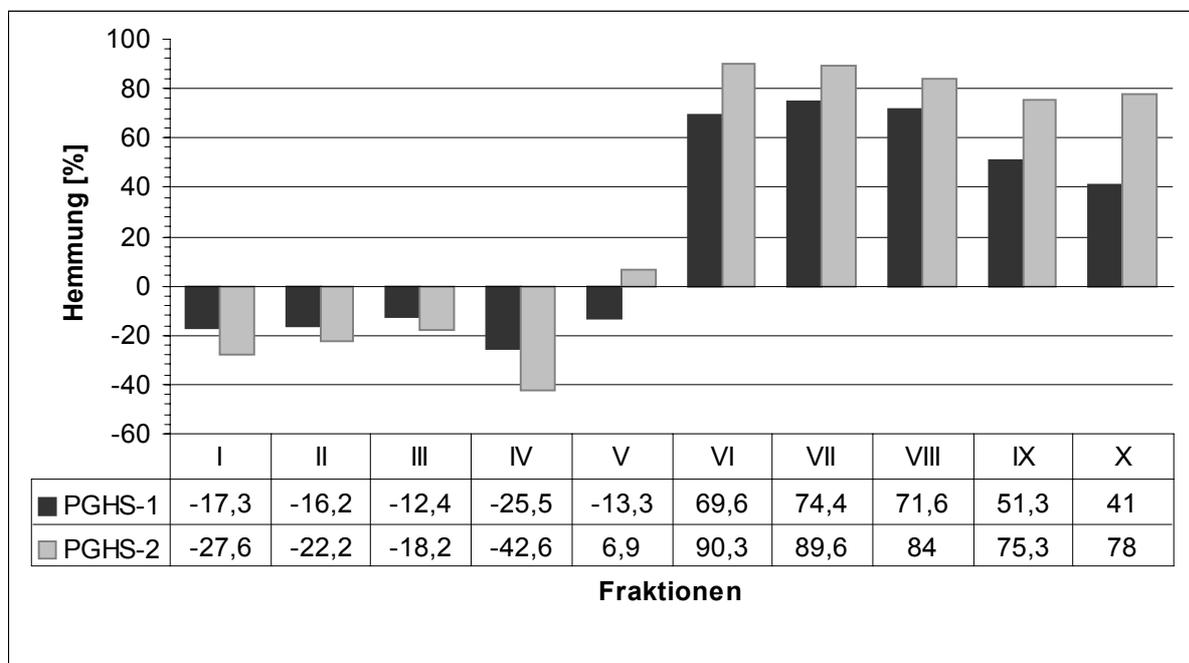


Abbildung F.1: In-vitro-Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase-Isoenzyme durch Fraktionen der ersten säulenchromatographischen Trennung des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus* B99

Vergleichende HPLC- und DC-Analytik hatte gezeigt, dass die Fraktionen VI bis VIII die hochaktive und selektiv wirksame Linolsäure enthielten. Weitere Gemeinsamkeiten waren ab Fraktion VII im reichlichen Vorhandensein von Oleanolsäure in Verbindung mit Pomolsäure und anderen triterpenoiden Verbindungen zu sehen. Diese beiden Verbindungen waren bestimmend für alle aktiven Fraktionen, so dass sie offenbar einen besonderen Anteil an der Wirkung hatten.

Die Screeninguntersuchungen veranlaßten uns, die Fraktion VI, wegen ihrer besonders hohen Hemmaktivität, und die Fraktionen IX und X aufgrund der selektiven Hemmung näher zu untersuchen.

2.8.3. Untersuchung der Triterpensäuren aus dem Dichlormethanextrakt von *Chaenomelis fructus*

Die weitere Auftrennung der Fraktionen aus der VLC des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus* zeigte, dass Oleanolsäure maßgeblich an der Aktivität der Fraktionen

beteiligt war. Jedoch zeigten reine Oleanolsäurefraktionen keine Selektivität bezüglich der PGHS-2, sondern gegenüber der PGHS-1.

Nach der ersten Auftrennung enthielten alle Fraktionen ein Gemisch aus verschiedenen Triterpensäuren mit Oleanolsäure als Hauptkomponente. Auffällig war dabei, dass die Hemmwirkung abnahm, je reiner Oleanolsäure vorlag. Vergleichende IC_{50} -Bestimmungen (Tabelle F.1) zwischen reiner Oleanolsäure und ca. 15 % mit anderen Triterpensäuren verunreinigter Oleanolsäure sollte dieses Phänomen verdeutlichen.

*Tabelle F.1: Vergleich der IC_{50} -Werte reiner und verunreinigter Oleanolsäure aus *Chaenomelis fructus**

IC_{50} -Wert	PGHS-1	PGHS-2
Oleanolsäure	93 µg/ml	159 µg/ml
zu ca. 15% mit anderen Triterpensäuren verunreinigte Oleanolsäure	54 µg/ml	102 µg/ml

Zusätzlich änderte sich auch innerhalb der verunreinigten Oleanolsäurefraktionen die Selektivität. Im Trend zeigte sich, dass Verunreinigungen mit mittelpolaren Verbindungen zu PGHS-2 Selektivität führten, Verunreinigungen mit hydrophilen Verbindungen jedoch zu stärkeren Hemmwirkungen und hierbei abhängig von der Verunreinigung sowohl zu PGHS-1- als auch zu PGHS-2-Präferenz. Für nicht-triterpenoide Verbindungen konnte keine Hemmwirkung nachgewiesen werden.

Nach Isolierung der einzelnen Triterpensäuren wurden diese wiederum in einer Screeningkonzentration von 50 µg/ml in den beiden Testsystemen eingesetzt. Diese Konzentration entspricht einer molaren Konzentration von 97 - 110 µM für die getesteten Substanzen.

Aus diesen Ergebnissen konnte noch keine eindeutige Erklärung für die vorher beobachteten Tendenzen abgeleitet werden. Zwar wurde deutlich, dass PGHS-2 Selektivität bei den hydrophilen Verbindungen zu finden ist, und es wurde eine stärkere Wirkung für dreifachhydroxylierte Triterpensäuren festgestellt. Es war jedoch nicht ersichtlich, woher die PGHS-2 Selektivität bei den dihydroxylierten Triterpensäuren rührte.

Tabelle F.2: Wirkung der isolierten Triterpensäuren im PGHS-1/-2 Test aus *Chaenomelis fructus*

Verbindung		Konzentration		Hemmung	
		[µg/ml]	[µM]	PGHS-1	PGHS-2
TTS1	Oleanolsäure	50	110	23,8 ± 27,7	10,4 ± 8,4
TTS2	Pomolsäure	50	106	51,6 ± 8,2	49,4 ± 8,4
TTS4	Maslinsäure	50	106	-	14,3 ± 7,4
TTS7	Pirolonsäure	50	103	11,8 ± 3,7	47,4 ± 4,1
TTS3	Euscaphissäure / Tormentolsäure	50	102	43,4/ 21,4*	82,7/ 55,4*
TTS5	3β-O-Acetylursolsäure	50	100	44,9 ± 8,8	63,1 ± 6,9
TTS6	3β-O-Acetylpomolsäure	50	97	48,2 ± 18,4	56,7 ± 12,3

* Mittelwerte aus angereicherten Fraktionen

Um hierzu Aufklärung zu erhalten, wurden von den Hauptkomponenten der Triterpenfraktion IC₅₀-Werte bestimmt. Leider mußte aufgrund der geringen, isolierten Mengen von TTS3 und TTS7 darauf verzichtet werden, von diesen stark hemmenden Substanzen halbmaximale Hemmwerte zu bestimmen.

Tabelle F.3: IC₅₀-Werte der Hauptverbindungen der aktiven Fraktionen des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus*

Triterpensäure		IC ₅₀ PGHS-1		IC ₅₀ PGHS-2		Ratio PGHS-1/ PGHS-2
		[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]	
Oleanolsäure	TTS1	92,9	204	158,8	348	0,6
Pomolsäure	TTS2	31,9	68	16,8	36	1,9
3β-Acetylursolsäure	TTS5	16,9	34	19,4	39	0,9
3β-Acetylpomolsäure	TTS6	85,0	165	46,5	90	1,8

Bei der Bestimmung der IC₅₀-Werte war besonders auffällig, dass, obwohl sich die Werte bei einer Konzentration von 50 µg/ml kaum unterschieden, die Unterschiede der halbmaximalen Hemmung teilweise sehr groß waren. Die Regressionsgeraden bei semilogarithmischer

Auftragung (siehe Kapitel **H**) hatten für die beiden Isoenzyme sehr unterschiedliche Steigung. Die Gerade für Pomolsäurederivate war bei PGHS-2 sehr flach, was bedeutete, dass auch bei niedriger Konzentration noch gute Hemmung erreicht wurde, bei hoher Konzentration jedoch die Hemmwirkung auf die Isoenzyme wenig voneinander abwich.

Aus den IC_{50} -Werten war nun klar die PGHS-2 Selektivität für das jeweils hydrophile Derivat (TTS2 und TTS6) von Oleanolsäure bzw. Acetylursolsäure zu erkennen. Auch war daraus ersichtlich, dass Fraktion **IV** sehr hohe Hemmwerte aufwies, da in dieser Fraktion die aktiven Verbindungen TTS5 und TTS6 in hoher Konzentration zu finden waren. Verständlich wurde auch, weshalb die hydrophileren Fraktionen bessere Wirkung auf PGHS-2 zeigten: Pomolsäure und andere mehrfach hydroxylierte Verbindungen waren darin in höherer Konzentration enthalten.

Vergleicht man die Strukturen der untersuchten Verbindungen mit ihren Hemmeigenschaften, läßt sich feststellen, dass zwar insgesamt die stärkste Wirkung von Acetylursolsäure ausgeht, dass jedoch alle am Ring E in Position 19α hydroxylierten Triterpensäuren Selektivität gegenüber der PGHS-2 zeigten (Abbildung F.1).

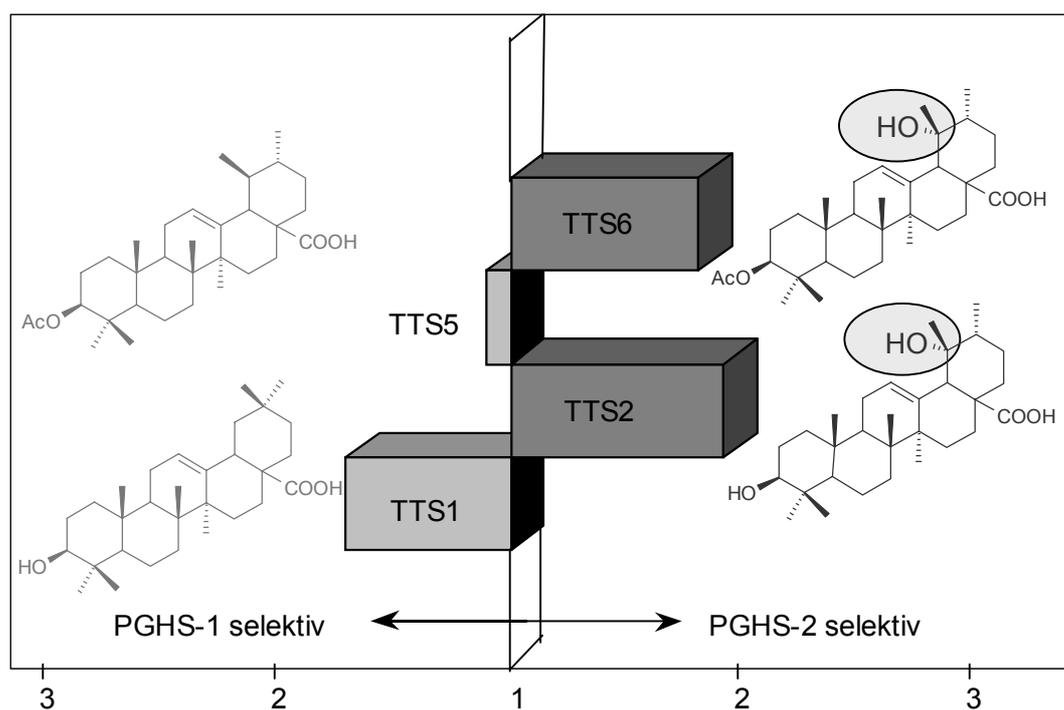


Abbildung F.1: Selektivität der isolierten Triterpensäuren aus *Chaenomelis fructus* berechnet Ratio PGHS-1/PGHS-2 für PGHS-1 selektive Verbindungen, PGHS-2/PGHS-1 für PGHS-2 selektive Verbindungen, Ratio = 1 bedeutet keine bevorzugte Hemmung eines Isoenzym

2.8.4. Pharmakologische Testung weiterer Bestandteile des Dichlormethan-extraktes

In der VLC-Fraktion **VI** waren Kristalle ausgefallen. Diese konnten als β -Sitosterol mit einem kleinen Anteil Campesterol identifiziert werden. Das Mischkristallinat wurde auf seine Wirksamkeit im PGHS-1 und -2 Assay in einer Screeningkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Für β -Sitosterol wurde bereits ein IC_{50} -Wert von 23,7 μM im COX-1 Test mit einer Mikrosomenfraktion beschrieben (PRÖBSTLE, 1994; BAUER, 1996). Dies entsprach einer Konzentration von 9,8 $\mu\text{g/ml}$.

Eigene Untersuchungen zeigten (Tabelle F.1), dass die Phytosterole eine leichte bis mäßige Hemmung der Isoenzyme bewirkten, jedoch die Gesamtwirkung der VLC-Fraktion **VI** im PGHS-2 Test verminderten. Da sie 35 % Gewichtsanteil in dieser Fraktion einnahmen, war diese Minderung bei nicht synergistischem Wirkmechanismus zu erwarten. Der oben beschriebene IC_{50} -Wert für PGHS-1 aus der Literatur für β -Sitosterol konnte mit reinem Enzym ebenfalls nicht bestätigt werden, da selbst bei einer molaren Einsatzmenge von 121 μM 50 %ige Hemmung nicht erreicht werden konnte.

Tabelle F.1: Hemmwirkung der VLC-Fraktion **VI**, besonders der Phytosterole

Testkonz. 50 $\mu\text{g/ml}$	Hemmung [%]		Ausbeute	
	PGHS-1	PGHS-2	[g]	[%]
Gesamtfraktion	69,6	90,3	1,57	100
Phytosterole (= 121 μM berechnet als β -Sitosterol)	41,8	29,4	0,55	35
Überstand	73,3	Max.	1,02	65

Die VLC-Fractionen **I** und **II** mit Paraffinen und langkettigen Alkoholen hatten keinen Hemmeffekt auf die Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme gezeigt. Auch einzelne isolierte Verbindungen waren inaktiv.

3. Diskussion

Der Dekokt der Früchte von *Chaenomeles speciosa* wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Antirheumatikum, Spasmolytikum und Stomachikum angewandt. Diese verschiedenen Indikationen deuten darauf hin, dass vermutlich entzündungshemmende Substanzen in der Droge enthalten sind, jedoch für den Magen keine schädigende Wirkung zu erwarten ist. Der antitumorale Effekt und die antiinflammatorischen Eigenschaften der Droge im Rattenpfotenödemtest zeigten, dass die Droge gerade bei chronischen Entzündungen und damit verbundenen Erkrankungen wirksam ist. Dies wurde zu Beginn der Untersuchungen als Hinweis für mögliche selektive PGHS-2 Inhibitoreigenschaften gewertet. Bisher existierten keine Untersuchungen zur Beeinflussung des Prostaglandin-H-Synthase-Isoenzyme durch *Chaenomeles*-Extrakte.

In der englischsprachigen und deutschsprachigen Literatur konnten nur wenige Quellen zu Inhaltsstoffen gefunden werden. Die meisten Inhaltsstoffe wie verschiedene Saponine, Flavone mit nicht näher bestimmter Struktur, verschiedene Pflanzensäuren, Sorbit und Oleanolsäure waren in hydrophilen Extrakten gefunden worden. Lipophile Inhaltsstoffe der Droge waren bisher nicht untersucht worden. Aus verwandten Arten waren triterpenoide Verbindungen ähnlich der Oleanolsäure isoliert worden (GUO et al., 1998). Untersuchungen der Inhaltsstoffe bezüglich ihrer hemmenden Eigenschaften auf die PGHS Isoenzyme existierten nicht.

Extrakte von *Chaenomeles speciosa*

Beim pharmakologischen Screening der verschiedenen, sukzessiv gewonnenen Extrakte war die Droge besonders durch ihre starke Hemmwirkung und weniger wegen ihrer Präferenz auf die PGHS-2 aufgefallen. Inhibitorische Eigenschaften zeigten in der Screeningkonzentration von 50 µg/ml sowohl der *n*-Hexanextrakt (Inh._{PGHS-1} 35 %; Inh._{PGHS-2} 65 %) als auch der Dichlormethanextrakt (DCM) mit sogar noch stärkerer Wirkung (Inh._{PGHS-1} 72 %; Inh._{PGHS-2} 61 %). Der Methanolextrakt besaß kaum Wirkung (Inh. beide Isoenzyme ca. 35 %). Bezüglich der Selektivität der Extrakte konnte kein einheitliches Ergebnis gefunden werden: der *n*-Hexanextrakt erwies sich als stärker PGHS-2 hemmend, der DCM-Extrakt beeinflusste keine der Isoformen bevorzugt (PGHS-2 - PGHS-1: *n*-Hexan: 30; DCM_{kor.}: 0,6).

Die pharmakologischen Untersuchungen zum Dichlormethanextrakt hatten ergeben, dass Triterpensäuren die Hemmwirkung des Extraktes bedingen. Nur Fraktionen, die reich an Triterpensäuren waren, zeigten inhibitorisches Potential gegenüber den PGHS-Isoenzymen.

Der HPLC- und DC-Vergleich der Inhaltsstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und auch pharmakologisch untersucht worden waren, zeigte, dass bei der sukzessiven

Extraktion mit *n*-Hexan große Mengen an Wachsbestandteilen wie Paraffine, langkettige Alkohole und Phytosterole eluiert wurden. Sie hatten keine hemmenden Eigenschaften auf die PGHS-Isoenzyme gezeigt. Die beiden gut hemmenden Triterpensäuren 3 β -O-Acetylursolsäure und 3 β -O-Acetylpomolsäure lagen in diesem *n*-Hexanextrakt zwar in größeren Mengen vor, jedoch führte der große Anteil an unwirksamen Substanzen zu einer Nivellierung der Hemmwirkung. Bei der sukzessiven Dichlormethanextraktion wurden hauptsächlich Triterpensäuren eluiert. Daraus resultierte eine starke Hemmwirkung. Der sukzessive Methanolextrakt enthielt nur noch geringe Mengen Triterpensäuren, aber große Mengen Farbstoffe und Chlorophyll. Sie schwächten die Wirkung des sukzessive hergestellten Methanolextraktes ab. Auf der DC wurden sie am Start, im HPLC-Chromatogramm gleich nach dem Lösungsmittelpeak detektiert. Im Dekokt waren ebenfalls geringe Mengen an Oleanolsäure enthalten. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb der Dekokt im Gegensatz zum sukzessiv gewonnenen Extrakt mit Wasser, der keine Triterpensäuren mehr enthielt, noch leichte Hemmwirkung auf die PGHS-Isoenzyme zeigte (0% H₂O vs. ca. 10 % Dekokt).

Im direkt hergestellten Dichlormethanextrakt wurden alle Triterpensäuren eluiert, so dass in der Screeningkonzentration von 50 μ g/ml maximale Hemmung der PGHS-Isoenzyme gefunden wurde. Die sehr lipophilen Wachsbestandteile und die Pflanzenfarbstoffe beeinflussten durch geringere relative Konzentration die Gesamthemmung nicht mehr.

Der Vergleich von direkt hergestellten Dichlormethanextrakten verschiedener Drogenmuster zeigte sowohl in der HPLC-Analyse als auch beim DC-Vergleich, dass die Droge „Mugua“ einen einheitlichen Fingerprint ihrer Inhaltsstoffe aufwies. Alle identifizierten Verbindungen waren in allen Extrakten zu finden. Dabei fanden sich auch nur geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den untersuchten Drogenmustern. Diese minimalen Unterschiede wirkten sich kaum auf die hemmenden Eigenschaften aus: alle Drogenmuster wiesen sehr starke Hemmung auf. Drogenmuster **C** zeigte noch etwas deutlicher PGHS-2 Präferenz als Drogenmuster **B99** (Ratio PGHS-1/PGHS-2: **C**: 5,7; **B99**: 2,2). Es enthielt die größte Menge Pomolsäure der verglichenen Drogenmuster. Da Pomolsäure hinsichtlich der PGHS-2 präferentiell wirkte, könnte dies den Wirkunterschied erklären.

Aktive Fraktionen und Triterpene des Dichlormethanextraktes von *Chaenomelis fructus*

Der direkt hergestellte Dichlormethanextrakt wurde durch VLC fraktioniert. In den sehr lipophilen Fraktionen (bis 85 % *n*-Hexananteil) konnte keine inhibitorische Wirkung der Fraktionen festgestellt werden. In diesen Fraktionen wurden langkettige Kohlenwasserstoffe und Paraffine eluiert. Erst ab einem *n*-Hexananteil von 75 % waren die Triterpensäuren Hauptbestandteile der Fraktionen. Diese Fraktionen zeigten stark hemmende Eigenschaften gegenüber den PGHS-Isoenzymen.

Bei weiterer Fraktionierung und Reinigung einzelner Triterpensäuren nahm jedoch deren Wirkung mit zunehmendem Reinheitsgrad ab. Besonders deutlich wurde dies bei der Reinigung der Oleanolsäure. Reine Oleanolsäure zeigte in der Screeningkonzentration von 50 µg/ml auf die PGHS-1 24 %, auf die PGHS-2 10 % Hemmung. VLC-Fractionen, die einen Anteil von 55 bzw. 70 % Oleanolsäure enthielten, hemmten die Enzyme zu ca. 70 % (PGHS-1) bzw. 85 % (PGHS-2). Oleanolsäure mit einem 15 %igen Anteil an weiteren Triterpensäuren gemischt, zeigte um ca. 40 % verbesserte IC_{50} -Werte gegenüber der reinen Triterpensäure. Auch 3-β-O-Acetylursolsäure, die von den isolierten Triterpensäuren die PGHS-Isoenzyme am stärksten hemmte, erreichte in der Screeningkonzentration von 50 µg/ml nur ca. 60 % Hemmung. VLC-Fraktion VI, mit einem Anteil von ca. 70 % 3-β-O-Acetylursolsäure, in gleicher Screeningkonzentration getestet, zeigte hingegen zwischen 70 und 90 % Hemmung auf die Isoenzyme. Sowohl Oleanolsäure als auch 3-β-O-Acetylursolsäure lagen eng vergesellschaftet mit der strukturell ähnlichen Pomol- bzw. 3-β-O-Acetylpomolsäure vor. Die Mischungen zwischen diesen Triterpensäuren führten zu starken Wirkungssteigerungen. Keine einzelne Triterpensäure erreichte das Hemmpotential der Triterpensäuremischungen und der Fraktionen. Ebenso erreichte keine Fraktion die starke Hemmung des Gesamtextraktes. Dies bedeutete, dass sich die einzelnen Triterpensäuren vermutlich gegenseitig in ihrer Wirkung auf die PGHS-Isoenzyme verstärken.

Innerhalb der Fraktionen wurde weiterhin beobachtet, dass die bevorzugte Wirkung auf eines der Isoenzyme jeweils vom Mischverhältnis der einzelnen Triterpensäuren abhängig war. Die Mischung von Oleanol- und Pomolsäure mit dreifachhydroxylierten, hydrophilen Triterpensäuren steigerte die bevorzugt PGHS-2 hemmenden Eigenschaften. Für die Wirkstärke und die Präferenz der Fraktionen war somit nicht eine einzelne Triterpensäure, sondern immer das Zusammenspiel von verschiedenen triterpenoiden Säuren ausschlaggebend.

Bei der wirkungsorientierten Fraktionierung des Dichlormethanextraktes wurden vor allem Triterpensäuren isoliert. Bisher war nur **Oleanolsäure** als mittelpolarer Inhaltsstoff von *Chaenomelis fructus* bekannt. Sie war in so großen Mengen in der Droge enthalten, dass sie selbst im sukzessiv hergestellten Methanolextrakt und im Dekokt nachweisbar war.

Aus den getrockneten Früchten von *Chaenomeles speciosa* wurden zusätzlich die Triterpensäuren Pomolsäure, Euscaphissäure, Tormentolsäure, Maslinsäure, Prolonsäure, 3β-O-Acetylursolsäure und 3β-O-Acetylpomolsäure (Abbildung F.1) sowie die Phytosterine β-Sitosterin und Campesterol als triterpenoide Verbindungen isoliert und identifiziert. Mit Ausnahme von Oleanolsäure wurden alle identifizierten Verbindungen für *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai bisher noch nicht beschrieben.

Langkettige Kohlenwasserstoffe und Alkohole waren die zweite Verbindungsklasse, die im Dichlormethanextrakt (DCMD) in großer Menge enthalten war. Die gefundenen Inhaltsstoffe

sind in der Familie der Rosaceae weit verbreitet (HEGNAUER, 1973). Betrachtet man nahe Verwandte der Zierquitte wie den Apfel oder die Birne, so enthalten diese Früchte vor allem in den Schalen eine ähnliche Vielfalt an Triterpensäuren wie *Chaenomeles speciosa*. BRIESKORN et al. (1974) bestimmten in Birnen- und Apfelschalen den Triterpensäuregehalt durch GC-MS-Analyse nach Derivatisierung (Tabelle F.1). Ursol-, Pomol- und Oleanolsäure sind demnach die Hauptinhaltsstoffe in Birnen- und Apfelschalen (vgl. Tabelle F.1).

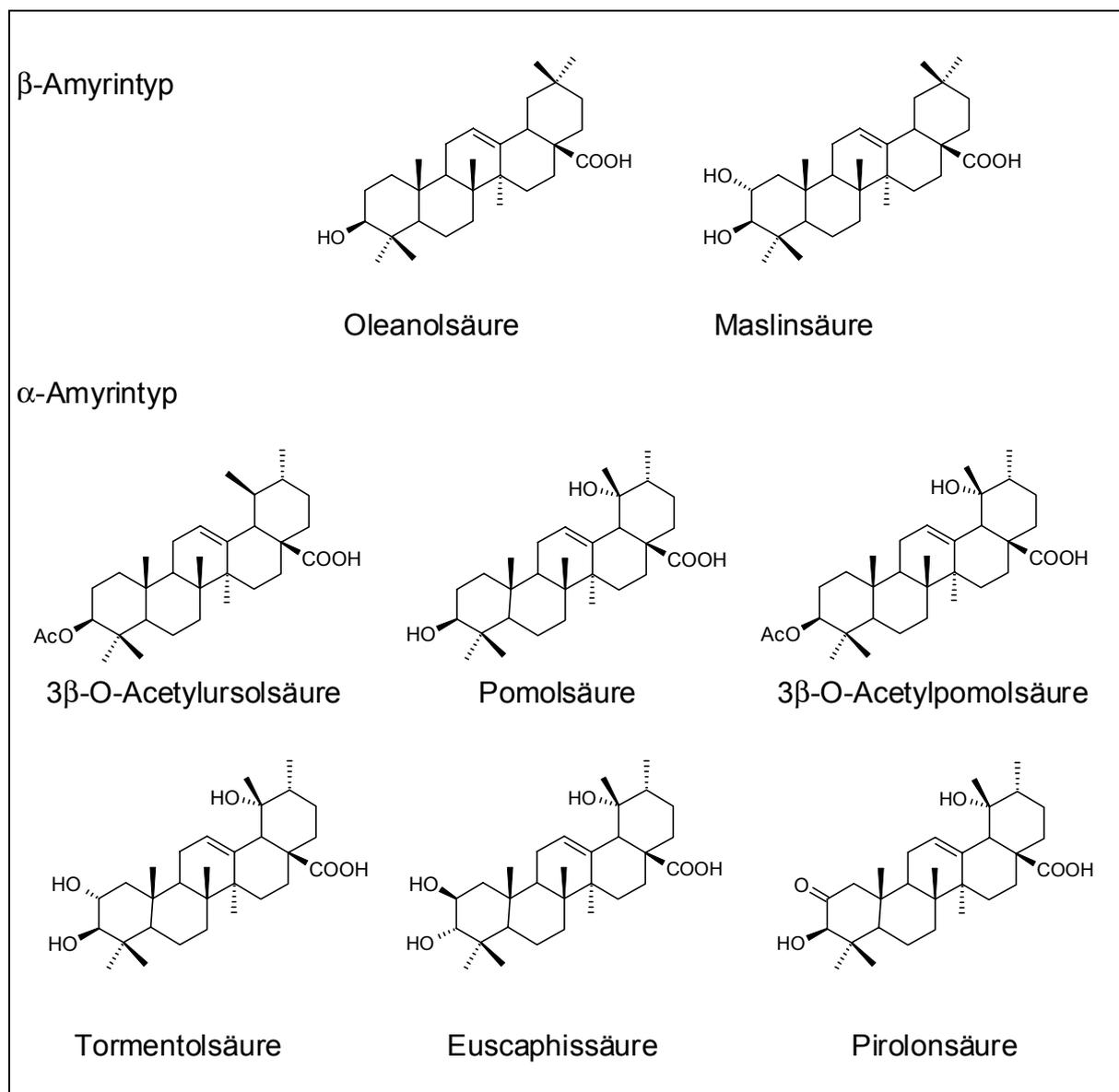


Abbildung F.1: Strukturformeln der isolierten Triterpensäuren aus *Chaenomelis fructus*

Im Vergleich zu diesen Früchten enthielt *Chaenomelis fructus* weit mehr Oleanolsäure (ca. 70 % der Triterpensäuren des Dichlormethanextrakt). Ursolsäure war nur in Spuren vorhanden.

Nach HPLC-Untersuchungen kam im Gesamtextrakt von *Chaenomelis fructus* 3 β -O-Acetylsolsäure als zweithäufigster Inhaltsstoffe vor (20 % der Triterpensäuren). Die zweite acetylierte Triterpensäure, 3 β -O-Acetylpomolsäure war mengenmäßig der drittgrößte Bestandteil des untersuchten DCMD-Extraktes. Alle anderen Triterpensäuren waren nur in geringen Mengen enthalten.

Tabelle F.1: Triterpensäuren des Diethyletherextraktes von Birnen- und Apfelschalen in % (nach Brieskorn et al., 1974)

Triterpensäure	Gehalt [%]		Triterpensäure	Gehalt [%]	
	Birnen- schale	Apfel- schale		Birnen- schalen	Apfel- schalen
Ursolsäure	46,6	72,5	Tormentsäure	0,1	1
Oleanolsäure	13,3		2 α -Hydroxyoleanolsäure	2,8	
Pomolsäure	29,3	17	2 α -Hydroxyursolsäure	6,9	7,5
Pomonsäure	0,3	2	2-Oxopomolsäure (Pirrolonsäure)	0,7	

Die Untersuchungen der Triterpensäuren machten die enge Verwandtschaft zwischen diesen Rosaceenfrüchten deutlich. Ihre Inhaltsstoffe unterscheiden sich dennoch soweit, dass sie sowohl einen verschiedenen Geschmack und Gebrauch, als auch ein unterscheidliches pharmakologisches Profil besitzen: nur Äpfel und Birnen werden roh als Obst verzehrt, *Chaenomeles* ist dagegen zu wenig süß und zu hart. Es kann aber zur Marmeladenherstellung verwendet werden (SCHORMÜLLER, 1968). Sowohl Äpfeln als auch Birnen wird ein gesundheitlicher Nutzen zuerkannt (EBERHARDT et al., 2000), jedoch wird keine der beiden Früchte traditionell als Arzneimittel angewandt.

Pharmakologisches Wirkprofil einzelner Triterpensäuren

Hauptinhaltsstoff des Dichlormethanextraktes war Oleanolsäure. Oleanolsäure gehört sicherlich auch zu den pharmakologisch interessanten Inhaltsstoffen. Oleanolsäure und Ursolsäure werden beispielsweise bei Hepatitis, bei Leberschäden und als Leberschutzmittel eingesetzt. Eine klinische Studie mit 70 Probanden, die täglich 60-90 g Oleanolsäure einnahmen, verlief erfolgreich und ohne Nebenwirkungen. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus für die Wirkung auf die Leber ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Wirkung erfolgt vermutlich nicht nur an einem Angriffspunkt, sondern resultiert aus Interaktionen an mehreren Targets. Als wesentliche Wirkung wurde beispielsweise die

Herabsetzung der Aktivität des Cytochrom P-450 Systems beobachtet. Dieser Effekt war aber nicht groß genug, um die Gesamtwirkung zu erklären. Die Freisetzung von antioxidativen Komponenten könnte die Wirkung verstärken. Der mögliche Angriff von Oleanolsäure und ihren Derivaten an den verschiedenen Targets wird durch weitere Untersuchungen belegt:

- ein antiviraler Effekte gegen HIV (KASHIWADA et al., 1998; XU et al., 1996);
- Einfluss auf die Acyl-CoA-Cholesteryl-Acyl-Transferase (ACAT) (NISHIMURA et al., 1999);
- Aktivität gegen Magengeschwüre und gastrointestinale Beschwerden, gegen Bakterien und Pilze (BAYKAL et al., 1998),
- ein blutfettsenkender Effekt (NUMATA et al., 1989);
- ein effektiver Einsatz gegen erhöhte Blutzuckerspiegel (VILLAR et al., 1985; IVORRA et al., 1988).

Oleanolsäure ist wenig toxisch (Mortalitätsrate bei s.c. Injektion von 1 g/kg bei Mäusen nach 5 Tage = 0). In Japan wurde sie als Zusatz zu Gesundheitsdrinks (OKUBO et al., 1990) und Haartonika (OKAZAKI et al., 1987) patentiert.

Bekannt ist auch die **antiinflammatorische** Wirkung von Ursol- und Oleanolsäure. Diese Wirkung war im Rattenpfotenödemtest und bei der durch Adjuvans induzierten Arthritis gefunden worden. Die Wirkung konnte durch eine Hemmung der Histaminfreisetzung, eine Hemmung der Lipoxygenase und Cyclooxygenase, der Hemmung der Elastase und der Hemmung des Komplementsystems erklärt werden (LIU, 1995).

Erfolgreich war auch der Einsatz von Triterpenen mit Oleanen-, Ursen- und Lupengrundkörper zur Chemoprävention von Krebs (SPORN et al., 2000). Die Wirkung ließ sich vor allem durch die Unterdrückung der Expression von iNOS und PGHS-2 auf genetischer Ebene erklären (SUBBARAMAIAH et al., 2000). Ebenso wurde in zellulären Systemen beobachtet, dass durch die Expressionshemmung der PGHS-2 eine Minderung der PGE₂-Produktion gefunden wurde (SUH et al., 1998). Als mögliches Wirkprinzip wurde dafür die Ähnlichkeit der Strukturen zu Steroidhormonen oder zu Cholesterin diskutiert.

In unseren PGHS-1 und -2 Screening-Assays war diese Wirkung nicht ausschlaggebend für die inhibitorischen Eigenschaften. Die Enzyme wurden in Reinform eingesetzt und nur ihre Umsetzung der Arachidonsäure und damit eine direkte Enzymhemmung wurde gemessen. Ein direkter Einfluss auf die Cyclooxygenase wurde von RINGBOM et al. (1998) bereits beschrieben. Ursolsäure und Oleanolsäure aus *Plantago lanceolata* wurden dabei als selektive Hemmstoffe der COX-2 identifiziert. Ursolsäure hemmte mit einem IC₅₀-Wert von 130 µM

(PGHS-2) und 210 μM (PGHS-1), Oleanolsäure mit 295 μM (PGHS-2) und 380 μM (PGHS-1). Die Selektivität für Oleanolsäure bzw. der Ursolsäure betrug gegenüber der PGHS-2 0,6 bzw. 0,8 (Ratio (PGHS-2/PGHS-1)). Die Hemmung war zeitabhängig, was bedeutete, dass der inhibitorische Effekt auf die PGHS-2 bei längerer Vorinkubationszeit stärker stieg als auf die PGHS-1. Die Hemmung der PGHS-2 entsprach in ihrer Hemmstärke in etwa den von uns gemessenen Werten (Oleanolsäure $\text{IC}_{50 \text{ PGHS-2}} = 380 \mu\text{M}$ (RINGBOM et al., 1998) vs. 348 μM). Die Hemmung auf die PGHS-1 wurde allerdings mit einer Mikrosomenfraktion gemessen, wodurch die inhibitorische Wirkung deutlich niedriger war, als die von uns gemessene Hemmung des PGHS-1 Reinenzyms. Die Ratio aus dem Vergleich der Mikrosomenfraktion mit der Hemmung des Reinenzyms ergab somit rechnerisch eine PGHS-2 Selektivität. Wurden jedoch jeweils die Beeinflussungen der Reinenzyme betrachtet, hemmten sowohl Oleanolsäure als auch $3\beta\text{-O-Acetylursolsäure}$ die PGHS-1 besser als die PGHS-2. Für jede Berechnung und Bewertung von Ratios ist es deshalb erforderlich die entsprechenden Versuchsbedingungen zu kennen.

Die Triterpensäuren waren im Vergleich zu synthetischen Inhibitoren wie Indometacin oder NS-398 nur schwach wirksam ($\text{IC}_{50 \text{ Indometacin}} 1 \mu\text{M}$ (PGHS-1/-2), $\text{IC}_{50 \text{ NS 398}} 2,6 \mu\text{M}$ (PGHS-2), $\text{IC}_{50 \text{ Oleanolsäure}} 206 \mu\text{M}$ (PGHS-1) $\text{IC}_{50 \text{ Pomolsäure}} 36 \mu\text{M}$ (PGHS-2)).

Studien zum Wirkmechanismus oder Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Triterpensäuren mit Einfluss auf die PGHS-Isoenzyme fehlten bislang. Bei der Hemmung der 5-Lipoxygenase hatten Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Boswelliasäuren gezeigt, dass bei diesen Ursantriterpenen Struktur-Wirkungsabhängigkeiten bestehen (Abbildung F.2). Entscheidend für die Wirkung ist zum einen eine Ketogruppe an Position 11 eines pentazyklischen Triterpengrundkörpers, zum anderen eine hydrophile Gruppe an Position 4, die bevorzugt eine Carbonylfunktion sein sollte (SAILER et al., 1996). Strukturveränderungen am Ring C können zur Änderung von einer kompletten zu einer partiellen Hemmung der 5-Lipoxygenase führen (SCHWEIZER et al., 2000). Der Angriffspunkt der Boswelliasäuren liegt dabei außerhalb der Substrat bindenden Region an einer spezifischen Bindungsstelle für Triterpene (SAFAYHI et al., 1995). Verschiedene triterpenoide Alkohole aus *Calendula officinalis* und Arnika-Arten zeigten im COX-1-Test mit einer Mikrosomenfraktion oder im Crotonöl-induzierten Mäuseohrödemitest, dass mit mehrfacher Hydroxylierung die antiinflammatorische Aktivität gesteigert wird (Monole < Dirole < Triole). Dabei ist ebenso entscheidend, dass die Hydroxylgruppen frei vorliegen bzw. womit sie verestert sind (Abbildung F.2) (DELLA LOGGIA et al., 1994; VON RAISON, 1999). Im Rattenpfotenödemitest zeigten andere Triterpene wie z.B. Betulinsäure oder Triterpenalkohole inhibitorische Eigenschaften ohne erkennbare Struktur-Wirkungsbeziehung (MANEZ et al., 1997). RIOS et al. (1999) beschrieben das Phänomen, dass nur Triterpenfraktionen mit

Dichlormethan extrahiert antiinflammatorische Wirkung zeigten, während sich die Triterpene aus dem *n*-Hexanextrakt in verschiedenen Ödemtesten als unwirksam erwiesen.

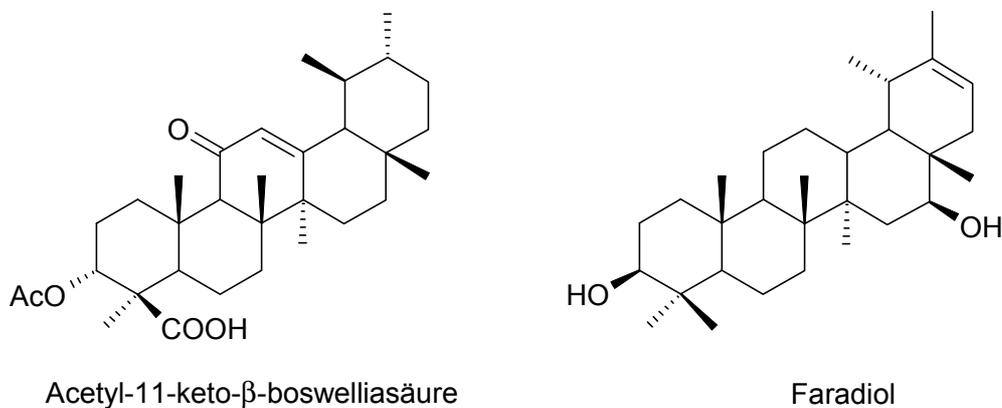


Abbildung F.2: Strukturformeln von 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure und Faradiol

Die von uns untersuchten Stoffe zeigten deutliche Abhängigkeit zwischen ihrer Struktur und ihren Hemmeigenschaften. Abbildung F.3 verdeutlicht ausschlaggebende Strukturen.

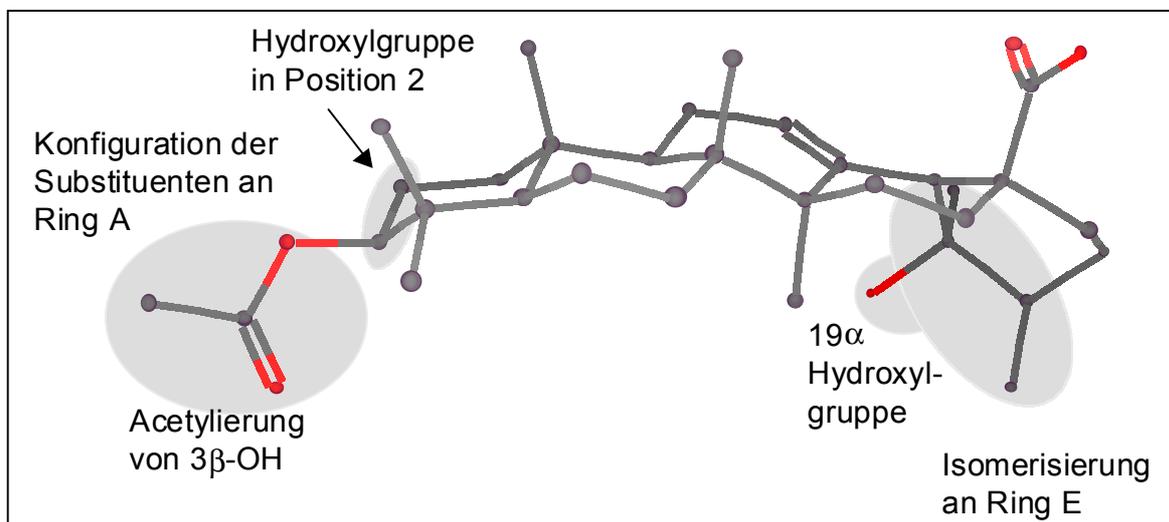


Abbildung F.3: Dreidimensionale Struktur von 3 β -O-Acetylpomolsäure mit Kennzeichnung der Positionen, die pharmakologische Relevanz zeigen

Der Vergleich zwischen Oleanolsäurederivaten und Ursolsäurederivaten zeigte, dass Ursolsäurederivate die PGHS-Isoenzyme deutlich besser hemmten als die an Ring E strukturisomere Oleanolsäure und deren Derivate. 3- β -Acetylsolsäure zeigte IC_{50} -Werte unter 40 μ M, während die IC_{50} -Werte für Oleanolsäure über 200 μ M lagen.

Bereits deutlich bessere Hemmeigenschaften als Oleanolsäure zeigte Pomolsäure. Sie besitzt einen α -Amyringrundkörper und eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Ring E. Die 19 α -Hydroxylgruppe war aber nicht der Grund für die stärkere Hemmung, sondern diese musste eine Auswirkung der Verschiebung der CH_3 -Gruppe in Ring E sein. Dies zeigte auch deutlich der Vergleich zwischen 3 β -O-Acetylsolsäure und 3 β -O-Acetylpomolsäure. 3 β -O-Acetylsolsäure besaß nochmals stärkere Gesamtwirkung als das hydroxylierte Derivat. Die Wirkungspräferenz war jedoch zur PGHS-1 hin verschoben. 3 β -O-Acetylpomolsäure zeigte jedoch ebenso wie Pomolsäure präferentielle PGHS-2 Wirkung. Die Hydroxylgruppe in Position 19 α bedingte also die Präferenzverschiebung von PGHS-1 zu bevorzugter PGHS-2 Wirkung. Bei allen entsprechenden Derivaten konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden.

Bei den acetylierten Triterpensäuren konnte eine Hemmung durch Acetylierung der Seitenkette des Serins 530 im Kanal der PGHS, wie sie für Acetylsalicylsäure bekannt ist, nicht beobachtet werden. Die beiden Verbindungen neigten nicht zur Essigsäureabspaltung, sondern erwiesen sich als äußerst stabil. Außerdem konnte keine weitere Steigerung ihrer Hemmeigenschaften im Vergleich zu den nicht-acetylierten Derivaten gefunden werden. Pomolsäure zeigte sogar stärkere Hemmung als 3 β -O-Acetylpomolsäure.

Neben Oleanolsäure und Pomolsäure konnten aus *Chaenomelis fructus* weitere mehrfach hydroxylierte Triterpensäuren isoliert werden. Die Gesamtfraktion dieser hydrophilen Triterpensäuren (Maslinsäure, Euscaphissäure und Tormentolssäure) zeigte nur eine sehr geringe Beeinflussung der PGHS. Erst nach Abtrennung der zweifach hydroxylierten Maslinsäure von den dreifachhydroxylierten Säuren, bewiesen diese gute Aktivität gegenüber den beiden PGHS-Isoenzymen und wiederum Selektivität für das induzierbare Enzym. Alle wirksamen Säuren besaßen α -Amyringrundkörper und an Position 19 α die Selektivitätsentscheidende Hydroxylgruppe.

Die zwei dreifach hydroxylierten Triterpensäuren Euscaphis- und Tormentolssäure unterscheiden sich nur in der Konfiguration der OH-Gruppe in Position 2 und 3 und waren mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht weiter auftrennbar. Da sie nur in sehr geringen Mengen isoliert werden konnten, war eine Bestimmung der IC_{50} -Werte nicht möglich. Dieses Triterpensäuregemisch zeigte die größte Selektivität hinsichtlich der PGHS-2 und gute Hemmwirkung auf die Isoenzyme. Eine Fraktion, in der Euscaphissäure angereichert vorlag, zeigte die höchste Selektivität und Inhibition der hier verglichenen Triterpensäuren.

Die Einführung einer weiteren Sauerstofffunktion an Ring A verbesserte also nochmals die PGHS-2 Selektivität gegenüber der Pomolsäure. Die Konfigurationsänderung in Ring A durch den Wechsel der Hydroxylgruppe von β nach α bei Euscaphissäure bewirkte eine weitere Aktivitätssteigerung besonders gegenüber PGHS-2.

Pirolonsäure zeigte im PGHS-Test in der Screeningkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ nur geringe Aktivität jedoch gute Selektivität gegenüber der PGHS-2. Diese Triterpensäure besaß wiederum die für selektive Hemmung benötigte 19α -Hydroxylgruppe. Hier war die Konformation durch die Carbonylgruppe in Ring A etwas verändert, was sich zwar negativ auf die Gesamthemmung auswirkte, jedoch blieb der positive Einfluss einer weiteren hydrophilen Substitution an Ring A erhalten, der in der Selektivität gegenüber der PGHS-2 sichtbar wurde.

Maslinsäure ist mit Tormentolsäure an Ring A identisch, mit Oleanolsäure an Ring E. Es konnte in der eingesetzten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ keine deutliche Hemmung der Isoenzyme gefunden werden. Dieser Triterpensäure fehlte im Ring E die nach den bisherigen Beobachtungen notwendige Strukturähnlichkeit mit Ursolsäure und eine Hydroxylgruppe an Position 19α , um die PGHS Isoenzyme stark und PGHS-2-präferentiell zu hemmen.

Der Vergleich der verschiedenen Triterpensäuren zeigte eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung. Nach diesen Beobachtung hatte Euscaphissäure die besten Hemmeigenschaften und die stärkste Selektivität gezeigt. Sie besaß an Ring E eine α -Amyrinstruktur, was ihre Hemmstärke bedingte und die Hydroxylgruppe in Position 19α , die als notwendig für selektive PGHS-2 Hemmung gefunden wurde. Weiterhin wirkte sich die Einführung einer zusätzlichen OH-Gruppe an Ring A und die Konfigurationsänderung positiv sowohl auf die Hemmstärke als auch auf die Selektivität von Euscaphissäure aus. Ihre Struktur könnte somit als Vorlage für die Erforschung weiterer selektiv PGHS-2 hemmender triterpenoide Stoffe dienen.

In vivo* Wirksamkeit von *Chaenomeles fructus

Chaenomelis fructus Extrakte hatten im Mäusepfotenödemtest positive antiinflammatorische Wirkung gezeigt. Oleanolsäure wurde bereits vielfach positiv gegen Entzündungen eingesetzt. Im traditionell verwendeten Dekokt konnte Oleanolsäure detektiert werden, so dass angenommen werden kann, dass von diesem Inhaltsstoff eine *in vivo* Wirkung ausgeht. Zur Therapie von Hepatitis in China werden 60-90 mg Oleanolsäure täglich oral verabreicht (LIU, 1995). Diese Menge Oleanolsäure dürfte in der empfohlenen Dosierung des Dekoktes von 6-9 g Droge täglich jedoch nicht erreicht werden. Der direkt mit Dichlormethan hergestellte Extrakt aus der gleichen Menge Droge enthielt jedoch trotz geringer Ausbeute von 1,9 % gerade diese Oleanolsäuremenge. Weiterhin fiel auf, dass andere gut wirksame

Triterpensäuren, die auch präferentielle PGHS-2 Wirkung aufwiesen, relativ hydrophil waren (Euscaphissäure, Tormentolsäure), wodurch Aussicht besteht, dass sie ebenfalls in den traditionell angewandten Dekokt gelangen, jedoch wegen zu geringer Konzentration von uns nicht detektiert werden konnten.

Triterpene und im besonderen Ursolsäure werden zu den Phytaminen gezählt (METZ, 2000). Ihr chemopräventives Potential gegen die Entstehung von Krebs (NISHINO et al., 1988; HUANG et al., 1994) ist dokumentiert. Ihre Wirkung ist allerdings nur schwach. Oleanolsäure wird als Leitsubstanz zur Entwicklung von Chemopräventiva verwendet. Für die modifizierte Triterpensäure 2-Cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-säure konnte 1000fach stärkere Wirkung als für Oleanolsäure nachgewiesen werden (SPORN et al., 2000). SPORN et al. sehen vor allem auch in der natürlichen Vielfalt von Cyclosqualenverbindungen ein großes Potential für weitere Untersuchungen und zählen diese Verbindungsklasse zu den Arzneimitteln der Zukunft. Ihre bisherigen Forschungen gehen allerdings davon aus, dass die Chemoprävention durch Expressionshemmung der iNOS und COX-2 zustande kommt. Unsere Untersuchungen zeigen, dass für bestimmte Triterpensäuren wohl auch ein dualer Wirkmechanismus möglich ist. Verbindungen mit dualem Wirkmechanismus wie beispielsweise auch R-Flurbiprofen, das sowohl die Expression als auch das PGHS-2-Enzym moderat aber direkt hemmt, sind Ziel aktueller Forschungsprojekte (TEGEDER et al., 2000).

Aufgrund dieser Beobachtungen könnte davon ausgegangen werden, dass die isolierten Triterpensäuren einen Beitrag zur Wirksamkeit der Droge *Chaenomelis fructus* leisten.

G Zusammenfassung

Die Entdeckung einer zweiten Isoform der Prostaglandin-H-Synthase (PGHS), die an Entzündungsorten verstärkt exprimiert wird, lieferte einen neuen Ansatzpunkt, die Wirkweise anti-inflammatorisch wirksamer pflanzlicher Drogen zu erklären und nach neuartigen Leitstrukturen im Pflanzenreich zu suchen. Um Wirkstärken, Wirkmechanismen und präferentielle Wirkung von pflanzlichen Extrakten und Naturstoffen bezüglich der beiden Isoformen der PGHS zu untersuchen, wurden zwei neue, schnelle, durchsatzstarke und bezüglich der beiden Isoenzyme vergleichbare, spezifische Mikrotiterassays entwickelt. Die Tests wurden mit gereinigter PGHS-1 aus Schafsamenblasen und gereinigter PGHS-2 aus Schafcotyledonen durchgeführt. Von beiden Enzymen wurde gleich hohe Aktivität eingesetzt, was zu einer guten Vergleichbarkeit führte. Cofaktoren, Substratkonzentration und Reaktionszeiten wurden den optimalen Umsetzungsbedingungen der Enzyme angepaßt. Das Design im Mikrotitermaßstab mit beiden Enzymen auf einer Mikrotiterplatte und einem einheitlichen Pipettierschema wurden gewählt, um eine schnelle Versuchsdurchführung und eine Automatisierung der Auswertung zu ermöglichen. Die Detektion des gebildeten PGE₂ wurde von der Messung radioaktiv markierter Arachidonsäuremetabolite mittels HPLC auf einen PGE₂-EIA (Enzymimmunoassay) umgestellt. Dies ermöglichte das Arbeiten ohne Radioaktivität und die Verkürzung der Gesamttestzeit für 30 Proben von 40 h auf 5 h.

Für bekannte PGHS-Inhibitoren wurden mit dem neuen Test Werte gemessen, die mit Literaturangaben im Einklang standen (Indometacin IC₅₀ (PGHS-1) = 0,8 µM; IC₅₀ (PGHS-2) = 0,9 µM). Bekannte selektive Hemmstoffe erreichten auch im neuentwickelten Testsystem überragende PGHS-1/PGHS-2 Hemmverhältnisse (IC₅₀-Ratio PGHS-1/PGHS-2): von NS-398 ≅ 20; von Rofecoxib (VIOXX®) > 36000 (Löslichkeitsgrenze erreicht!).

Die PGHS-1 und -2 Testsysteme dienten vor allem dem gezielten Screening von anti-inflammatorisch wirksamen Drogen aus der traditionellen chinesischen Medizin (TCM), die bei entzündlichen, schmerzhaften oder rheumatischen Erkrankungen eingesetzt werden. 58 Drogen wurden sukzessiv mit *n*-Hexan, Dichlormethan und schließlich Methanol extrahiert. Dadurch konnten die wirksamen Bestandteile bzgl. ihrer Löslichkeit und Polarität charakterisiert werden. Alle Drogen (Ausnahme: *Eucommiae cortex* und *Rubiae radix*) zeigten für mindestens einen ihrer Extrakte inhibitorische Eigenschaften auf die PGHS-Isoenzyme. Als stark wirksam erwiesen sich 46 von insgesamt 174 getesteten Extrakten. Interessant war jedoch nicht allein eine gute Hemmwirkung, sondern eine bevorzugte Hemmung der PGHS-2.

Der Vergleich der Extrakte zeigte, daß kein Extrakt eine ausgeprägte selektive Hemmung aufwies. Eine präferentiell bessere Hemmung bezüglich der PGHS-2 zeigten ca. 40 Extrakte.

Von den getesteten, bevorzugt PGHS-2 hemmenden Drogen wurden wiederum zwölf Drogen ausgewählt, deren Dichlormethanextrakte intensiver untersucht wurden. Zehn der gewählten Drogen zeigten dabei auf Basis ihrer halbmaximalen Hemmwerte eine präferentielle Wirkung auf die PGHS-2. Die PGHS-1/PGHS-2 Hemmverhältnisse lagen zwischen 1,7 und >7. Da es sich bei Extrakten um Multikomponentengemische mit Inhaltsstoffen großer struktureller Vielfalt handelt, ist anzunehmen, dass neben selektiven auch viele nicht-selektive Hemmstoffe der PGHS vorliegen. Damit war auf Extraktebene nicht zu erwarten, dass bereits ausgeprägte Selektivitäten gemessen werden. Vielmehr musste eine Fraktionierung und Anreicherung einzelner Inhaltsstoffe erfolgen, um eindeutige Aussagen machen zu können.

Fünf Drogen wurden zunächst einer Fraktionierung unterzogen, und schließlich wurden *Platycodi radix* und *Chaenomelis fructus* für intensivere Untersuchungen ausgewählt.

Platycodi radix (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC., Campanulaceae) wird in der TCM vor allem bei Lungenleiden, aber auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Der Dichlormethanextrakt der Droge zeigte gute inhibitorische Eigenschaften gegenüber den beiden Isoformen ($IC_{50} \text{ PGHS-1} = 17,6 \mu\text{g/ml}$ bzw. $IC_{50} \text{ PGHS-2} = 4,0 \mu\text{g/ml}$), wobei für das induzierbare Enzym eine Präferenz bestand. Wirkungsorientierte Fraktionierung zeigte, dass Linolsäure neben anderen Fettsäuren in allen hemmenden Fraktionen als Hauptinhaltsstoff vorlag. Die IC_{50} -Bestimmung der Fettsäuren ergab, daß Linolsäure und α -Linolensäure auf beide Isoenzyme einen starken Hemmeffekt ausübten. Die Ratio PGHS-1/PGHS-2 der IC_{50} -Werte lag bei ca. 7. Damit zeigten die beiden ungesättigten Fettsäuren eine deutliche Präferenz gegenüber der PGHS-2. Die Quantifizierung ergab einen Gehalt von 20 % Linolsäure im Extrakt. Die anderen Fettsäuren lagen nur in geringen Mengen vor (Palmitinsäure 7 %, α -Linolen-, Öl-, Stearinsäure < 1%). Eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Linolsäure und den Hemmeigenschaften des Extraktes machte deutlich, dass Linolsäure hauptsächlich für die Wirkung des Extraktes gegenüber der PGHS-2 verantwortlich war. Die Wirkung auf das konstitutive Isoenzym wurde zusätzlich von weiteren Bestandteilen des Extraktes beeinflusst. Dafür kamen beispielsweise der große Anteil an Phytosterolen wie α -Spinasterol, Campesterol und $\Delta 7$ -Stigmastenol in Frage. Somit konnte im Fall von *Platycodi radix* die *in vitro* PGHS-1/-2 Hemmeigenschaften des Extraktes im wesentlichen auf den Gehalt an Linolsäure zurückgeführt werden.

Ungesättigte Fettsäuren und insbesondere Linolsäure sind in zahlreichen Arzneidrogen angereichert. Bei der Testung auf eine präferentielle *in vitro* Hemmwirkung der PGHS-2 muss deshalb auch im High-Throughput-Screening auf das Vorkommen von Fettsäuren

geachtet werden, da sonst „falsch positive“ Werte erhalten werden, die zur wiederholten Isolierung dieser Fettsäuren führen.

Als zweite Droge, die ein interessantes Wirkprofil im Screening der Dichlormethanextrakte gezeigt hatte, wurde für weitere phytochemische Untersuchungen *Chaenomeles fructus* ausgewählt. Die getrockneten Früchte von *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai (Rosaceae) werden in der traditionellen chinesischen Medizin als Antirheumatikum, Spasmolytikum und Stomachikum eingesetzt. Der Dichlormethanextrakt hatte stark inhibitorische Eigenschaften auf beide Prostaglandinsynthase Isoenzyme gezeigt ($IC_{50} \text{ PGHS-1} = 5,1 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50} \text{ PGHS-2} = 2,3 \mu\text{g/ml}$) und die PGHS-2 wurde 2,2-mal besser als die PGHS-1 gehemmt. Die hemmenden Eigenschaften und die leichte Präferenz wurden nach Fraktionierung in den hydrophilen Fraktionen wiedergefunden. Die lipophilen Fraktionen zeigten keine Beeinflussung der PGHS-Isoenzyme. Sie enthielten großen Menge an langkettigen Alkoholen und einen großen Phytosterolanteil mit β -Sitosterol und Campesterol. Hauptinhaltsstoffe der aktiven Fraktionen waren pentazyklische Triterpensäuren. Acht unterschiedliche Säuren wurden isoliert und identifiziert. Oleanolsäure dominierte mengenmäßig. In geringer Konzentration lagen Pomol-, Maslin-, Tormentol-, Euscaphis- und Pirolonsäure vor. Keine der hydrophilen Triterpensäuren war bisher für die Gattung *Chaenomeles* beschrieben worden. Zwei acetylierte Triterpensäuren, 3β -O-Acetylursol- und 3β -O-Acetylpomolsäure, wurden ebenso zum ersten Mal aus *Chaenomeles speciosa* isoliert und identifiziert. Die PGHS-1/-2 hemmenden Eigenschaften dieser triterpenoiden Verbindungen wurden charakterisiert und verglichen. Oleanolsäure zeigte nur geringe inhibitorische Effekte ($IC_{50} > 200 \mu\text{M}$), die zudem mehr auf die PGHS-1 gerichtet waren. Im Vergleich dazu zeigte Pomolsäure ein deutlich besseres inhibitorisches Potential ($IC_{50} \text{ PGHS-1} = 68 \mu\text{M}$; $IC_{50} \text{ PGHS-2} = 36 \mu\text{M}$). Sie wirkte stärker auf die PGHS-2 als auf die PGHS-1 (Ratio PGHS-1/PGHS-2 = 1,9). 3β -O-Acetylursolsäure zeigte ebenfalls eine gute Hemmwirkung ($IC_{50} < 40 \mu\text{M}$), jedoch lag ihre Präferenz bei der PGHS-1. 3β -O-Acetylpomolsäure mit etwas geringerer Hemmwirkung ($IC_{50} \text{ PGHS-1} = 165 \mu\text{M}$; $IC_{50} \text{ PGHS-2} = 90 \mu\text{M}$) wies wiederum eine bevorzugte Wirkung auf die PGHS-2 auf. Die Beobachtung, dass die 19α -Hydroxylgruppe eine bevorzugte Hemmung der PGHS-2 hervorrief, ließ sich auch innerhalb der Reihe der anderen isolierten Verbindungen bestätigen. Hierbei handelt es sich somit um ein wichtiges Strukturmerkmal zur präferentiellen PGHS-2 Hemmung. Eine zusätzlich eingeführte Hydroxylgruppe in Ring A an Position 2 verstärkte bei den 19α -Hydroxy-Triterpensäuren zusätzlich die Hemmstärke und die bevorzugte Hemmung der PGHS-2. Entsprechende Triterpensäuren könnten somit als Leitstrukturen für PGHS-2 Hemmstoffe in Frage kommen.

Keine einzelne Triterpensäure erreichte allerdings das Hemmpotential des Gesamtextraktes, so dass dessen Effekt offenbar durch ein Zusammenspiel aller Inhaltsstoffe zustande kommt. Da es bei Mischungen der hier beschriebenen Triterpensäuren zu einer starken Wirkungssteigerung kam, kann ein synergistischer Wirkmechanismus nicht ausgeschlossen werden.

Da pentazyklische Triterpensäuren auch auf eine Reihe anderer Targets wirken und u.a. ihr chemopräventives Potential bekannt ist, muss davon ausgegangen werden, dass sie einen Beitrag zur Wirksamkeit von Chaenomeles Extrakten leisten und somit bei einer Qualitätsprüfung zu berücksichtigen sind.

H Experimenteller Teil

1. Pharmakologische Untersuchungen

1.1. Herstellung der Mikrosomenpräparationen

1.1.1. Mikrosomengewinnung aus Schafsamenblasen

Die Mikrosomenfraktion aus Schafsamenblasen wurde nach abgewandelter Methode nach NUTGEREN et al. gewonnen (1973).

Dazu wurden Samenblasen von 3-5 frisch geschlachteten Jungböcken (Samenblasengröße ca. 2-3 x 3-5 cm) bindegewebefrei herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Sämtliche weiteren Arbeitsgänge erfolgten bei höchstens +4°C.

Die Samenblasen wurden geschnitten und in Phosphatpuffer (KH_2PO_4 0,1 M; EDTA 0,001 M; DDC (Natrium-Diethyldithiocarbamat Trihydrat, Fa. Fluka) 100 μM ; pH 7,4) im Verhältnis 1:3 Teile überführt. Anschließend wurde unter ständiger Kühlung ca. 5 min mit dem Ultraturrax (Fa. IKA) das Gewebe gut zerkleinert und 2 min ins Ultraschallbad gehalten, wobei sich grobe Gewebeteile absetzten.

Das Gemisch wurde durch Gaze filtriert, in Falconröhrchen gesammelt und mit 4000 U/min, bei 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 100 000 U/min bei 4°C 1h in der Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen und das Pellet im Verhältnis 1:1 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 (siehe oben) suspendiert. Diese Mikrosomenfraktion wurde in Portionen von 100-200 μl in Eppendorf-Caps abgefüllt, mit Stickstoff überschichtet und bei -80°C gefroren und gelagert.

Sie ist bei dieser Temperatur ca. 1 Jahr ohne und ca. 2 Jahre mit 20 % Aktivitätsverlust haltbar. Bei -20°C gelagerte Fraktionen sind ca. 2-3 Wochen verwendbar.

1.1.2. Mikrosomengewinnung aus Schafcotyledonen

Die Mikrosomenfraktion aus Schafcotyledonen wurde nach abgewandelter Methode von JOHNSON et al. isoliert (1995).

Die Cotyledonen wurden aus der noch warmen Nachgeburt von Schafen herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Sämtliche weiteren Aufarbeitungsschritte wurden bei höchstens +4°C durchgeführt.

Die Cotyledonen wurden noch gefroren geschnitten und in TRIS/HCl-Puffer pH 7,5 überführt.

TRIS/HCl-Puffer pH 7,5: 0,1M TRIS
0,25 M Mannitol (Fa. Fluka)
0,5 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Fa. Serva)
1,0 mM DDC (Natrium-Diethyldithiocarbamat, Fa. Fluka)
2,0 mM EDTA (Titriplex III p.A., Fa. Merck)
(PMSF-Stammlösung 0,1 M in Isopropanol)

Sie wurden mit dem Ultraturaxgerät fein zerkleinert und 2 min im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurde die dunkelrote püreeartige Masse durch doppelagiges Gaze filtriert und mit 10000 g bei 4°C 20 min zentrifugiert. Der Überstand (Fraktion 2) wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Nach Resuspension des Pellets (Fraktion 1) wurde ein weiteres Mal mit 10000 g; 4 °C; 20 min (Fraktion 3) zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden 70 min mit 100000 g bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (Fraktion 4) wurde abgesaugt. Das Pellet, das die Mikrosomen enthielt, wurde in Puffer TRIS/HCl-Puffer pH 8,0 zu gleichen Teilen resuspendiert unter Stickstoffbegasung zu je 300 µl in Caps abgefüllt.

TRIS/HCl-Puffer pH 8,0: 50 mM TRIS
2 mM EDTA
0,5 mM PMSF
1 mM DDC

Die Mikrosomen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<u>Ausbeuten:</u>	Cotyledonen	50 g
	Zellbruchstücke	2 g (Fraktion 1)
	Mikrosomen	5 g (ca. 10 %)

1.1.3. Isolierung von Zellkernen aus Schafcotyledonen

Alle Aufarbeitungsschritte erfolgten bei höchstens +4°C. Die bei -80°C gefrorenen Cotyledonen wurden mit einem scharfen Skalpell geschnitten, möglichst viele blutige Bestandteile entfernt (Gefäße, gefrorenes Blut) und in TRIS/HCl-Puffer pH 7,4 überführt. Mit dem Ultraturaxgerät wurden sie fein püriert und durch Gaze filtriert. Das Filtrat wurde mit 500 U/min bei 4°C 10 min zentrifugiert (Rst 500). Der Überstand wurde 20 min bei 4°C mit 4700 U/min nochmals zentrifugiert. Es wurden Proben von Überstand und Rückstand gezogen (Üst 4700; Rst 4700).

TRIS/HCl-Puffer pH 7,4: 50 mM TRIS
 0,3 M Saccharose
 1 mM PMSF
 1 mM DDC
 2 mM EDTA

Von allen Fraktionen wurde die Proteinmenge bestimmt.

1.2. Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode

Für alle Fraktionen aus der Isolierung in 1.1.2 und 1.1.3 wurde der Proteingehalt mit der Methode nach Biuret bestimmt. (Praktikumsvorschrift der Biochemie, Prof. Weiss, Universität Düsseldorf)

Prinzip: Die Proteine werden mit Trichloressigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. Die denaturierten Proteine werden in Biuret-Reagenz (siehe unten) gelöst. Mit den Stickstoffatomen der Peptidbindungen bildet Cu^+ den purpurfarbenen Biuret-Komplex, der bei 546 nm kolorimetrisch vermessen wird. Die Lösung ist durch Lipide getrübt. Der Anteil der Extinktion, die auf der Trübung beruht, kann durch Entfärbung mit CN^- bestimmt werden und damit die Extinktion der Probe korrigiert werden.

Durchführung:

Biuret-Reagenz: in folgender Reihenfolge wurde eingewogen

0,5 % K-Na-Tartrat
0,3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,5% KJ

Die Reagenzien wurden in zweifach destilliertem Wasser gelöst und mit 10 N NaOH auf 0,2 N NaOH eingestellt. Die Lösung musste unter Lichtschutz gelagert werden.

Eichgerade: Die Eichgerade wurde mit 1% Stammlösung von BSA (**bovines Serumalbumin**) erstellt. Dazu wurden 0 µl (Nullwert), 10 µl, 20 µl, 50 µl und 100 µl in Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung erstellt.

Proben: Jeweils 10 µl und 30 µl der Fraktionen wurden in Eppendorf-Caps pipettiert.

In alle Gefäße wurde 1 ml 6% Trichloressigsäure gegeben, kurz aufgewirbelt und 20 s mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und Lösungsmittelreste wurden möglichst vollständig durch Ausklopfen entfernt. In jedes Gefäß wurde 1 ml Biuret-Reagenz gegeben. Der Proteinniederschlag wurde gelöst und anschließend 30 min geschüttelt. Danach wurde nochmals 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen Wasser in Halbmikro-Küvetten vermessen.

Anschließend wurde er mit 10 % KCN-Lösung entfärbt und nochmals vermessen.

Die Extinktion errechnete sich nach folgender Formel:

$$\Delta E = E_{546} (\text{Probe}) - E_{546} (\text{Probe} + \text{KCN}) - [E_{546} (\text{Nullwert}) - E_{546} (\text{Nullwert} + \text{KCN})]$$

Gleichung H.1: Berechnung der Extinktion einer Probe (Proteinbestimmung nach Biuret)

1.3. Elektrophoretische Untersuchungen zur Identifizierung von PGHS-1 und PGHS-2

Die Fraktionen aus Absatz 1.1.2 und 1.1.3 wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf ihren Gehalt an PGHS-1 und PGHS-2 mit Hilfe spezifischer Antikörper geprüft.*

SDS-Elektrophorese:

a) *Vorbereitung der Gele:*

Zwischen zwei saubere, fettfreie und trockene Glasplatten wurde das Trenngel blasenfrei gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Sammelgel darübergeschichtet und mit einem Kamm Taschen für die Proben gestanzt. Vor dem Auftragen der Proben wurde der Kamm vorsichtig entnommen und die Taschen mit Isopropanol und Wasser gewaschen.

* Diese Arbeiten wurden im Arbeitskreis Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Degen am Institut für Arbeitsphysiologie, Universität Dortmund, durchgeführt.

Zusammensetzung der Gele:

Trenngel		Sammelgel	
13 ml	Rotiphoresegel® 40	4,8 ml	Rotiphoresegel® 40
36 ml	0,75 M TRIS / HCl pH 8,8	15 ml	0,25 M TRIS / HCl pH 6,8
21,2 ml	H ₂ O bidest.	9 ml	H ₂ O bidest.
10 min entgasen		10 min entgasen	
360 µl	20 %iges SDS Sodiumdodecylsulfat	150 µl	20 %iges SDS
300 µl	10 % APS Ammoniumperoxidisulfat	200 µl	10 % APS
60 µl	TEMED NNN'N'-Tetramethylethyldiamin	40 µl	TEMED

b) *Vorbereitung der Proben:*

Ausgehend vom Proteingehalt wurde eine Verdünnung hergestellt, die erlaubte 30 µg Protein in weniger als 10 µl aufzutragen.

Die Proben wurden zuerst auf die 5-fachen Auftragsmenge mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt und anschließend mit Probenpuffer im Verhältnis 1:5 weiter verdünnt.

Probenpuffer:		Laufpuffer (SDS-Elektrophoresepuffer):	
pH 7,0; für je 100 ml	Einwaage [g]	pH 7,0; für je 1000 ml	Einwaage [g]
NaH ₂ PO ₄	0,340	TRIS	2,24
Na ₂ HPO ₄	1,020	Glycin	14,41
SDS	1,000	SDS	1,00
Mercaptoethanol	1,00		
Bromphenolblau	0,015		
Harnstoff	36,00		

Die Proben wurden 10 min im Wasserbad gekocht, auf Eis abgekühlt und anschließend wurde jeweils eine Menge, die 30 µg Protein entsprach, in die vorgesehenen mit Laufpuffer gewaschenen Taschen mit einer Hamiltonspritze eingebracht.

c) *Elektrophorese nach LÄMMLI* (LÄMMLI, U.K., 1970):

Nach diskontinuierlichem Verfahren: 30 min 120 V; dann 200 V bis der Marker den Endpunkt erreicht hat.

d) *Westernblot*: Transfer nach TOWBIN, (TOWBIN, J., 1979):

Durch Anlegen einer Spannung (60 V; ca. 150 mA; Eiskühlung 4°C; 16h) wanderten die Proteine vom Elektrophoresegel auf eine NC-Membran (Polyvinylidendifluorid = Immobilon®, Millipore).

Transferpuffer nach TOWBIN; pH 8,3 (8,1-8,4):

25 mM	TRIS
192 mM	Glycin
20 %	Methanol

e) *Färbung des Gels mit Silbernitrat*:

Das Gel wurde 1 h in Fixierlösung geschüttelt, zweimal 20 min mit verdünntem Methanol gewaschen (50 % und 30 %), genau 1 min in Imprägnierlösung geschwenkt und dreimal mit bidestilliertem Wasser 1 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel ca. 30 min in Silbernitratlösung inkubiert und wiederum zweimal 30 s mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Silbernitrat wurde mit Reduktionslösung reduziert bis eine schwarz-braune Färbung eintrat. Nach nochmaligem Schütteln in Fixierlösung und Waschen mit Methanol (siehe oben) wurde es im Geltrockner 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

Fixierlösung

Methanol	50 %
Eisessig	12 %

Silbernitratlösung

Silbernitrat	150 ml $\hat{=}$ 12 mM
Formalin (37 %)	100 μ l $\hat{=}$ 0,025% $\hat{=}$ 0,008 M

Imprägnierlösung

Wasser	150 ml
Formalin (37 %)	100 μ l $\hat{=}$ 0,025 %
NaS ₂ O ₃ (5M)	75 μ l $\hat{=}$ 2,5 mM

Reduktionslösung

NaCO ₃ (0,5 M)	150 ml $\hat{=}$ 0,5 M
Formalin (37 %)	75 μ l $\hat{=}$ 0,006 M
NaS ₂ O ₃ (5 M)	1,5 μ l $\hat{=}$ 0,05 mM

f) *ELISA zur Detektion von PGHS-1 und PGHS-2:*

Die Membran wurde mit den Western-Blot Kits der Fa. Perkin-Elmer Applied Biosystems Western-Light Plus™ und dem Chemiluminescent Detection System (Tropix) (Protocol for detection of biotin-labeled antibodies or proteins with CSPD® chemiluminescent substrat) behandelt und entwickelt.

Verwendete Antikörper:

PGHS-1-Antikörper: gegen gereinigtes Enzym aus Schafsamenblasen (Herstellung im Arbeitskreis von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. G.H. Degen am Institut für Arbeitsphysiologie in Dortmund)

PGHS-2-Antikörper: erhalten von Prof. D.L. DeWitt, Department of Biochemistry, MSU, East Lansing, Michigan

1.4. Herstellung der Reagenzien für die Enzymassays**1.4.1. Pufferherstellung**

TRIS ultrapure (Fa. USB); TWEEN 20 (Fa. Cayman Chemicals), DDC (Fa. Fluka)

Enzympuffer pH 8,0	100 ml	Assaypuffer pH 8,0	250 ml
TRIS	0,969 g (80 mM)	TRIS	3,05 g (0,1 M)
TWEEN 20	100 mg (0,1 %)		
DDC	6,76 mg (300 µM)		

Die Substanzen wurden in Wasser zu Injektionszwecken (Apotheke der Universitätskliniken, Düsseldorf) gelöst und auf ca. 90 % des Volumens aufgefüllt. Dann wurde mit der geeichten Glaselektrode (pH-Meter PH 526 Multical®, Fa. WTW) der pH Wert mit 1 N Salzsäure (Fa. Bernd Kraft GmbH) auf pH 8,0 eingestellt, und der Puffer auf das Endvolumen mit Wasser zu Injektionszwecken aufgefüllt. Enzympuffer wurde immer frisch zubereitet, Assaypuffer konnte bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt für mehrere Tests verwendet werden.

1.4.2. Enzymverdünnung

Die PGHS Reinenzyme - ovine PGHS-1 und PGHS-2 (Fa. Cayman Chemicals) - wurden nach Berechnung über ihre „activity concentration“ auf die notwendige Menge mit gekühltem Enzympuffer verdünnt. Dabei wurde das Enzym auf Trockeneis gelagert und alle Verdünnungsschritte im Eisbad (höchstens 4°C) durchgeführt.

Die Portionen wurden so abgefasst, dass eine Portion jeweils für einen Test ausreichte. Es wurden nie mehr Portionen hergestellt, als innerhalb von 12 Wochen verbraucht werden konnten.

Die Verdünnung wurde so gewählt, dass 1 μl die entsprechende Anzahl Units für 1 Probe enthielt.

Für PGHS-Screening-Assay:

0,2 U/Probe und μl

für 40 Proben: 9 U in 45 μl (5 μl Überschuss)

für **PGHS-2** (Lieferung von Okt. 97 mit „activity concentration“ von 12200 U/ml):

14,75 μl Enzymkonzentrat und 885,25 μl Enzympuffer für 20 Caps (= 20 Assays) oder 0,74 μl Enzymkonzentrat und 44,26 μl Enzympuffer für einen Test.

Diese Verdünnungen waren ca. 6 Monate ohne Aktivitätsverlust bei -80°C haltbar. Bei jeder neuen Verdünnung wurde ein Aktivitätsverlust von 5 % dazugerechnet.

für **PGHS-1** (Lieferung: Aug. 97 mit „activity concentration“ von 21700 U/ml):

2,3 μl Enzymkonzentrat und 47,7 μl Enzympuffer für 1 Cap mit 50 U; 1 U/ μl .

Cap mit 1 U/ μl : weitere Verdünnung mit zusätzlich 200 μl Enzympuffer und daraus 5 Caps mit 45 μl a 9 U; 0,2 U/ μl für 5 Tests.

Bei jeder neuen Verdünnung zu 50 U Caps wurde ein Aktivitätsverlust von 8 % eingerechnet; bei jeder Verdünnung der 50 U Caps zu 9 U Caps nochmals ein Aktivitätsverlust von 10 %.

Die Caps mit 1 U/ μl waren ca. 6 Monate ohne Aktivitätsverlust bei -80°C lagerbar. Die Caps mit 0,2 U/ μl waren ca. 3 Monate ohne Aktivitätsverlust bei -80°C haltbar.

1.4.3. Herstellung und Einstellung der Konzentration der Hematinlösung

Bereitung der Stammlösung:

3,168 mg Hematin (from bovine blood, Fa. Sigma) wurden in 500 μl 0,01 N NaOH (Fa. Bernd Kraft GmbH) gelöst (Ultraschall) und anschließend mit 4,5 ml Assaypuffer (0,1 M TRIS/HCl pH 8,0) verdünnt. Der Gehalt der Stammlösung wurde mit Hilfe der Pyridin-Hemochromogen-Methode bestimmt.

Bereitung der Hematinverdünnung:

Die Stammlösung wurde auf einen Gehalt von 0,06335 mg/ml weiter mit Assaypuffer verdünnt. Diese Lösung war direkt im Test einsetzbar oder wurde in Portionen von 1 ml geteilt und bei -20°C gelagert. Sie verlor mindestens 1 Jahr nicht ihre Aktivität als Cofaktor.

Bestimmung des Gehaltes mit der Pyridin-Hemochromogen-Methode (YAMAMOTO, 1982):

20 μl der Stammlösung wurden mit 0,1 N NaOH (Fa. Bernd Kraft GmbH) zu 2 ml verdünnt. 1 mg Natriumdithionit wurde zugefügt und mit einem Spatel vermischt. Anschließend wurden 0,5 ml Pyridin zugegeben. Es entstand ein rot gefärbter Komplex mit Hematin, der bei $\lambda = 557 \text{ nm}$ vermessen wurde. Der Gehalt wurde berechnet mit $\Delta\epsilon_{557-540} = 34,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.4.4. Bereitung der Lösungen anderer CofaktorenAdrenalin-D-hydrogentartratlösung 18mM (PGHS-Screening-Assays)

24 mg Adrenalinhydrogentartrat (Fa. Fluka) wurden in 1 ml Assaypuffer durch kräftiges Schwenken gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 50 μl zur Probe zupipettiert. Wurden 40 μl zugegeben, mussten 28,8 mg/ml gelöst werden. Die Substanz wurde dicht verschlossen bei 4°C gelagert. Die Lösung musste kurz vor dem Test jeweils frisch bereitet werden. Sie durfte nicht mehr verwendet werden, wenn sich eine leichte Rosafärbung zeigte.

EDTA

2 mg Titriplex III p.a. (Fa. Merck) wurden in 5 ml Assaypuffer gelöst. Davon wurden 10 μl im PGHS-2 Screeningtest eingesetzt. Die Lösung wurde frisch für jeden Test zubereitet.

GSH

15 mg reduziertes Glutathion (Fa. Merck) wurden in 5 ml Assaypuffer gelöst. Davon wurden 20 μl (1mM) zum COX-1 Test zugegeben. Die Lösung wurde frisch für jeden Test zubereitet.

D,L-Tryptophan (Fa. Merck), Phenol u.s.w. wurden entsprechend der molaren Einsatzmenge in Assaypuffer nach Gleichung H.1 gelöst.

Wurden zu Validierungszwecken, Optimierungszwecken u.s.w. andere Konzentrationen benötigt, wurden die Einwaagen für den Test nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Einwaage in mg/ml} = \frac{x * \text{MG}}{5 * y \mu\text{l}}$$

X: Testmenge in mM

MG: Molekulargewicht der Substanz

y: Volumen der zugegebenen Lösung der Substanz

Gleichung H.1: Berechnung der Einwaage für die Lösung einer Substanz zum Einsatz im Test in molarer Konzentration

1.4.5. Behandlung des Substrates Arachidonsäure

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Arachidonsäure (50 $\mu\text{Ci/ml}$) (Fa. Amersham) wurde mit Ethanol p.A. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Diese Lösung hatte die Konzentration von 0,09 mM, was im Test 4,5 μM Endkonzentration entsprach. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Nicht radioaktiv markierte Arachidonsäure wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in Ethanol von Fa. Cayman Chemicals bezogen. Sie wurde bei -80°C gelagert. Daraus wurde eine 1 mM Stammlösung hergestellt, die bei -20°C gelagert wurde. Für den Test wurde diese Lösung 1:10 mit Ethanol p.a. (0,1 mM) verdünnt. 10 μl davon wurden zu jedem Ansatz zugegeben (5 μM Endkonzentration).

1.4.6. Probenvorbereitung

Alle Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, in Ethanol p.A. (EtOH p.A.) gelöst. Die Einwaage erfolgte auf 0,01 mg genau. Da das Gesamtvolumen des Testansatzes 200 μl betrug und von jeder Probe 10 μl einpipettiert wurden, galt:

1 mg / ml Einwaage in Ethanol \approx 50 μg / ml Testansatz vom Extrakt/ Fraktion/ Substanz

1.4.7. Herkunft der Positivkontrollen und synthetischer Hemmstoffe

In jedem Test wurden parallel zu den Proben Positivkontrollen eingesetzt.

Tabelle H.1: Eingesetzte Positivkontrollen im PGHS-1/-2 Screening-Assay

Substanz	Herkunft	eingesetzte Menge		IC ₅₀ -Werte	
		PGHS-1	PGHS-2	PGHS-1	PGHS-2
Indometacin	Fa. Sigma	1,25 μM	1,25 μM	0,8 μM	0,8 μM
NS 398	Cayman Chemicals	50 μM	5 μM	51 μM	2,6 μM
Nimesulid	Cayman Chemicals	50 μM	50 μM	246 μM	36 μM

Weiterhin wurden folgende synthetische Hemmstoffe getestet:

Meloxicam (Fa. Boehringer Ingelheim), Melocicam-Megluminat (Fa. Boehringer Ingelheim), Valerylsalicylsäure (Fa. Cayman Chemicals), Acetylsalicylsäure (Fa. Merck), Rofecoxib aus Vioxx[®] (Fa. MSD), Phenethylferulat (isoliert aus *Angelica sinensis* von Zschocke S., 1998), Phenethylcaffeat (Fa. Cayman Chemicals).

1.5. Durchführung der PGHS-1 /PGHS-2 Screening-Assays

Die Entwicklung der Screening-Assays erfolgte in drei Phasen.

1. Phase: Entwicklung eines PGHS-2 Test mit radioaktiver Arachidonsäure.
2. Phase: Umstellung auf EIA-Detektion.
3. Phase: Optimierung (Vereinheitlichung der Pipettierschemata).

Die *n*-Hexanextrakte aus dem pharmakologischen Screening (Kapitel D) wurden nach den Testbedingungen der 2. Phase getestet (Kapitel B.2.5.), alle weiteren Extrakte und Substanzen unter folgendem Bedingungen:

Tabelle H.1: Optimierte Testbedingungen für die PGHS-1 und PGHS-2 Screening-Assays

		PGHS-1	PGHS-2
TRIS/HCl pH 8,0	0,1 mM	20 µl	10 µl
Na EDTA	50 µM		10 µl
Adrenalinhydrogentartrat	18 mM	50 µl	50 µl
EtOH Substanz		10 µl	10 µl
Enzym auftauen, temperieren, zentrifugieren, verdünnen in 100 µl Assaypuffer je Probe; 3 min; RT			
PGHS-1/-2 in Puffer	0,2 U	100 µl	100 µl
Hematin	5 µM	10 µl	10 µl
Vorinkubation 5 min , RT			
Arachidonsäure	5 µM	10 µl	10 µl
Inkubation 20 min , 37°C am Schüttelwasserbad			
Ameisensäure	10 %	10 µl	10 µl

Die Lösungen wurden mit temperiertem Assaypuffer wie oben beschrieben bereitet, eine Hematinportion wurde für den Test aufgetaut. Das Enzym wurde bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Wie oben angegeben wurden Puffer und Cofaktoren vorgelegt. Dazu wurde entweder Probe, Kontrolle (EtOH p.A.) oder Positivkontrolle (Indometacin 1,25 µM, Nimesulid 50 µM oder NS 398 50 bzw. 5 µM) dazu pipettiert. Dann wurde das Enzym aufgetaut und zentrifugiert, um die notwendige Menge für einen Test aus dem Cap entnehmen zu können. Die verbleibende Zeit bis 3 min vorbei waren, wurde bei RT abgewartet, bevor das Enzym in 100 µl Assaypuffer verdünnt wurde. Jeweils 100 µl Enzymverdünnung wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Als letzter Bestandteil wurde Hematin zugegeben, bevor die

Mischung 5 min vorinkubiert wurde. Zum Reaktionsstart wurden 5 μM Arachidonsäure in Ethanol p.A. zugefügt und 20 min bei 37 °C am Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 μl Ameisensäure 10 % gestoppt.

Tabelle H.2: Notwendige Arbeitsmittel für den PGHS-1 und PGHS-2 Screening-Assay

Gerät /Einmalartikel	Bezugsquelle
Schüttelwasserbad Julabo.SW-21 C	Fa. Julabo
Tischzentrifuge Centrifuge 5414	Fa. Eppendorf
Dispenser Multipette 4780	Fa. Eppendorf
Variepetten 4810 0,5-10 μl ; 10-100 μl ; 200-1000 μl	Fa. Eppendorf
Varipettenspitzen 10 μl ; 100 μl ; 1000 μl	Fa. Roth
Micro-Platten, F-Form; steril mit Abdeckplatte (Artnr. 655x180)	Fa. Greiner Labortechnik
Reaktionsgefäße (PP) 1,5 ml	Fa. Roth
Reaktionsgefäße (PP) 0,2 ml	Fa. Roth
Mehrkanalpipetten	Fa. Brandt
Combitips 0,5 ml; 2,5 ml; 5 ml	Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen 100 μl	Fa. Brandt
Kulturflaschen	Fa. Schott

Schon während des Assays wurden die Lösungen des EIA temperiert und die Puffer vorbereitet.

Um die Proben detektieren zu können, wurden sie mit den Mehrkanalpipetten auf die notwendige PGE_2 -Konzentration verdünnt, um anschließend in die Detektionsplatte überpipettiert zu werden. Zur Detektion siehe Abschnitt 1.7..

1.6. Bestimmung der Arachidonsäuremetabolite

Die Umsetzungsprodukte aus den pharmakologischen Untersuchungen wurden nach Auftrennung über HPLC detektiert. Bei Verwendung von radiokativer Arachidonsäure wurde ein Radioaktivitätsmonitor verwendet. Kalte Arachidonsäure wurde UV- und massenspektrometrisch mit APCI-Interface nach negativer Ionisierung (Negativmodus) erfasst. Bei dieser Methode findet ein Protonentransfer vom ionisierten Lösungsmittel zur gelösten Probe statt. Die Ionisierung des Fließmittels erfolgt durch Spitzenentladung („corona discharge“) bei Atmosphärendruck.

HPLC1:	Liquid Chromatograph HP 1050 mit Autosampler 1050, beheizbarer Säulenraum, Vakuumentgaser, PC-gesteuert über HP Chemstation-Software (Hewlett Packard).
<i>Detektoren</i>	<p>a) Photodiodenarray- Detektor HP 1040 M von Hewlett Packard (siehe Abschnitt 2.3.2)</p> <p>b) Radioaktivitätsmonitor LB 507 B, EG & G. Berthold (Cyclooxygenase-Test)</p> <p>c) Massenspektrometer Finnigan MAT SSQ 7000 mit Digital DEC 3000 Data-Ration (LC-MS1) APCI Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</p>
<i>Säule</i>	LiChroCART [®] 125-4 mit LiChroSpher [®] 100 RP-18 (5 µm) mit Vorsäule LiChroCART [®] 4-4 mit LiChroSpher [®] 100 RP-18 (5 µm), beide Merck (Standardsäule für Analytik und pharmakologische Tests)
<i>Säulentemperatur</i>	40°C
<i>Flussrate</i>	1 ml/min
<i>Mobile Phasen</i>	<p>C: Aqua ad injectabilia (Delta Pharma) mit 0,1 % (V/V) 10N <i>ortho</i>-Phosphorsäure p.a. (Fluka)</p> <p>D: Acetonitril für HPLC (T.J. Baker) mit 0,1 % (V/V) 10N <i>ortho</i>-Phosphorsäure p.a. (Fluka)</p> <p>E: Aqua ad injectabilia (Delta Pharma) mit 0,1 % (V/V) 98-100 % Ameisensäure p.a. (Riedel-deHaen)</p> <p>F: Acetonitril für HPLC (T.J. Baker) mit 0,1 % (V/V) 98-100 % Ameisensäure p.a. (Riedel-deHaen)</p>
<i>Trennsystem</i>	<p>COX Fließmittel C,D; 7 min 36 % D isokratisch; 36 – 80 % D linear in 8 min; 5 min 80 % D isokratisch; Injektionsvolumen 60 µl.</p> <p>COXDAD Fließmittel C,D bzw. E,F (für MS-Kopplung); 7 min 36 % D bzw. F isokratisch; 36 – 80 % D bzw. F linear in 8 min; 5 min 80 % D bzw. F; isokratisch Injektionsvolumen 60 µl.</p>

Probenvorbereitung Für die Detektion mit Detektor *b)*: die Proben wurden aus ihren Reaktionsgefäßen ohne Verlust in HPLC-Probengläschen überführt und konnten direkt injiziert werden. Die HPLC-Analyse erfolgte mit Methode **COX**.

Für die Detektion mit Detektor *a)* und *c)*: Mehrere gleiche Proben wurden vereint und mit wenigen ml Ethylacetat (Fa. ACROS) mehrmals ausgeschüttelt (Whirleymixer). Die Überstände wurden mit einer Pipette abgenommen, vereint und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 200 µl Ethanol p.a. gelöst und davon wurden 60 µl injiziert.

Die Referenzsubstanzen (Arachidonsäure, Prostaglandinmischung, HETE-Mischung, Cayman Chemicals, siehe unten) wurden mit Ethanol p.a. 1:20 verdünnt und 60 µl injiziert. Die HPLC-Analyse erfolgte nach Methode **COXDAD**.

Tabelle H.1: Retentionszeiten und LC-MS-Daten der Referenzsubstanzen (APCI-Interface, negative Ionisierung, 60 V)

	Retentionszeit [min] Methode COXDAD	Molekulargewicht	EI-MS: charakteristische Spaltprodukte (60 V)
Arachidonsäure	15,06	304,5	303, 607 nach LC
PGE ₂	5,2	352,5	351
PGD ₂	6,1	352,5	351
PGA ₂	9,4	334,5	333, 315
PGB ₂	9,4	334,5	333, 315
PGJ ₂	9,4	334,5	333,315
5-HETE	11,5	320,5	319, 301, 203
8-HETE	11,3	320,5	319, 301,163, 127
11-HETE	11,2	320,5	319, 301, 167
12-HETE	11,3	320,5	319, 301, 179
15-HETE	11,1	320,5	319, 301, 219
PGF _{2α}	4,7	354,5	-
HHT	10,6	280,4	279, 208

Prostaglandinderivate und Hydroxyeicosatetraensäuren als Refernzsubstanzen

- Arachidonsäure: Fa. Cayman Chemicals Nr. 90010, ethanolische Lösung 100 mg/ml, Reinheit $\geq 98\%$
- Prostaglandine: UV-active Prostaglandin HPLC Mixture, Fa. Cayman Chemicals; Nr. 10000, Lösung in Methylacetat mit jeweils 100 μg PGA_2 , PGB_2 , PGD_2 , PGE_2 , PGJ_2 ; Reinheit jeweils $\geq 98\%$
- HETE: (\pm)-HETE HPLC-Mixture, Fa. Cayman Chemicals; Nr. 34002, ethanolische Lösung mit jeweils 5 μg (\pm)5-HETE, (\pm)8-HETE, (\pm)11-HETE, (\pm)12-HETE, (\pm)15-HETE, Reinheit jeweils $\geq 98\%$

Quantitative Auswertung der Ergebnisse:

Zur Errechnung der Hemmwerte aus den HPLC-Chromatogrammen wurden jeweils nur die Flächen der Peaks von PGE_2 und Arachidonsäure integriert. Die ermittelten Hemmwerte waren Relativwerte, die aus dem Flächenverhältnis der Peaks von PGE_2 und Arachidonsäure berechnet wurden. Die für die Probe bestimmte Fläche von PGE_2 wurde auf die mittlere PGE_2 -Fläche von gleichbehandelten Kontrollen (= 100 %) bezogen und die so errechnete, durch den Inhibitor bewirkte Hemmung der Prostaglandinsynthese als prozentuale Hemmung (% Inh.) angegeben:

Gleichung H.1: Berechnung der prozentualen Hemmung

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{Fläche}_{\text{PGE}_2} (\text{Probe/Inhibitor}) * 100}{\text{Fläche}_{\text{PGE}_2} (\text{Kontrolle/ Lösungsmittel})}$$

1.7. Detektion von PGE_2 mit EIA (Enzym-Immuno-Assay)Verwendete EIA-Kits:

- A) Prostaglandin E_2 EIA (Enzymimmunoassay) Kit Monoclonal, Fa. Cayman Chemicals, Best.Nr. 514010, Detektionslimit 30 pg/ml PGE_2 , Lagerung bei -20°C
- B) Prostaglandin E_2 Colorimetric competitive ELISA, Fa. R&D Systems, Best.Nr. DE0100, Range 39–5000 pg/ml PGE_2 , Lagerung bei 4°C
- C) STAT-Prostaglandin E_2 EIA (Enzymimmunoassay), Fa. Cayman Chemicals, Best.Nr. 514131, Detektionslimit 95 pg/ml PGE_2 , Lagerung bei 4°C

Die Kits wurden nach Firmenbeschreibung angewandt und der Assay nach Gebrauchsanweisung durchgeführt.

Die Proben aus dem PGHS-1 und -2 Screening-Assay wurden so verdünnt, dass die Kontrollwerte zwischen 20-30 % B/Bo lagen.

Tabelle H.1: Probenverdünnung, Probenmenge, Inkubations- und Detektionszeit der verwendeten EIA-Kits

	Proben- verdünnung	Eingesetzte Probenmenge	Inkubationszeit	Detektionszeit
A	1 : 100	50 µl	18 h, 4 °C	60 min; am Horizontal- schüttler (Fa. IKA)
B	1 : 13	100 µl	2 h, RT; am Horizontal- schüttler (Fa. IKA)	45 min
C	1 : 14	50 µl	1 h, RT, am Horizontal- schüttler (Fa. IKA)	90 min

Die EIA-Platte wurde mit dem ELISA-Reader Rainbow (Fa. TECAN) vermessen und mit dem Programm EASYWIN-Fitting Version 4.0a (Fa. TECAN) ausgewertet. Als Vorgabe wurde das Plattendesign eingegeben, und die in Gleichung H.1 angegebenen Formeln zur Berechnung der Konzentrationen.

$$X - BI = Y$$

$$(Y - NSB) / (Bo - NSB) = Z$$

$$Z * 100 = Z[\%]$$

X: Messwert

Y,Z: Zwischenergebnisse

BI: Blindwert

NSB: unspezifische Bindungen

Bo: Maximale Bindung

Gleichung H.1: Berechnungen zur computergestützten Auswertung der PGE₂-Konzentration im EIA

Z[%] ist der berechnete Wert, der zum Ablesen der PGE₂-Konzentration an der Eichkurve verwendet wurde.

Die Eichkurve wurde mit der Option „4-Parameter“ erstellt.

Die Proben wurden ohne Doppelbestimmung im Test bestimmt, jedoch in mindestens drei Tests geprüft und erst bei Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Mittelwert errechnet. Die Schwankungen innerhalb des Kits waren deutlich geringer als die innerhalb des Assays. Testergebnisse außerhalb des validen Bereichs mit höheren Werten als 80 % B/Bo wurden als maximale Hemmung im Test gewertet und lagen zwischen 80 und 90 %. Messwerte unterhalb 20 % B/Bo wurden nicht verwertet.

Zur Berechnung der Hemmung wurde analog Abschnitt 1.6 nach Gleichung H.1 vorgegangen.

Berechnung der InhibitorKonzentration bei halbmaximaler Hemmung (IC₅₀-Wert):

Um den IC₅₀-Wert einer Substanz zu ermitteln, wurde diese Substanz in mindestens drei Tests in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Aus den erhaltenen Mittelwerten für jede der Konzentrationen wurde der IC₅₀-Wert nach graphischer Darstellung mit logarithmischer Regression berechnet.

$$y = A + B \cdot \ln x \quad A = \frac{\sum y - B \cdot \sum x}{n} \quad B = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Gleichung H.2: Berechnung des IC₅₀-Wertes über logarithmische Regression (I)

$$IC_{50} = e^{\frac{50 - A}{B}}$$

Gleichung H.3: Berechnung des IC₅₀-Wertes über logarithmische Regression (II)

2. Phytochemische Untersuchungen

2.1. Herkunft des Drogenmaterials und der Referenzsubstanzen

2.1.1. Drogenmaterial zum pharmakologischen Screening

Die Drogenmuster zur Durchführung des pharmakologischen Screenings wurden von der TCM-Klinik in Kötzing im Bayrischen Wald zur Verfügung gestellt (Lieferung August 1997). Ihre Identität wurde mit Hilfe des chinesischen Arzneibuches, mit Drogenatlanten, durch DC-Analysen und HPLC-Screening überprüft und bestätigt. Rückstellmuster finden sich am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.1.2. Drogenmaterial zur Isolierung von Inhaltsstoffen

Eine größere Menge an getrockneten Wurzeln von *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. (Campanulaceae) stammten aus der TCM-Klinik in Kötzing (Tabelle H.1). Die Identität wurde - wie oben beschrieben - festgestellt und bestätigt.

Tabelle H.1: Herkunft der Drogenmuster von *Platycodi radix*

Bezeichnung	Herkunft	Lieferung
Drogenmuster A	TCM-Klinik Kötzing	August 1997
Drogenmuster B	TCM-Klinik Kötzing	Mai 1998

Eine größere Menge an getrockneten Früchten von *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai (Rosaceae) wurde uns von der TCM-Klinik in Kötzing zur Verfügung gestellt (Lieferung im Dezember 1998). Ihre Identität wurde anhand verschiedener chinesischer Drogenatlanten, nach Identitätsprüfung des Chinesischen Arzneibuches und mikroskopischer Analyse überprüft und bestätigt. Rückstellmuster befinden sich im Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Vergleichsdrogen waren ebenso Lieferungen der TCM-Klinik Kötzing sowie eine Probe aus einer Pekinger Apotheke vom April 1999 (siehe dazu Tabelle H.2)

Tabelle H.2 Herkunft der untersuchten *Chaenomeles*-Drogenmuster

Bezeichnung	Herkunft	Lieferdatum
Drogenmuster A	TCM-Klinik Kötzing	August 1997
Drogenmuster B98	TCM-Klinik Kötzing	November 1998
Drogenmuster B99	TCM-Klinik Kötzing	Dezember 1998
Drogenmuster C	Apotheke Peking	April 1999

2.1.3. Referenzsubstanzen

Eine Mischung aus verschiedenen Phytosterolen (u.a. Campesterol, β -Sitosterol, Δ^7 -Stigmastenol) war am Institut für Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität vorrätig. Ebenso stammten verschiedene Saponinvergleichsubstanzen (Saponin *RN*, DAB 1996: Pflanzenglykoside aus *Gypsophila*- Arten oder von *Quillaja saponaria* MOLINA) aus den Beständen des Institutes. Linolsäure, α -Linolensäure, Ölsäure, Myristinsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure wurden von der Fa. Sigma bezogen. Die Vergleichssubstanzen aus *Angelicae dahuricae radix* wurden von Sibylle Zschocke im Rahmen ihrer Dissertation isoliert. Platycodin D und Platycodin D3 wurde uns freundlicher Weise von Prof. Lee, E.B., Natural Products Research Institute, Seoul National University, Korea überlassen. Ihm sei an dieser Stelle herzlichst gedankt. Referenzen für Oleanolsäure stammten aus Beständen des Institutes oder wurden von Günther Lang im Rahmen seiner Dissertation isoliert.

2.2. Extraktionsverfahren

2.2.1. Soxhletextrakte für das pharmakologische Screening

Etwa 5 g Droge wurden in einer Gewürzmühle Typ A10 (Janke & Kunkel, IKA-Werk) fein pulverisiert. Dabei wurde speziell darauf geachtet, dass sich das Drogenmaterial nicht erwärmt. Das Pulver wurde sofort in eine Soxhlethülse (Fa. Macherey und Nagel) eingewogen, mit Zellstoff bedeckt und anschließend mit ca. 60 ml Lösungsmittel 2 Stunden extrahiert.

Bei sukzessiver Extraktion wurde als erstes Lösungsmittel *n*-Hexan verwendet. Nach dem Trocknen der Soxhlethülse und des darin enthaltenen Drogenrückstandes wurde ein weiteres Mal mit ca. 60 ml Dichlormethan extrahiert. Die folgenden Extraktionen mit Methanol und Wasser wurden analog der sukzessiven Dichlormethanextraktion durchgeführt.

Die so erhaltenen Extrakte wurden zur Trockene eingengt, gewogen und mit *n*-Hexan überschichtet. Alle Extrakte wurden bei 0-20 °C aufbewahrt, bis sie weiter bearbeitet wurden.

2.2.2. Soxhletextraktion für phytochemische Untersuchungen von *Platycodi radix* („Jiegeng“)

387 g getrocknete Droge *Platycodi radix* wurden in einer Drogenmühle fein gemahlen und in eine Soxhlethülse überführt. Sie wurde in einer 500 ml Soxhletapparatur erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert (Extraktionszeit ca. 30 h). Dabei wurde alle 6 h das Lösungsmittel erneuert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Ausbeute betrug 3,79 g (entspricht 0,98 % bezogen auf die getrocknete Droge). Der gelbe, streng riechende Extrakt wurde bis zur weiteren Bearbeitung mit *n*-Hexan überschichtet und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3. Soxhletextraktion für phytochemische Untersuchungen von *Chaenomelis fructus* („Mugua“)

925 g getrocknete Droge *Chaenomelis fructus* wurden in einer Drogenmühle fein gemahlen, in eine Soxhlethülse überführt und in einer 1 l Soxhletapparatur mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert (Extraktionszeit insgesamt ca. 62 h). Alle 9 h wurde der bereits gewonnene Extrakt abgenommen und die Soxhletierung mit frischem Extraktionsmittel fortgesetzt. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Auf diese Art konnten ca. 17,5 g (entspricht ca. 1,9 % bezogen auf die getrocknete Droge) grünlicher, klebriger Rohextrakt mit einem weißen in der Kälte ausfallenden Niederschlag, erhalten werden. Der Extrakt wurde bis zur weiteren Bearbeitung mit *n*-Hexan überschichtet bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4. Dekokte

Die nach chinesischer Pharmakopoe (Stöger, 1999) vorgeschriebene Menge der klein geschnittenen Droge wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit ca. 30 ml destilliertem Wasser versetzt, so dass der Wasserpegel ca. 2-5 cm über der Droge stand. Nach 30 min Einweichen bei Raumtemperatur wurde das Gemisch unter Rühren zweimal für 10-15 min aufgekocht. Anschließend wurde bei schwacher Hitze weitere 30 min abgedeckt weitergekocht. Der Auszug wurde abgekühlt und abdekantiert bzw. über Glaswolle filtriert, um ihn von Pflanzenteilen und Schwebstoffen zu befreien. Der fertige Dekokt wurde am Rotationsverdampfer möglichst zur Trockene eingengt, mit Ethanol überschichtet und bei -20°C gelagert, bevor er weiter bearbeitet wurde.

2.3. Chromatographische Arbeitsmethoden

2.3.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase: DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,2 mm; Fa. Merck (Art.-Nr.1.05554) (analytisch und präparativ)

DC-Glasplatten, 20 x 20 cm PK 5 Kieselgel, Schichtdicke 1000 µm; Fa. Whatman (Cat.-No. 4850-840) (präparativ)

Mobile Phasen: **FMC1:** Toluol: Ethylacetat: Eisessig 80 : 15 : 5

FMC2: Toluol: Ethylacetat: Eisessig 70 : 25 : 5

FMC3: Chloroform : Methanol 9 : 0,3 (präparative DC)

FMC4: Dichlormethan : Cyclohexan 6 : 4 (Identifizierung von A1)

FMP5: *n*-Hexan : Ethylacetat 6 : 4

FMS6: Chloroform : Methanol : Eisessig : Wasser 60 : 32 : 12 : 8 (Saponine)

Alle Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor Gebrauch durch zweifache Destillation gereinigt.

Probenvorbereitung: Die am Rotationsverdampfer eingedampften Extrakte wurden gewogen und in einer Konzentration von 10 mg/ml in Ethanol p.A. gelöst bzw. suspendiert und mit Ultraschall homogenisiert. Von dieser Lösung wurden jeweils 15 µl in 1 cm breiten Banden aufgetragen. Diese Proben dienten in gleicher Weise für HPLC-Untersuchungen und pharmakologische Untersuchungen.

Von den Referenzsubstanzen wurde jeweils 1 mg in 1 ml Ethanol p.A. gelöst. Davon wurden jeweils 10 µl in einer 1 cm breiten Bande aufgetragen.

Durchführung: Entwicklung der DC-Platten über eine Laufstrecke von 14 cm ohne Kammersättigung

Detektion: Direktauswertung mit UV 254 nm (Fluoreszenzminderung)
Direktauswertung mit UV 365 nm (Eigenfluoreszenz)

Tabelle H.1: Rf-Werte und Detektionsverhalten der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen aus Platycodi radix

Verbindung	Rf-Wert Fließmittel FMC1	Rf-Wert Fließmittel FMP5	UV_{254 nm} / UV_{365 nm}	Vanillin- Schwefelsäure- Reagenz (VIS)
Linolsäure	0,58	0,76	-	violett
Phytosterole	0,48	0,72	-	rosa
Betulinsäure	0,50	0,8	-	hellblau
Saponine	Start	Start	-	blau

Tabelle H.2: Rf-Werte und Detektionsverhalten der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen aus *Chaenomeles fructus*

Verbindung	Rf-Wert Fließmittel FCM1	Rf-Wert Fließmittel FCM2	UV _{254 nm} (+) / UV _{365 nm} (*)	Vanillin- Schwefelsäure- Reagenz (VIS)	Liebermann- Burchard- Reagenz (VIS)
TTS1	0,49	0,53	-	violett	rot
TTS2	0,48	0,51	-	blau	rot bis rotviolett
TTS3a	0,21	0,35	-	hellblau	rot
TTS3b	0,20	0,32	-	hellblau	rot-violett
TTS4	0,25	0,38	-	hellblau	rot
TTS5	0,72	0,78	-	rotviolett	rot-braun
TTS6	0,65	0,72	-	blauviolett	hellrot
TTS7	0,49	0,53	-	blau	rot
A1	0,98	0,98	-	rosa	gelblich
Paraffine	0,97	0,97	-	rosa	-
Linolsäure	0,58	0,63	-	rötlich	-
Phytosterole	0,48	0,60	-	rosa	-

Detektionsreagenzien:

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz:

85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure wurden gemischt; nach dem Abkühlen wurde 1,0 g Vanillin zugegeben. Die trockene DC-Platte wurde mit der Lösung kräftig besprüht und anschließend auf 100-105°C erhitzt.

Liebermann-Burchard-Sprühreagenz:

10 Teile Acetanhydrid und 1 Teil konzentrierte Schwefelsäure wurden vorsichtig gemischt. Die trockene DC-Platte wurde mit der Lösung kräftig besprüht und anschließend bei 100-110°C erhitzt.

Präparative DC:

Die oben beschriebenen DC-Platten wurden im frisch hergestellten Fließmittel **FMC3** vorentwickelt; nach vorsichtiger Trocknung bei ca. 40°C im Trockenschrank wurde eine möglichst konzentrierte Lösung der zu trennenden Substanzen strichförmig über die gesamte Startlinie aufgetragen. Nach Entwicklung im frisch hergestellten Fließmittel **FMC3** wurde die Platte bis auf einen ca. 1,5 cm breiten Streifen in der Mitte sorgfältig abgedeckt bzw. dieser herausgeschnitten und mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz detektiert. Anhand der Rf-Werte und der Laufmittelfront wurden die Substanzen markiert und ausgekratzt. Die Elution der Substanzen erfolgte in einer Soxhletapparatur, indem das Kieselgel in eine Hülle gefüllt wurde, mit reichlich Glaswolle abgedeckt wurde und in mehreren Schritten zuerst mit Dichlormethan und anschließend mit Ethanol extrahiert wurde. Bei kleinen Mengen wurde durch mehrmaliges Schütteln und abdekantieren eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Zur Entfernung von Kieselgelresten wurde das Eluat über einen Blaubandfilter (Schleicher & Schuell) filtriert, bevor es weiterbearbeitet wurde.

2.3.2. High-Performance-Liquid Chromatographie (HPLC)

Gerät: HPLC1: Liquid Chromatograph HP 1050 mit Autosampler 1050, beheizbarer Säulenraum, Vakuumentgaser, PC-gesteuert über HP Chemstation-Software (Hewlett Packard).

HPLC2: WATERS Integrity™ System mit WATERS 2690 Separations Module und heizbarem Säulenraum, PC-gesteuert über WATERS Millennium³² Software (LC-MS2)

Detektoren: a) Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M von Hewlett Packard; die Chromatogramme wurden routinemäßig bei 200 nm, 220 nm und 245 nm aufgezeichnet. Für das Screening von Extrakten wurden die Wellenlängen 210 nm, 245 nm und 365 nm verwendet (für Analytik und UV-Spektrometrie)

b) Photodiodenarray-Detektor: WATERS 996 Photodiode Array Detector (HPLC2)

c) Massenspektrometer WATERS Thermabeam™ Mass Detector (LC-MS2)

Säulen: a) LiChroCART® 125-4 mit LiChroSpher® 100 RP-18 (5 µm) mit Vorsäule LiChroCART® 4-4 mit LiChroSpher® 100 RP-18 (5 µm), beide Merck (Standardsäule für Analytik und pharmakologische Tests)

b) Hibar Fertigsäule RT, 250 mm x 10 mm mit LiChrosorb[®] RP-18 (7 µm), Merck (semipräparative HPLC)

Säulentemperatur: 40°C

Flussrate: 1 ml/min (Säule a))

3 ml/min (Säule b))

Mobile Phasen: A: Aqua ad injectabilia (Delta Pharma)

B: Acetonitril für HPLC (T.J. Baker)

Trennsysteme: PLATY Fließmittel A,B; 20 – 50 % B linear in 15 min; 50 –60 % B linear in 10 min; 60 - 95 % B linear in 13 min, 7 min 95 B % isokratisch

CHAENAN Fließmittel A,B; 20 – 30 % B linear in 8 min; 30 – 60 % B linear in 2 min; 60 – 95 % B linear in 30 min; 5 min 95 % B isokratisch

CHAENP1 Fließmittel A,B;

Probenvorbereitung: Alle Extrakte wurden getrocknet, gewogen und in einer Konzentration von 10 mg/ml in Ethanol p.A. gelöst. Pflanzliche Referenzsubstanzen wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol p.A. gelöst. Als Einspritzvolumen wurde problemabhängig 5-10 µl (wenn nicht anders angegeben) gewählt (vgl. Probenvorbereitung Abschnitt 2.3.1).

Semipräparative HPLC: 100 µl einer möglichst konzentrierten Lösung (ca. 30 mg/ml) wurden mehrfach injiziert und mittels DAD-UV-Detektor bei 200 nm peakorientiert fraktioniert.

Retentionszeiten: Linolsäure erscheint bei 35,0 min mit Methode **PLATY**. In Tabelle H.1 sind die Retentionszeiten der in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen aus *Chaenomeles fructus* aufgelistet.

Tabelle H.1 Wichtige HPLC-Retentionszeiten der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen [min] (+/- 0,3 min)

Verbindung	Retentionszeit [min], Methode CHAENAN
Linolsäure	25,4
Oleanolsäure TTS1	25,7
Oleanolsäuremethylester	39,2
Pomolsäure TTS2	15,7
Pomolsäuremethylester	25,9
Euscaphissäure TTS3a	13,3
Tormentolsäure TTS3b	12,9
Maslinsäure TTS4	17,1
3 β -O-Acetylursolsäure TTS5	32,4
3 β -O-Acetylpomolsäure TTS6	23,1
Pirolonsäure TTS7	15,1

2.3.3. Offene Säulenchromatographie (SC)

Diese Trennmethode wurde jeweils bei Fraktionen verwendet, die mehr als 100 mg Probemenge enthielten und sich auf Kieselgelplatten bei Vorversuchen trennen ließen.

Säulen: Für SC unter Normaldruck wurden ausschließlich Glassäulen mit Glasfritte und feinregulierbarem Auslasshahn verwendet.

Stationäre Phasen:

- Kieselgel 60, Korngröße 0,040 – 0,063, 230 – 400 mesh ASTM (Merck, Artnr. 1.093385)
- Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia)

Wiederverwendung: Kieselgelsäulen wurden jeweils nur einmal, Sephadexsäulen wurden nach Reinigung des Gelbettes mehrfach verwendet.

Säulenbeladung: Es wurde jeweils ein Probe : Sorbens-Verhältnis von mind. 1:50 bis 1:100 gewählt.

Füllung der Säulen: Vor dem Befüllen der Säule mit der stationären Phase wurde Kieselgel im zu verwendenden Lösungsmittel angeschlämmt. Sephadex[®] LH-20 wurde mehrere Stunden unter gelegentlichem Schütteln im

Lösungsmittel zur Quellung belassen, bevor es in die Säule gefüllt wurde. Beim Befüllen der Säule wurde die Suspension bei geöffnetem Hahn kontinuierlich und luftblasenfrei eingegossen und anschließend so lange Fließmittel nachgefüllt, bis sich das Füllmaterial gesetzt hatte und die Füllhöhe konstant blieb. Um ein Reißen des Trennbettes bei leicht flüchtigen Lösungsmitteln zu vermeiden, wurden die Säulen in einem kühl klimatisierten Raum betrieben.

Probenaufgabe: Vor der Probenaufgabe wurde das Eluens bis knapp oberhalb des Trennbettes abgelassen. Die gelöste Probe wurde bei geöffnetem Hahn mit einer Pasteurpipette gleichmäßig und ohne Aufwirbeln der stationären Phase auf das Trennmedium getropft. Nach dem Einsickern wurde mit wenig Lösungsmittel nachgespült und wiederum gewartet, bis die Flüssigkeit vollständig vom Trennmaterial aufgenommen worden war. Danach wurde vorsichtig das Sorbens mit Fließmittel überschichtet und mit der Elution begonnen.

Durchführung: Die SC erfolgte mit einer der Säulendimension angepassten Tropfgeschwindigkeit von 6-10 Tropfen pro Minute. Die Fraktionierung erfolgte alle 20 min zeitgesteuert mit einem automatischen Fraktionssammler.

2.3.4. Vakuumflüssigchromatographie (Vacuum Liquid Chromatography, VLC)

Für die VLC wurden spezielle Glassäulen mit Fritte (Porosität 3) und einem darunterliegenden Stutzen zum Anschluss einer Vakuumpumpe verwendet. Am unteren Ende der Säule befand sich ein Kolbenschliff. So war es möglich das Eluens durch den im unteren Bereich der Säule aufgebauten Unterdruck beschleunigt durch die Säulenpackung zu saugen und direkt in einem Schliffkolben aufzufangen.

Stationäre Phase: Kieselgel 60, 40 –63 μm (Fa. Merck)

Säulen: VLC1: Länge: 15 cm; $\varnothing_{\text{innen}} = 2,5$ cm, Füllmenge ca. 25 g.

VLC2: Länge: 30 cm; $\varnothing_{\text{innen}} = 5$ cm, Füllmenge 150 - 180 g

Durchführung:

Über die Glasfritte wurde zunächst eine Lage Filterpapier und darüber als unterer Abschluss der Säulenpackung eine ca. 1 cm dicke Schicht Seesand (Fa. Roth) aufgegeben. Anschließend wurde das Kieselgel trocken, aber möglichst gleichmäßig in die Säule eingefüllt. Die Aufgabe der Probe erfolgte als Verreibung von Extrakt/Kieselgel (gerade noch rieselfähig). Die Säulenbelastung wurde nicht höher als 1 :10 Extrakt / Sorbens gewählt. Als oberer Abschluss

der Säule wurde nochmals eine feine Schicht Kieselgel, eine ca. 1 cm dicke Schicht Seesand und Glaswolle aufgegeben, um das Aufwirbeln des Kieselgelbettes zu vermeiden.

Als Elutionsmittel diente jeweils die mind. doppelte Menge Lösungsmittel wie Sorbens. Es wurden Mischungen von *n*-Hexan und Ethylacetat eingesetzt, beginnend mit reinem *n*-Hexan. Zur Steigerung der Polarität wurde stufenweise der Ethylacetatanteil erhöht (vgl. Tabelle H.1 und Tabelle H.1).

2.3.5. Mitteldruck-Säulenchromatographie (MPLC)

Gerät: HPLC-Pumpe 64 mit Gradientensteuerung HPLC Programmer 50 und Mischkammer, UV-Detektor K-2000/A4060 und Zweikanalschreiber (aller Fa. Knauer)

Säulen: Die verwendeten Säulen waren spezielle vom Glasbläser der Universität Düsseldorf hergestellte dickwandige Borosilikatglassäulen ($\varnothing = 18$ mm) mit eigens angefertigten Stempeln aus Messing und doppelt-konisch gearbeiteten Teflonköpfen oder mit handelsüblichen Stempeln der Fa. Latek.

MPLC-Säule 1: Füllhöhe 40 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 0,8 cm, 8 g LiChroprep RP 18, 15 – 25 μm (Merck)

MPLC-Säule 2: Füllhöhe 47 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 1,0 cm, 23 g LiChroprep RP 18, 25 – 40 μm (Merck)

Mobile Phasen: Deionisiertes Wasser / Acetonitril für die HPLC (J.T. Baker)

Deionisiertes Wasser / Methanol (2x destilliert)

Probenaufgabe: Die Proben wurden in ca. 1 ml Ethanol gelöst und über den Injektor (Altex) aufgegeben.

Flussrate: 4 ml/min

Fraktionierung: Die Fraktionierung erfolgte manuell-peakorientiert mit Hilfe des angeschlossenen Detektors oder manuell-zeitorientiert, wobei der Reagenzglaswechsel ca. jede Minute erfolgte.

Detektion: Zur Detektion wurde die Wellenlänge $\lambda = 220$ nm verwendet. Wurde ohne Detektor gearbeitet, wurden die Fraktionen nach DC-Prüfung vereinigt.

2.3.6. Gaschromatographie (GC)

Verwendete Geräte:

GC1: *Analytische Untersuchungen / Quantitative Analysen:*

Gaschromatograph HP 5890 mit Spliteinlasssystem und Flammenionisationsdetektor, Integrator HP 3396 Series II (alles Hewlett Packard); Quarzkapillarsäule OPTIMA 1 DF (25 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Macherey & Nagel); Trägergas Stickstoff (Reinheitsgrad 5.0, O₂-frei durch Oxisorb); Detektor- und Injektortemperatur 300°C; Temperaturprogramme siehe unten.

GC2: *GC-EI-MS-gekoppelte Untersuchungen I:*

Gaschromatograph Typ 1700 (Varian) mit Spliteinlasssystem; Injektortemperatur 250°C; massenselektivem Detektor Finnigan 1020 (Ionisierungsenergie 70 eV) der Fa. Finnigan MAT, Bremen; Säule wie GC1; Trägergas Helium (5.0)

GC3: *GC-EI-MS-gekoppelte Untersuchungen II:*

Gaschromatograph HP 5890 Series II Plus mit Spliteinlasssystem; Injektortemperatur 300°C; massenselektivem Detektor HP 5972 Series (Ionisierungsenergie 70 eV) und HP Chemstation (alles von Hewlett Packard); Säule wie GC1; Trägergas Helium 5.0; Säulenvordruck 1,16 x 10⁵ Pa; Trägergasstrom (total): 70 ml/min; Säulenflussrate 1,5 ml/min (Split 1:47)

Temperaturgradienten:

FS: 165°C isotherm für 6 min, 165–180°C linear mit 10°C/min, 180°C isotherm für 20 min, mit 20 °C/min auf 270°C aufheizen, 20 min bei 270°C ausheizen

(quantitative Bestimmung der Fettsäuremethylester)

ST: 285°C isotherm (Sterole, Triterpene)

I(GC3): 150-280°C linear 10 °C/min (Standardmethode)

Derivatisierungen:

Silylierung: Auf eine kleine Menge der unter Stickstoff getrockneten Substanz wurde BSTFA (**Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid** für die Gaschromatographie, Merck) und Pyridin p.A. (Merck) im Verhältnis 1:1 gegeben; nach 20 min konnte die Mischung direkt für die Gaschromatographie verwendet werden.

Methylierung mit Diazomethan: In einer Apparatur nach FALES et al. (1973; Abb. siehe dort) wurde die in einer Mischung aus Diethylether und Methanol 1:1 (beide 2x dest.) gelöste Probe in das äußere Gefäß gegeben. In das innere Gefäß wurden 100 µl einer 10 %igen Lösung von N-Methyl-N-nitroso-4-toluolsulfonamid (Merck-Schuchardt) in Ether pipettiert. Anschließend wurden 100 µl 0,75 N ethanolischer Natronlauge ins innere Gefäß zupipettiert. Das Gefäß wurde locker verschlossen und in ein Eisbad gestellt. Im inneren Gefäß entwickelte sich Diazomethan, das durch eine kleine Öffnung ins äußere Gefäß gelangte und dort die Triterpensäuren zu ihren Methylestern umsetzte. Da die Reaktion stark exotherm verlief, musste gut gekühlt werden. Nach Verdunsten des überschüssigen Diazomethans unter dem Abzug, konnte die Probe direkt zu weiteren Reaktionen oder zur gaschromatographischen Analyse verwendet werden.

Retentionszeiten gaschromatographisch analysierter Verbindungen:

Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die Gesamtretentionszeit bzw. um die relative Retentionszeit auf den internen Standard (Myristinsäuremethylester) bezogen.

Tabelle H.1: GC-Retentionszeiten von gaschromatisch analysierten Fettsäuremethylester

Verbindung	Rt [min]	Rt_{rel}	GC-Methode
Myristinsäuremethylester	7,3	1,00	FS
Linolsäuremethylester	21,2	2,90	FS
α-Linolensäuremethylester	21,3	2,92	FS
Palmitinsäuremethylester	12,7	1,74	FS
Ölsäuremethylester	21,7	2,97	FS
Stearinsäuremethylester	23,8	3,26	FS

2.4. Spektroskopische und physikalische Arbeitsmethoden

2.4.1. Schmelzpunktbestimmung

Es wurde ein Mikroskopheiztisch Typ 350 der Fa. Leitz verwendet. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

2.4.2. UV-Spektroskopie

Sämtliche UV-Spektren wurden online während der HPLC-Analysen mit dem Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M (Hewlett-Packard; HPLC-Anlage siehe Kapitel I 2.3.2), somit also in Acetonitril-Wasser-Gemischen bei Raumtemperatur aufgenommen.

2.4.3. IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte in einem Spektralphotometer Typ 297 (Perkin-Elmer). Die Substanzen wurden dabei direkt zwischen zwei Natriumchlorid-Platten oder als Kaliumbromidpresslinge vermessen (etwa 3 mg Substanz in 100-150 mg KBr, Kaliumbromid für Spektroskopie, Fa. Fluka). Die IR-Aufnahmen als Film erfolgten am Spectrophotometer Vector 22 FT-IR (Fa. Bruker).

2.4.4. Massenspektrometrie (MS)

Elektronenstoßionisation (EI): GC/LC-EI-MS

EI-Spektren wurden unter Kopplung von Massenspektrometer mit Gaschromatograph **GC2** (ausführlich beschrieben in Abschnitt 2.3.6) oder Kopplung mit HPLC-Gerät **HPLC2** (ausführlich beschrieben in Abschnitt 2.3.2) aufgenommen.

Direkteinlass-Elektronenstoßionisation (DEI)-MS:

Massenspektren von Einzelverbindungen, die nicht GC-fähig waren, wurden nach Direkteinlass mit dem Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT) gemessen.

Chemische Ionisation CI -MS:

Die Messung von CI-Spektren erfolgte am Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT). Als Reaktandgas für die chemische Ionisation diente NH₃.

2.4.5. NMR-Spektroskopie

- Gerät:** Die NMR-Spektren wurden an dem Kernresonanzspektrometer DRX 500, Fa. Bruker, gemessen.
- Messfrequenz:** $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz; $^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz
- Probenköpfe:** TBI-Probenkopf (triple broadband inverse gradient head) ($^1\text{H-NMR}$; COSY, HSQC, HMBC)
QNP-Kopf (quadro nuclear probe) ($^{13}\text{C-NMR}$, DEPT)
- Lösungsmittel:** d-Chloroform (99,8 %, Merck, Art.-Nr. 1.03420), d_4 -Methanol (99,8 % Merck, Art.-Nr. 1.06028)
- Probenvorbereitung:** Die Proben wurden unter Stickstoff getrocknet bzw. über Nacht im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt. Kurz vor der Messung wurden sie gelöst und über Glaswolle filtriert.
- Referenzierung:** Aufgrund der geringen Substanzmengen wurde auf den Zusatz von TMS verzichtet. Die Kalibrierung erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals.
- Auswertung:** Die Werte für die chemische Verschiebung [δ] beziehen sich auf TMS und sind in ppm angegeben. Kopplungskonstanten [J] sind in Hz berechnet.

Tabelle H.1: Verschiebungen der Lösungsmittelsignale bei NMR-Messungen (Kalibrierung)

Lösemittel	Verschiebung bezogen auf TMS, Aufspaltung	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
d-Chloroform	7,24 ppm (Singulett)	77,0 ppm Triplett
d_4 -Methanol	3,31 ppm (Quintett)	49,3 ppm Septett
	3,35 ppm (Singulett)	
	4,78 ppm (Singulett)	

2.5. Gekoppelte Analysenverfahren

LC-UV-Spektrometrie: vgl. Abschnitt 2.3.2 und 2.4.2

LC-MS-Analytik 1: vgl. Abschnitt 2.3.2 und 2.4.4

Da die meisten isolierten Verbindungen nicht ohne Derivatisierungen GC-gängig waren, wurde zur Aufnahme von MS-Spektren die Kopplung zwischen HPLC2 und MS-EI gewählt. Aus einzelnen Fraktionen konnten die angereicherten Verbindungen nach vorangegangenem HPLC-Lauf mit einem Massenspektrometer WATERS Thermabeam™ detektiert werden.

LC-MS-Analytik 2: vgl. Abschnitt 2.3.2 und 2.4.4

2.6. Gehaltsbestimmung von Fettsäuren

2.6.1. Herstellung der Fettsäuremethylster

Die Herstellung der Fettsäuremethylester erfolgte in Anlehnung an die von VAN WIJNGAARDEN (1967) optimierte Methode der Veresterung von organischen Säuren mit methanolischer Bortrifluoridlösung. Als interner Standard wurde wie bei ZSCHOCKE (1998) Myristinsäure gewählt. Als Untersuchungslösungen wurden methanolische Lösungen der zu untersuchenden Extrakte in einer Konzentration von 30 mg/ml bzw. methanolische Lösungen der Fettsäuren in einer Konzentration von 5 mg/ml vorbereitet.

In einen 25 ml Rundhalskolben mit schmalen Hals wurden 2 ml 0,5 N methanolische Natronlauge vorgelegt. Nach Einpipettieren von 50 µl Myristinsäurestammmlösung und 200 µl Probe (Extrakt oder Fettsäuregemisch) wurde die Mischung unter Rückfluss zum Sieden erhitzt (Heizpilz Stufe II). Nach 5 min wurden 2 ml einer 14%igen methanolischen Bortrifluoridlösung (Sigma; B-1252) durch den Kühler zugegeben. Nach weiteren 2 min Sieden wurden 4 ml *n*-Heptan durch den Kühler zupipettiert und der Siedeprozess noch 2 min fortgesetzt. Danach wurde der Heizpilz entfernt. Nach Abkühlen wurde die lipophile Phase mit gesättigter NaCl-Lösung in den Kolbenhals getrieben, abpipettiert und über NaSO₄ getrocknet. Vor Injektion in den Gaschromatographen wurde die Lösung durch Glaswolle filtriert.

Unterscheidung zwischen gebundenen und freien Fettsäuren:

Mit der abgewandelten Methode nach VAN WIJNGAARDEN (1967) (siehe oben) werden auch Fettsäuren erfasst, die z.B. im Wachs der Pflanze gebunden sind, da sie durch Kochen

mit Natronlauge hydrolysiert werden. Da im PGHS-Test speziell die freien Fettsäuren zur inhibitorischen Wirkung beitragen, schien eine Unterscheidung der beiden Gruppen wichtig. ZSCHOCKE (1998) verifizierte, dass durch Veresterung der Fettsäuren in reinem Methanol und ohne Laugenzusatz nach oben beschriebener Methode nur die ungebundenen Fettsäuren erfasst werden. Zur Unterscheidung von gebundenen und freien Fettsäuren wurden entsprechend die Extrakte in methanolischer Natronlauge und in reinem Methanol verestert und gaschromatographisch analysiert. Die Werte wurden anschließend verglichen.

2.6.2. GC-Gehaltsbestimmung

Um die Diskriminierung einzelner Komponenten des Gemisches auszugleichen, wurden jeweils für die zu bestimmenden Fettsäuremethylester Korrekturfaktoren nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Korrekturfaktor } f = \frac{\text{Fläche interner Standard} * \text{Menge Substanz}}{\text{Fläche Substanz} * \text{Menge interner Standard}}$$

Gleichung H.1: Berechnung des Korrekturfaktors zur Quantifizierung des Fettsäuremethylester

Von reiner Palmitinsäure, Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure (alle Sigma) wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 5 mg/ml in Methanol hergestellt. Zur Quantifizierung wurde eine Mischung aus diesen Stammlösungen hergestellt. Dabei wurden jeweils 50 µl verwendet, so dass von jeder Fettsäure 250 µg in der Mischung enthalten waren. Genauso wurden weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:2, 1:5 und 1:10 mit Methanol hergestellt mit entsprechend je 125 µg, 50 µg und 25 µg pro Fettsäure für die Mischungen. Diese Lösungen wurden nach der Methodik 2.6.1 verestert und gaschromatographisch mit dem GC-Programm FS analysiert.

Alle Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen. Die Korrekturfaktoren für die quantitative Bestimmung der Fettsäuremethylester finden sich in Tabelle H.1.

Zur Überprüfung der Identität der Peaks wurden alle Proben zusätzlich mittels GC-MS analysiert.

Tabelle H.1: Korrekturfaktoren zur Berechnung des Fettsäuregehaltes bezogen auf den internen Standard Myristinsäure

Fettsäure	Korrekturfaktor
Palmitinsäure	0,91
Linolsäure	0,99
Ölsäure	1,08
Stearinsäure	1,02
α -Linolensäure	1,05

Der Gehalt wurde mittels der umgestellten Formel für den Korrekturfaktor (Gleichung H.1) errechnet.

Aus dem absoluten Gesamtgehalt an Fettsäuremethylestern in der Probelösung wurde der relative Gehalt in der Einwaage und ebenso der relative Gehalt im Extrakt bzw. den Proben bestimmt.

2.7. Isolierung und Identifizierung der Inhaltsstoffe aus *Platycodi radix*

2.7.1. Fraktionierung und Isolierung

Der Dichlormethanextrakt wurde mittels Vakuumflüssigchromatographie an 184 g Kieselgel 60 (Säule: VLC2) in 18 Fraktionen vorgetrennt (siehe Abschnitt: 2.3.4). Die Fraktionen wurden durch Elution mit je 300 ml *n*-Hexan, Ethylacetat und deren Mischungen in steigender Polarität erhalten. Die letzte Fraktion wurde mit reinem Methanol gewonnen. Mit dieser Fraktion wurden größere Mengen Kieselgel miteluiert, so dass von einer phytochemischen Untersuchung abgesehen werden musste.

Isolierung der Phytosterole:

Nach VLC-Fraktionierung erschien in Fraktion **8** und **9** ein weißer, voluminöser Niederschlag. Dieser wurde abgetrennt, getrocknet und durch Umkristallisieren gereinigt.

Isolierung von Linolsäure:

Die Fraktionen **11** bis **15** wurden zunächst einzeln durch offene Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH20 mit Dichlormethan als Eluent aufgetrennt. Nach DC-Prüfung wurden alle Linolsäure-haltigen Fraktionen vereint und nochmals über Sephadex[®] LH20 gereinigt. **128 mg** reine **Linolsäure** wurde schließlich durch MPLC an RP 18 Material erhalten (Säule

MPLC2 vgl. Abschnitt 2.3.5, isokratischer Gradient: Methanol : Wasser von 30 % auf 100 % Methanol in 120 min)

Tabelle H.1: VLC-Fraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Platycodi radix*

Fraktion	n-Hexan [ml]	Ethylacetat [ml]	Ausbeute [mg]	identifizierte und isolierte Verbindungen
1	300	0	224	-
2	290	10	0,1	-
3	280	20	345	-
4	270	30	1112	-
5	260	40	67	-
6	255	45	288	-
7	250	50	100	-
8	245	55	183	Phytosterole, Betulinsäure
9	240	60	318	Phytosterole, Betulinsäure
10	235	65	194	Phytosterole
11	230	70	63	Linolsäure
12	220	80	141	Linolsäure
13	210	90	153	Linolsäure
14	200	100	63	Linolsäure
15	150	150	140	Linolsäure
16	100	200	114	Linolsäure
17	0	300	260	Linolsäure, zwei Oleanolate MG 800 und MG 600
18	Methanol		1181	-

2.7.2. Prüfung auf Anwesenheit von Saponinen

Schaumtest auf Saponine

Ca. 20 mg Extrakt wurden in einem Reagenzglas vom organischen Lösungsmittel befreit und mit 1000 µl Wasser wieder aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung heftig

geschüttelt. Es bildete sich kein Schaum an der Oberfläche. (abgewandelte Methode nach *JAP. XI*, Pharmacopoeia of Japan, 1986).

Dünnschichtchromatographische Prüfung auf Saponine

Auf DC-Alufolien (vgl. Abschnitt 2.3.1) wurden verschiedene Extrakte von *Platycodi radix*, Oleanolsäure, Glycyrrhizinsäure, Aescin und ein Standardsaponingemisch (Saponin RN, DAB 1996), das im Institut vorhanden war, aufgetragen und mit **FMS6** entwickelt. Die Platte wurde mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz besprüht. Der Methanolextrakt und die verschiedenen glycosidischen Referenzverbindungen erschienen bei $R_f < 0,2$; Oleanolsäure zeigte einen R_f von 0,95. Bestandteile der Dichlormethanextraktionen und *n*-Hexanextraktion wurden im Bereich zwischen $R_f = 0,48$ bis 1,0 gefunden.

2.8. Isolierung der Inhaltsstoffe aus *Chaenomelis fructus*

Tabelle H.1 VLC- Fraktionierung des Dichlormethnaextrakte aus Chaenomelis Fructus

Fraktion	n-Hexan : Ethylacetat [ml]	Gewicht [g]
I	300 -	1,225
II	280 : 20	0,197
III	270 : 30	1,241
IV	250 : 50	1,227
V	230 : 70	1,444
VI	210 : 90	1,571
VII	190 : 110	1,324
VIII	170 : 130	3,393
	150 : 150	
IX	130 : 170	1,486
	120 : 180	
X	90 : 210	1,090
	60 : 240	
	30 : 270	
	- : 300	

Grobfraktionierung:

Der Dichlormethanextrakt wurde zunächst in zwei Portionen von je 8 g geteilt. Beide Portionen wurden mittels Vakuumflüssigchromatographie an 180 g Kieselgel 60 (Säule **VLC2**) in 15 Fraktionen vorgetrennt. Die Fraktionen wurden durch Elution mit je 300 ml *n*-Hexan, Ethylacetat und deren Mischungen in steigender Polarität erhalten. Nach DC-Prüfung wurden die Fraktionen zu den Fraktionen **I-X** zusammengefasst. (siehe Tabelle H.1)

Im Anschluss wurde die Säule mit Methanol gespült. Diese Fraktion wurde als Rest von 3,4 g aufgefangen und keiner phytochemischen Untersuchung unterzogen.

Sämtlich Inhaltsstoffe wurden aus den Fraktionen **IV**, **VI**, **IX** und **X** isoliert. Tabelle H.2 gibt darüber eine Übersicht.

*Tabelle H.2 Übersicht über die isolierten und identifizierten Inhaltsstoffe der Fraktionen der VLC von *Chaenomelis fructus**

Fraktion	Isolierte Inhaltsstoffe	Identifizierte Inhaltsstoffe
I		Paraffine
IV	A1 (28 mg)	
V		TTS5, Phytosterole
VI	β-Sitosterol, Campesterol (550 mg) TTS5 (27,1 mg) TTS6 (28,0 mg)	Linolsäure
VII		TTS6, Linolsäure, Phytosterole, Oleanolsäure
VIII		Oleanolsäure
IX	TTS1 (414 mg) TTS2 (3,3 mg und 5,4 mg) TTS7 (1,8 mg)	
X	TTS1 (120 mg) TTS3 (9,3 mg) TTS4 (6,5 mg)	TTS2

Weitere Auftrennung der Fraktion VI:

Fraktion **VI** wurde zunächst mittels offener Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20 (Füllmenge: 100 g, Säule: 90 cm lang, Ø = 2 cm) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat im Verhältnis 6:4 in sieben Fraktionen getrennt. Aus dieser Trennung konnten 550 mg Phytosterole erhalten werden. Außerdem war es möglich mit diesem Arbeitsschritt Chlorophyll und Linolsäure abzutrennen.

Aus den Unterfraktionen **VI-4** bis **6** konnte über zwei Anreicherungsschritte mittels MPLC (Aufgabemenge: 79,2 bzw. 21 mg und 30 mg, MPLC-Säule 2, siehe Abschnitt 2.3.5, Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Gradient: 10-40 % Acetonitril in 10 min, 40-100 % Acetonitril in 40 min, Detektion 220 nm) 27,1 mg der Verbindung TTS5 (3 β -O-Acetylursolsäure) und 28,0 mg der Verbindung TTS 6 (3 β -O-Acetylpomolsäure) rein erhalten werden. Die Verbindung TTS5 war in weiteren 13,5 mg zu über 70 % rein, die jedoch zur Strukturaufklärung nicht weiter benötigt wurden.

Weitere Auftrennung der Fraktion IX:

Da diese Fraktion in den pharmakologischen Tests durch ihre gute Wirkung aufgefallen war, wurde sie an Sephadex[®] LH-20 (Füllmenge: 100 g, Säule 90 cm lang, \varnothing = 2 cm, Lösungsmittel: 100 % Ethylacetat) in zunächst fünf größere Fraktionen getrennt. Aus der zweiten Fraktion kristallisierte nach Einrotieren und Neulösen in wenig Ethanol Oleanolsäure rein aus. In Fraktionen 3 und 4 war Oleanolsäure mit TTS2 im Verhältnis 70:30 angereichert. Diese beiden Verbindungen konnten auf DC kaum getrennt werden, zeigten jedoch bei der HPLC-Analyse mit der Methode **CHAENAN** sehr unterschiedliches Laufverhalten. Dies wurde ausgenutzt, um zuerst mittels MPLC (Aufgabemenge: 24,3 mg (max. löslich), MPLC-Säule 1, siehe Abschnitt 2.3.5, Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Gradient: 30-65 % Acetonitril in 16 min, 65-90 % in 34 min, 90-100 % in 10 min, Flussrate: 1 ml/min) in mehreren Läufen TTS2 anzureichern. Die Aufgabe auf die anschließende präparative HPLC (Aufgabemenge: 12 mg, Konz. 10 mg/ml, Injektionsvolumen 100 μ l, HPLC-Säule *b*), siehe Abschnitt 2.3.2, Gradient: 30-65 % Acetonitril in 12 min, 65-78 % Acetonitril in 14 min, 78-98 % Acetonitril in 4 min, 98 % Acetonitril für 10 min, Detektion: 200 nm) enthielt nur mehr ca. 30 % TTS1 (Oleanolsäure). 3,3 mg TTS2 (Pomolsäure) konnten so rein erhalten werden. Aus dieser Fraktionierung konnte gleichzeitig TTS7 (Pirrolonsäure) isoliert werden.

Weitere Auftrennung der Fraktion X:

Die Fraktion **X** wurde über offene Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Füllmenge: 80 g, Säule: 70 cm lang, \varnothing = 2 cm) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan/Ethylacetat 6:4 in vier große Fraktionen geteilt. Fraktion **X-4** enthielt neben TTS1/2 relativ große Mengen an hydrophilen Verbindungen. Diese wurden mittels präparativer DC (siehe Abschnitt 2.3.1) von TTS1/2 abgetrennt. Über MPLC (Aufgabemenge: 4 x 10 – 50 mg; gesamt: ca. 63,5 mg, MPLC-Säule 2, siehe Abschnitt 2.3.5, Fließmittel: Acetonitril/Wasser; Gradient: 10-30 % Acetonitril in 15 min, 30-100 % Acetonitril in 25 min, Flussrate: 4 ml/min) wurden zwei Fraktionen von 16,3 mg (**X-4-1**) und 17,5 mg (**X-4-2**) gewonnen, die jeweils über präparative HPLC weiter gereinigt wurden (präparative HPLC **X-4-1**:

Aufgabemenge: 16,3 mg, Konz. 10 mg/ml, Injektionsvolumen 100 μ l, HPLC-Säule *b*), siehe Abschnitt 2.3.2, Gradient: 40-45 % Acetonitril in 8 min, 45–98 % Acetonitril in 22 min, 98 % Acetonitril für 10 min, Detektion: 200 nm; präparative HPLC X-4-2: Aufgabemenge: 17,5 mg, Konz. 10 mg/ml, Injektionsvolumen 100 μ l, HPLC-Säule *b*), siehe Abschnitt 2.3.2, Gradient: 50-65 % Acetonitril in 7 min, 65–85 % Acetonitril in 13 min, 85–98 % in 8 min, 98 % Acetonitril für 8 min, Detektion: 200 nm). Aus Fraktion X-4-1 wurden 6,5 mg TTS4 (Maslinsäure) isoliert. Aus Fraktion X-4-2 konnten 9,3 mg TTS3a/b (Euscaphissäure, Tormentolsäure) isoliert werden. Diese beiden Substanzen ließen sich nicht weiter auftrennen. Ihre Strukturaufklärung erfolgte im Gemisch.

Isolierung von A1 (Nonacosan-10-ol):

Nach einer weiteren VLC-Fraktionierung von VLC-Fraktion **IV** mit Fließmittelgemischen aus Cyclohexan : Dichlormethan (jeweils 100 ml mit steigendem Dichlormethananteil kristallisierte aus der dritten Fraktion (Cyclohexan : Dichlormethan 6 : 4) A1 mit einigen Verunreinigungen aus, die jedoch über MPLC abgetrennt werden konnten. (Aufgabemenge: 80 mg, MPLC-Säule 2, siehe Abschnitt 2.3.5, Fließmittel: Acetonitril : Wasser, Gradient: 40-100 % Acetonitril in 60 min, Flussrate: 5 ml/min, Fraktionensammler).

Identifizierung der Paraffine:

VLC-Fraktion **I** wurde mit Hilfe des **GC3**, Methode **I** aufgetrennt. Als Referenz wurde eine Mischung aus *n*-Alkanen der Kettenlänge C10 bis C20 und eine Mischung mit *n*-Alkanen der Kettenlänge C28, C30, C32 und C34 eingespritzt.

2.9. Physikalische und spektroskopische Daten

2.9.1. Inhaltsstoffe aus Platycodi radix

Linolsäure

Summenformel:	$C_{18}H_{32}O_2$
Aussehen:	farblose ölige Flüssigkeit
EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 280 [M^+] (10), 256 [$M - 2CH_3$] ⁺ (3), 236 [$M - COO$] ⁺ (1), 182 (3), 163 (3), 149 (6), 135 (5), 123 (14), 109 (33), 95 (48), 81 (68), 67 (100), 54 (93), 43 (38), 41 (36)
DC:	<i>R_f</i> -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.1, S.238
HPLC:	25,04 min (Methode CHAENAN), 35,06 min (Methode PLATY)

IR:	3450 cm ⁻¹ (=O Oberschwingung), 3010 cm ⁻¹ (C=C), 2925 cm ⁻¹ (CH ₂), 2860 cm ⁻¹ (CH ₃), 1710 cm ⁻¹ (C=O)
UV:	Endabsorption bei 210 nm
¹ H NMR:	5,38 ppm (m), 2,80 ppm (t, 6,6 Hz), 2,37 ppm (t, 7,5 Hz), 2,20 ppm (s), 2,08 ppm (dd, 6,9 Hz; 13,9 Hz), 1,67 ppm (qn, 6,9 Hz), 1,35 ppm (m), 0,92 ppm (m)
¹³ C NMR:	180,1; 130,2; 130,0; 128,0; 127,8; 34,0; 31,5; 29,6; 29,4; 29,2; 29,1; 29,1; 29,0; 27,2; 27,2; 25,6; 22,6; 14,1

α-Spinasterol

Summenformel:	C ₂₉ H ₄₈ O
Aussehen:	farblose Kristalle (Gemisch mit anderen Phytosterolen)
GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 412 [M ⁺] (26), 397 [M - CH ₃] ⁺ (7), 394 [M - H ₂ O] ⁺ (2), 379 [M - CH ₃ - H ₂ O] ⁺ (2), 369 (11), 351 (3), 300 (14), 271 (86), 255 (37), 246 (15), 231 (12), 229 (28), 207 (3), 159 (6), 147 (37), 133 (21), 119 (14), 105 (18), 91 (36), 83 (82), 81 (92), 69 (30), 55 (100), 43 (79)
DC:	R _f - Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.1, S.238
GC:	10,74 min (Methode ST , GC2), 18,41 min (Methode I ; GC3)

Campesterol

Summenformel:	C ₂₈ H ₄₈ O
GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 400 [M ⁺] (6), 382 [M - H ₂ O] ⁺ (3), 367 [M - CH ₃ - H ₂ O] ⁺ (3), 315 (7), 289 (8), 273 (4), 255 (7), 231 (5), 213 (12), 207 (28), 199 (5), 159 (15), 145 (24), 119 (20), 105 (34), 91 (35), 81 (37), 55 (56), 43 (100)
DC:	R _f - Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.1, S.238
GC:	10,25 min (Methode ST , GC2), 17,84 min (Methode I ; GC3)

Δ⁷-Stigmastenol

Summenformel:	C ₂₉ H ₅₀ O
---------------	-----------------------------------

GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 414 [M^+] (36), 399 [$M - H_2O$] ⁺ (14), 381 [$M - CH_3 - H_2O$] ⁺ (3), 273 (43), 271 (15), 255 (90), 246 (13), 231 (23), 229 (44), 228 (6), 213 (38), 199 (5), 161 (14) 159 (15), 147 (29), 119 (20), 107 (58), 95 (42), 81 (62), 57 (58), 55 (56), 43 (100)
DC:	R _f - Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.1, S.238
GC:	11,25 min (Methode ST , GC2), 19,61 min (Methode I ; GC3)

Methylpalmitat

GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 270 [M^+] (1), 239 (2), 227 (4), 213 (1), 199 (2), 185 (2), 171 (2), 143 (10), 129 (6), 97 (8), 87 (73), 74 (100), 55 (38), 43 (30), 42 (31), 41 (30)
GC-Retentionszeit:	siehe Tabelle H.1

Methylolinolat

GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 294 [M^+] (1), 279 [$M - CH_3$] ⁺ (<1), 263 (3), 178 (2), 164 (3), 150 (6), 135 (10), 122 (12), 109 (29), 96 (41), 81 (96), 67 (90), 55 (100), 41 (52)
GC-Retentionszeit:	siehe Tabelle H.1

Methyloleat

GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 296 [M^+] (<1), 264 (1), 222 (1), 180 (2), 163 (3), 150 (3), 135 (5), 123 (8), 109 (13), 95 (42), 81 (65), 67 (84), 55 (100), 41 (31)
GC-Retentionszeit:	siehe Tabelle H.1

Methylstearat

GC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 298 [M^+] (1), 267 (1), 255 (6), 199 (3), 185 (1), 143 (10), 129 (4), 107 (2), 97 (8), 87 (64), 74 (100), 69 (18), 57 (27), 41 (33)
GC-Retentionszeit:	siehe Tabelle H.1

2.9.2. Inhaltsstoffe aus Chaenomelis fructus**TTS1: Oleanolsäure**

Summenformel:	$C_{30}H_{48}O_3$
Aussehen:	weiße Nadeln
Schmelzpunkt:	277 °C
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	$\lambda_{max} < 200$ nm
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3500-3300 (OH), 2940-2830 (CH ₂), 1693 (C=O), 1400-1200 (C-H)
LC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 457/456 [M ⁺](0,7); 411 [M-HCOOH] ⁺ (8,4), 393 [M-HCOOH-H ₂ O] ⁺ (13,4), 249 (100) [C ₁₆ H ₂₅ O ₂] ⁺ ; 248 (95), 234 (17), 208 (33), 204 (85), 190 (70), 189 (51), 134 (34), 120 (38)
¹ H-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.3; S.157
¹³ C-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.3; S.157
DC:	R _f -Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

Oleanolsäuremethylester

Summenformel:	$C_{31}H_{50}O_3$
Aussehen:	weiße Nadeln
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	$\lambda_{max} < 200$ nm
DEI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 470 [M ⁺](8); 411 [M-HCOOCH ₃] ⁺ (3), 262 (85) [C ₁₇ H ₂₆ O ₂] ⁺ ; 248 (5), 233 (3), 203 [C ₁₅ H ₂₃] ⁺ (100), 190 (14), 189 (25), 133 (20), 119 (16)
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS2: Pomolsäure

Summenformel:	$C_{30}H_{48}O_4$
Aussehen:	weiße Nadeln

Schmelzpunkt:	284 °C
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	λ _{max} < 200 nm
LC-EI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 472 [M ⁺](3,5), 454 [M-H ₂ O] ⁺ (1,7), 441 (14), 369 z.B. [M-C ₅ O ₂ H ₁₁] ⁺ (35), 354 (4), 236 [C ₁₄ H ₂₀ O ₃] ⁺ (4); 222 (15), 202 (18), 201 (15), 189 (14), 187 (34), 184 (32), 165 (24), 158 (25), 147 (98), 146 [C ₁₁ H ₁₄] ⁺ (100), 135 (57), 120 (91), 105 (83)
¹ H-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.4; S.163
¹³ C-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.4; S.163
DC:	R _f - Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS3a: Euscaphissäure

Summenformel:	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
Aussehen:	weiße Nadeln
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	λ _{max} < 200 nm
DEI-MS:	<i>m/z</i> (rel. Int.): 488 [M ⁺](0,5), 442 [M-HCOOH] ⁺ (4,5), 370 [M-HCOOH-C ₄ H ₈ O] ⁺ (4,6), 264 (14), 246 (27), 236 (8), 231 (21), 218 (25), 201 [C ₁₅ H ₂₁] ⁺ (75), 189 (32), 165 (21), 146 [C ₁₁ H ₁₄] ⁺ (100), 135 (53), 119 (54), 105 (46)
¹ H-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.6; S.170
¹³ C-NMR-Daten:	siehe Tabelle F.6; S.170
DC:	R _f - Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS3b: Tormentolsäure

Summenformel:	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
Aussehen:	weiße Nadeln
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	λ _{max} < 200 nm
DEI-MS:	siehe Euscaphissäure

$^1\text{H-NMR-Daten:}$	siehe Tabelle F.7; S.174
$^{13}\text{C-NMR-Daten:}$	siehe Tabelle F.7; S.174
DC:	Rf- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS4: 2 α ,3 β -Hydroxyoleanolsäure

Summenformel:	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$
Aussehen:	weiße Nadeln
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	$\lambda_{\text{max}} < 200 \text{ nm}$
DEI-MS:	m/z (rel. Int.): 472 [M ⁺](9), 454 [M-H ₂ O] ⁺ (6), 426 [M-HCOOH] ⁺ (38), 393 (23), 368 (13), 248 [C ₁₆ H ₂₄ O ₂] ⁺ (75); 233 (21), 203 [C ₁₅ H ₂₃] ⁺ (100), 189 (33), 149 (43), 133 (55), 119 (37), 105 (45)
$^1\text{H-NMR-Daten:}$	siehe Tabelle F.8; 177
DC:	Rf- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239
HPLC:	Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS5: 3- β O-Acetylursolsäure

Summenformel:	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$
Aussehen:	weiße Nadeln
Schmelzpunkt:	283°C
UV _{max} (CH ₃ CN/H ₂ O):	$\lambda_{\text{max}} < 200 \text{ nm}$
IR:	ν [cm ⁻¹] = 3500-3300 (OH), 3020-2860 (CH ₂), 1737 (C=O), 1695 (C=O), 1400-1200 (C-H)
DEI-MS:	m/z (rel. Int.): 498 [M ⁺] (6); 456 [M-C ₂ H ₂ O] ⁺ (6), 452 [M-HCOOH] ⁺ (49), 438 [M-CH ₃ COOH] ⁺ (19), 248 (64) [C ₁₆ H ₂₄ O ₂] ⁺ ; 235 (4), 219 (10), 203 [C ₁₅ H ₂₃] ⁺ (52), 189 (36), 133 (53), 119 (28), 43 [C ₃ H ₇] ⁺ (100)
$^1\text{H-NMR-Daten:}$	siehe Tabelle F.9; S.182
$^{13}\text{C-NMR-Daten:}$	siehe Tabelle F.9; S.182

DC: Rf- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239

HPLC: Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS6: 3- β O-Acetylpomolsäure

Summenformel: $C_{32}H_{50}O_5$

Aussehen: weiße Nadeln

Schmelzpunkt: 248°C

UV_{max} (CH₃CN/H₂O): $\lambda_{max} < 200$ nm

DEI-MS: *m/z* (rel. Int.): 468 [M-HCOOH]⁺, 454 [M-CH₃COOH]⁺ (11) 396 (11), 264 (4), 246 (12), 231 (11), 218 (18), 201 [C₁₅H₂₁]⁺ (43), 189 (32), 175 (28), 146 [C₁₁H₁₄]⁺ (95), 135 (42), 119 (44), 43 [C₃H₇]⁺ (100)

¹H-NMR-Daten: siehe Tabelle F.10; S.188

¹³C-NMR-Daten: siehe Tabelle F.10; S.188

DC: Rf- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239

HPLC: Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

TTS7: Pirolonsäure

Summenformel: $C_{30}H_{46}O_6$

Aussehen: weiße Nadeln

UV_{max} (CH₃CN/H₂O): $\lambda_{max} < 200$ nm

IR: ν [cm⁻¹] = 3567 (OH isoliert), 2926/ 2855 (CH₂), 1716 (C=O), 1686 (C=O), 1558-1521 (O-C-C-O)

LC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 443 [M-COOH]⁺ (6), 201 [C₁₅H₂₁]⁺ (29), 188 (15), 176 (33), 173 (34), 147 [C₁₁H₁₅]⁺ (100), 146 (83), 134 (59), 128 (41), 120 (48), 105 (89)

¹H-NMR-Daten: H-12: 5,29 ppm (t; 3,5 Hz); H-3: 3,99 ppm (s); H-18: 2,59 ppm (s); CH₂-27: 1,38 ppm (s); CH₃-29: 1,19 ppm (s); CH₃-23: 1,17 ppm (s);

CH₃-25: 0,93 ppm (s); CH₃-30: 0,91 ppm (d; 6,2 Hz); CH₃-24: 0,84 ppm (s); CH₃-26: 0,73 ppm (s)

DC: R_f- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239

HPLC: Retentionszeiten siehe Tabelle H.1, S.242

β-Sitosterol

Summenformel: C₂₉H₅₀O

GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 414 [M⁺] (5), 399 [M - CH₃]⁺ (2), 396 [M - H₂O]⁺ (3), 381 [M - CH₃ - H₂O]⁺ (3), 329 (7), 303 (6), 273 (5), 255 (7), 231 (6), 213 (13), 207 (18), 159 (17), 145 (26), 133 (21), 107 (34), 91 (36), 81 (40), 55 (60), 43 (100)

DC: R_f- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239

GC: 11,74 min (Methode **ST**, **GC2**), 19,61 min (Methode **I**; **GC3**)

Campesterol siehe oben

A1: Nonacosan-10-ol

Summenformel: C₂₉H₄₈O

Schmelzpunkt: 79 °C

Aussehen: farblose Kristalle

UV_{max} (CH₃CN/H₂O): λ_{max} < 180 nm; nicht DAD-detektierbar

IR: ν [cm⁻¹] = 3500-3300 (OH); 2950 / 2810 / 2763 / 2740 (C-H); 1457 (C-H); 1372 (C-H); 715 (C-H)

GC-EI-MS: *m/z* (rel. Int.): 424 [M⁺] (<1), 406 [M-H₂O]⁺ (8), 297 [M-C₉H₁₉]⁺ (18), 157 [M-C₁₉H₁₉]⁺ (27), 139 (9), 125 (13), 111 (26), 97 (60), 83 [C₆H₁₁]⁺ (100)

DC: R_f- Werte und Detektionsverhalten siehe Tabelle H.2, S.239

I Anhang

Wichtige Molekulargewichte von Substanzen, die im Rahmen der pharmakologischen Testungen benötigt wurden:

Substanz	Molekulargewicht
TRIS	121,14
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	136,1
EDTA	372,24
Mannitol	182,17
DDC (Natrium-Diethyldithiocarbamat)	225,31
Adrenalinbitartrat	333,3
reduziertes Glutathion (GSH)	307,34
Arachidonsäure	304
Hematin	633,49
Phenol	308,3
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	174,2
Indometacin	357,8
NS 398	314,4
Nimesulid	308,3
Rofecoxib	314,4
Valerylsalicylsäure	222,2
Acetylsalicylsäure	180,2

Sukzessive Extraktion: Einwaagen und Ausbeuten:

Droge	Einwaage in [g]	n-Hexan-Extraktion [g]	n-Hexan-Extraktion [%]	DCM-Extraktion [g]	DCM-Extraktion [%]	Methanolextraktion [g]	Methanolextraktion [%]
Achyranthis bidentatae radix	5,0589	0,0095	0,19	0,0042	0,08	0,9676	19,13
Aconiti kusnezoffii praeparata radix	5,051	0,0088	0,17	0,0065	0,13	0,0695	1,38
Acori graminei rhizoma	5,064	0,1148	2,27	0,0264	0,52	0,2699	5,33
Agrimoniae herba	5,0676	0,0964	1,9	0,0328	0,65	0,3502	6,91
Angelicae dahuricae radix	5,0375	0,0468	0,93	0,025	0,5	0,1931	3,83
Angelicae sinensis radix	5,0672	0,0749	1,48	0,0478	0,94	0,7455	14,71
Arctii fructus	5,0482	0,7924	15,7	0,558	11,05	0,5634	11,16
Artemisiae herba	5,0833	0,1134	2,23	0,0327	0,64	0,5308	10,44
Asari herba	5,0852	0,1821	3,58	0,218	0,43	0,3895	7,66
Atractylodis (lanceae) rhizoma	5,071	0,4172	8,23	0,0492	0,97	0,9577	18,89
Atractylodis macrocephalae rhizoma	5,0728	0,0938	1,85	0,0268	0,53	0,4933	9,72
Bupleuri radix	5,0482	0,0986	1,95	0,0876	1,74	0,5906	11,62
Cephalanoploris herba	5,0686	0,1422	2,81	0,0266	0,52	0,8447	16,67
Chaenomelis fructus	5,0075	0,021	0,42	0,0269	0,54	1,5123	30,2
Cimicifugae rhizoma	5,057	0	0	0,0195	0,39	0,6196	12,25
Cinnamomi ramulus	5,041	0,0413	0,82	0,0252	0,5	0,088	1,75
Clematidis radix	5,0719	0,0184	0,36	0,0326	0,64	0,6324	12,47
Cnidii fructus	5,0016	1,1872	23,74	0,0636	1,27	0,2093	4,18
Coptidis rhizoma	5,0998	0,0343	0,67	0,0278	0,55	1,2111	23,75
Cuscutae semen	4,9758	0,9684	19,46	0,0229	0,46	0,152	3,05
Cyperii rhizoma	5,0566	0,0917	1,81	0,0853	1,69	0,3115	6,16
Dictamni radices cortex	5,041	0,0618	1,21	0,0477	0,95	0,3935	7,81
Erythrinae cortex	5,0516	0,021	0,42	0,0033	0,07	0,2725	5,39
Eucommiae cortex	5,0526	0,3271	6,47	0,2703	5,35	0,7542	14,93
Evodiae fructus	5,0706	0,1388	2,74	0,1402	2,76	0,9466	18,67
Fraxini cortex	5,0717	0,0162	0,32	0,0053	0,1	0,4212	8,3

Gardeniae fructus	5,0759	0,4145	8,17	0,075	1,45	1,1001	21,67
Houttuyniae herba	4,9712	0,107	2,15	0,0274	0,55	0,3437	6,91
Indigo naturalis	5,0844	0,0135	0,27	0,0419	0,82	0,035	0,69
Isatidis folium	5,0153	0,0342	0,68	0,0126	0,25	0,297	5,92
Leonuri herba	5,0519	0,1005	1,99	0,0313	0,62	0,2141	4,24
Linderae radix	5,0316	0,0584	1,16	0,0873	1,74	0,5405	10,74
Lonicerae flos	5,0659	0,1573	3,11	0,0476	0,94	1,0232	20,2
Lophateri herba	5,0235	0,0565	1,12	0,0421	0,84	0,2977	5,93
Lycii radialis cortex	4,6992	0,013	0,28	0,0121	0,26	0,4605	9,8
Lysimachiae herba	5,0182	0,0768	1,53	0,0382	0,76	0,4148	8,27
Mori radialis cortex	5,0875	0,1153	2,27	0,1261	2,48	0,3474	6,83
Morindae officinalis radix	5,0358	0,009	0,18	0,0002	0,004	1,5204	30,19
Notopterygii rhizoma seu radix	5,0811	0,3337	6,57	0,505	9,94	1,0396	20,46
Perillae fructus	4,9419	2,2491	45,5	0,0231	0,47	0,2368	4,79
Peucedani radix	5,1414	4216	8,2	0,068	1,32	0,5625	10,94
Phellodendri cortex	5,0903	0,1645	3,23	0,1192	2,34	0,8734	17,16
Piperi sarmentosi fructus vgl. STÖHR, J., 1999	n.b.	-	n.b.	-	-	-	-
Platycodi radix	5,0799	0,0231	0,46	0,0062	0,12	0,7901	15,55
Puerariae radix	5,0167	0,0177	0,35	0,0107	0,21	0,5512	10,99
Rehmanniae radix	5,0997	0,0229	0,45	0,0093	0,18	2,52	49,41
Rubiae radix	5,0406	0,078	1,55	0,0396	0,79	0,7614	15,11
Salviae miltiorrhizae radix	5,0426	0,037	0,73	0,0106	0,21	0,2282	4,53
Schizonepetae herba	5,0109	0,0911	1,82	0,0121	0,24	0,096	1,92
Scrophulariae radix	5,0463	0,0144	0,29	0,0041	0,08	1,1925	23,63
Sophorae flavescentis radix	5,0784	0,0389	0,77	0,0333	0,66	1,0521	20,72
Taraxaci herba	5,0914	0,1334	2,62	0,0301	0,59	1,0295	20,22
Typhae pollen	5,0738	0,0421	0,83	0,0619	1,22	0,3569	7,03
Uncariae cum uncis ramulus	5,0583	0,0612	1,21	0,0335	0,66	0,5542	10,96
Violae herba	5,0606	0,0279	0,55	0,0258	0,51	0,2497	4,93

Xanthii fructus	5,2567	0,8736	16,62	0,0346	0,66	0,3053	5,81
Zanthoxyli pericarpium	5,061	0,3266	6,45	0,1897	3,75	0,7342	14,51
Zingiberis rhizoma	5,084	0,3001	5,9	0,0224	0,44	0,1966	3,87

Testergebnisse und Standardabweichungen des pharmakologischen Screenings der sukzessiv hergestellten Extrakte:

Droge	PGHS-1 Hex	PGHS-2 Hex	PGHS-1 DCM	PGHS-2 DCM	PGHS-1 MeOH	PGHS-2 MeOH
Achyranthis bidentatae radix	63,8 ± 5,8	68,9 ± 0,3	57,1 ± 22,3	48,3 ± 8,0	4,7 ± 8	4,5 ± 0,6
Aconiti kusnezoffii praeparata radix	53,5 ± 7,3	42,5 ± 6,9	48,1 ± 10,3	49,2 ± 8,7	63,1 ± 14,4	59,2 ± 3,5
Acori graminei rhizoma	8,8 ± 12,2	33,9 ± 13,5	48,3 ± 13	54,3 ± 10,5	-16,5 ± 3,9	22,2 ± 10,5
Agrimoniae herba	57 ± 8,8	3,2 ± 4,1	64,5 ± 9,8	63,5 ± 1,3	75,0 ± 4,8	67,3 ± 10,8
Angelicae dahuricae radix	52,5 ± 4,7	42,4 ± 2,7	0,1 ± 0,1	32,9 ± 2,3	-1,9 ± 6,7	24,9 ± 12
Angelicae sinensis radix	73,0 ± 6,8	61,5 ± 8,7	75,0 ± 8,1	47,3 ± 8,9	24,2 ± 7,4	36,6 ± 6,5
Arctii fructus	40,3 ± 14,6	44,7 ± 1	36,1 ± 8,4	35,9 ± 12	-3,5 ± 14,2	2,6 ± 14,7
Artemisiae herba	26,9 ± 16,4	32,4 ± 4,2	83,7 ± 1,9	65,3 ± 17,6	3,1 ± 11,5	29,8 ± 3
Asari herba	59,7 ± 4	61 ± 4,7	57,2 ± 13,1	46,3 ± 10,1	37,2 ± 8,7	49,4 ± 11,1
Atractylodis (lanceae) rhizoma	67,4 ± 5,6	68,3 ± 13,2	46,9 ± 6,6	42,6 ± 11,7	8,9 ± 4,9	10,9 ± 14,5
Atractylodis macrocephalae rhizoma	46,1 ± 12,8	48,9 ± 10,0	58,6 ± 10,4	39,8 ± 20,1	0,9 ± 1,3	6,1 ± 6,7
Bupleuri radix	57,5 ± 9,3	55,7 ± 9,8	5,4 ± 9,0	30,3 ± 1,2	-3,7 ± 5,3	14,3 ± 5,4
Cephanaloploris herba	12,2 ± 10,3	45,8 ± 4,0	13,9 ± 11,3	20,5 ± 10,1	40,1 ± 8,8	37,3 ± 6,9
Chaenomeles fructus	34,9 ± 6,7	64,9 ± 11,5	72,1 ± 3,4	60,6 ± 4,8	31,8 ± 10,1	36,8 ± 7,9
Cimicifugae rhizoma	40,3 ± 8,1	47 ± 11,7	22,8 ± 7,5	39,6 ± 12,3	19,0 ± 6,3	19,3 ± 8,3
Cinnamomi ramulus	46,6 ± 12,2	23,6 ± 10,1	73,5 ± 5,1	41,0 ± 13,5	59,1 ± 15,7	47,9 ± 8,4
Clematidis radix	68,2 ± 2,3	56,7 ± 10,3	66,3 ± 17,8	53,6 ± 13,1	-3,6 ± 6,9	4,9 ± 3,2
Cnidii fructus	19 ± 6,9	27,9 ± 3,7	68,4 ± 5,6	64,7 ± 8,3	52,9 ± 7	68,0 ± 4,4
Coptidis rhizoma	63,2 ± 5,7	58,8 ± 8,7	28,4 ± 13,7	44,3 ± 8,3	-1,1 ± 3,4	32,2 ± 13
Cuscutae semen	1,9 ± 6,7	28,2 ± 8,7	73,3 ± 11,6	62,8 ± 4,9	26,1 ± 10,8	37,1 ± 9,5
Cyperii rhizoma	11,6 ± 10,7	-3,2 ± 20,0	37,8 ± 2,4	11,7 ± 14,4	77,8 ± 7,8	62,4 ± 3,6
Dictamni radidis cortex	38,8 ± 10,9	45 ± 5,7	18,6 ± 19,9	21,4 ± 18,8	-17,3 ± 18,4	16,7 ± 11,5
Erythrinae cortex	31,8 ± 11,9	50,3 ± 4,2	66,8 ± 11,4	31,7 ± 9,4	83,7 ± 2,3	69,7 ± 10,6
Eucommiae cortex	5,3 ± 9	9,2 ± 14,2	2,8 ± 4,8	4,6 ± 7,9	21,9 ± 9,1	38,2 ± 15,9
Evodiae fructus	45,3 ± 11,7	27,6 ± 2,9	64,4 ± 5	58,2 ± 3,8	32,1 ± 15,2	51,5 ± 14,9

Fraxini cortex	57,7 ± 5,9	60,3 ± 14,9	20,3 ± 12,8	14,7 ± 17,1	0,4 ± 10,4	6,4 ± 5,3
Gardeniae fructus	29,4 ± 5,1	43,2 ± 4,6	58,7 ± 12,5	17,4 ± 1	14,1 ± 6,4	38,1 ± 6,9
Houttuyniae herba	50,3 ± 3,7	43,4 ± 14,9	46,8 ± 13,1	34,7 ± 21,1	59,2 ± 11,1	74,2 ± 11,2
Indigo naturalis	13,5 ± 10,0	17,8 ± 16,4	49 ± 11,4	47,3 ± 17,4	52,2 ± 11,2	73,6 ± 8,1
Isatidis folium	36,3 ± 7,8	42,9 ± 7,5	54,9 ± 7,4	66,4 ± 16,5	54,1 ± 12	71,0 ± 3,1
Leonuri herba	61,7 ± 7	72,9 ± 11,7	69,1 ± 6,1	37,8 ± 11,6	43,6 ± 16,2	72,9 ± 4,6
Linderae radix	4,4 ± 26,5	21 ± 11,5	56,0 ± 15,6	-4,8 ± 6,9	74,6 ± 11,7	57,6 ± 9,1
Lonicerae flos	35,0 ± 10,1	43,6 ± 5,8	83,0 ± 7,6	57,7 ± 12	5,5 ± 2,9	22,2 ± 8,7
Lophateri herba	8,5 ± 14,1	21,4 ± 1,2	3,6 ± 6,4	5,4 ± 8,1	30,5 ± 5,7	45,1 ± 6,7
Lycii radialis cortex	42,6 ± 8,5	54,3 ± 10,6	58,2 ± 13,4	37,8 ± 14,5	-5,6 ± 12	1,3 ± 2,8
Lysimachiae herba	18,9 ± 10,9	30,7 ± 9,2	65,7 ± 8,1	56,8 ± 14	21,9 ± 6,7	23,7 ± 7,5
Mori radialis cortex	47,8 ± 11	39,8 ± 1,4	87,0 ± 2,6	65,9 ± 2,6	79,2 ± 1,4	81,7 ± 4,3
Morindae officinalis radix	36,3 ± 6,2	40,9 ± 5,1	3,2 ± 14,9	7,4 ± 8,5	0,2 ± 15,1	4,3 ± 10,4
Notopterygii rhizoma seu radix	69,6 ± 2,8	64,9 ± 9,8	42,6 ± 3,6	-2,5 ± 3,3	-3,7 ± 9	-10,6 ± 9,2
Perillae fructus	70,2 ± 4,9	60,6 ± 11,8	65,0 ± 4,5	34,2 ± 7,2	8,7 ± 9,2	24,0 ± 13
Peucedani radix	67,7 ± 4,8	68,7 ± 2,2	61,2 ± 7,5	56,9 ± 5,8	3 ± 25,6	35,5 ± 5,6
Phellodendri cortex	59,6 ± 6,3	67,8 ± 4,4	9,2 ± 16	3,8 ± 5,5	1,6 ± 2,7	-1,8 ± 12,6
Piperi sarmentosi herba	52,4 ± 9,3	65,0 ± 12	47,2 ± 17,6	8,6 ± 5,7	6,1 ± 11,9	11,2 ± 11,5
Platycodi radix	55,1 ± 8,8	48,7 ± 3,4	77,8 ± 6,1	59,4 ± 7,5	-2 ± 15,1	6,5 ± 8,1
Puerariae radix	32,4 ± 8	33 ± 6,5	38,8 ± 7,4	49,8 ± 10,8	1,8 ± 13,2	24,9 ± 7,5
Rehmanniae radix	53 ± 17,2	64,1 ± 7,4	45,7 ± 13,9	48,5 ± 12,3	-16,3 ± 10,5	26,4 ± 8,9
Rubiae radix	21,9 ± 8,3	25,5 ± 3,1	27,3 ± 4,1	16,4 ± 19,2	12,3 ± 11	-10,5 ± 5,7
Salviae miltiorrhizae radix	72,7 ± 10,8	74,7 ± 11,8	77,7 ± 9,7	63,6 ± 9,8	24,1 ± 6,5	46,4 ± 7,8
Schizonepetae herba	14,8 ± 12,2	42,3 ± 15	58,0 ± 14,1	61,2 ± 6,1	42,7 ± 3,7	63,3 ± 11,5
Scrophulariae radix	76,3 ± 7,5	48 ± 2,8	83,0 ± 2,7	66,8 ± 7,1	34,6 ± 5,7	46,9 ± 8,2
Sophorae flavescens radix	69,4 ± 16,1	61,2 ± 12,7	76,2 ± 9,6	33,6 ± 8,8	2,8 ± 5,4	7,7 ± 3
Taraxaci herba	51,6 ± 2,9	78,5 ± 10,1	79,2 ± 5,5	51,3 ± 9,1	8,7 ± 7,1	35 ± 7
Typhae pollen	38,2 ± 1,5	41,6 ± 7,7	69,5 ± 14,3	57,9 ± 15,1	-1,6 ± 14,7	32,7 ± 9,6
Uncariae cum unciis ramulus	67,1 ± 9,9	66,7 ± 14,9	37,8 ± 3,5	42,1 ± 6,9	53,5 ± 9,7	9,4 ± 3,4
Violae herba	54,9 ± 4,2	54,3 ± 10,5	76,0 ± 10,4	62,4 ± 8,3	48,5 ± 10,2	70,7 ± 7,6
Xanthii fructus	31,2 ± 10,1	37,7 ± 3,7	55,6 ± 10,8	42,4 ± 33,7	-14 ± 12,2	10,2 ± 11,6
Zanthoxyl pericarpium	48,5 ± 4	24,9 ± 5,4	18,3 ± 16	26,5 ± 2,8	72,0 ± 2,4	42,5 ± 6,4
Zingiberis rhizoma	83,4 ± 2,8	77,5 ± 13	52,9 ± 12,3	35 ± 18,7	44,9 ± 9,7	37,1 ± 5,3

J Literatur

AIMI, N.; LIKHITWITAYAWUID, K.; GOTO, J.; PONGLUX, D.; HAGINIWA, J.; SAKAI, S.: Triterpenoidal constituents of *Uncaria florida* vidal. *Tetrahedron*, **45**, 4125-4134 (1989)

AL, M.D.M.; VAN HOUWELINGEN, C.; HORNSTRA, G.: Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy, and pregnancy outcome, *J. Am. Clin. Nutr.*, **71** (Suppl.), 285S-291S (2000)

ALANKO, J.; RIUTTA, A.; MUCHA, I.; VAPAATALO, H.; METSÄ-KETELÄ, T.: Modulation of arachidonic metabolism by phenols: relation to positions of hydroxyl groups and peroxy radical scavenging properties. *Free Radical Biol. & Med.*, **14**, 19-25 (1993)

AL-HAZIMI, H.M.G.; MANIA, G.A.; DEEP, M.S.H.: Terpenoids from *Salvia lanigera*. *Phytochem.*, **26**, 1091-1093 (1987)

AMMON, H.P.T.; SABIJERAJ, J. KAUL, R.: Kamille. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **22**, 1821-1828 (1996)

ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MCGARITY, K.L.; BREMER, M.E.; ISAKSON, P.C.; GREGORY, S.A.: Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin-6 in rat adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2672-2679 (1996)

ASANO, K.; LILLY, C.M.; DRAZEN, J.M.: Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **271**, L126-L131 (1996)

BARNETT, J.; CHOW, J.; IVES, D.; CHIOU, M.; MACKENZIE, R.; OSEN, E.; NGUYEN, B.; TSING, S.; BACH, C.; FREIRE, J.; CHAN, H.; SIGAL, E.; RAMESHA, C.: Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochem. Biophys. Acta*, **1209**, 130-139 (1994)

BAUER, R.: 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase as targets for medical plant research. in: *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development* (Hrsg.: Bohlin, L.; Bruhn, J.C.). Kluwer Academic Publisher (1999)

BAYARD, H. (Hrsg.): *Bäume der Welt*, Oxford-Enzyklopädie, DRW-Verlag, Stuttgart (1981)

- BELCH, J.J.F.; HILL, A.: Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (Suppl.), 352S-356S (2000)
- BELLUZZI, A.; BOSCHI, S.; BRIGNOLA, C.; MUNARINI, A.; CARIANI, G.; MIGLIO, F.: Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (Suppl.), 339S-342S (2000)
- BHATTACHARYYA, D.K.; LECOMTE, M.; DUNN, J.; MORGANS, D.J.; SMITH, W.L.: Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 19-24 (1995)
- BITTNER, S.B.; TUCKER, W.F.; CARTWRIGHT, I.; BLEEHEN, S.S.: A doubleblind, randomised, placebocontrolled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet*, **8582**, 378-380 (1988)
- BOLTEN, W.W.; LANG, B.; WAGNER, A.V.; KROBOT, K.J.: Konsequenzen und Kosten der NSA-Gastropathie in Deutschland. *Akt. Rheumatol.*, **24**, 127-134 (1999)
- BOULLATA, J.I.; NACE, A.M.: Safety issues with herbal medicine. *Pharmacotherapy*, **20**, 257-69 (2000)
- BOYCE, S.; CHAN, C.C.; GORDON, R.; LI, C.S.; RODGER, I.W.; WEBB, J.K.; RUPNIAK, N.M.J.; HILL, R.G.: L 745,337: a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 elicits antinociception but not gastric ulcerations in rats. *Neuropharmacol.*, **33**, 1609-1611 (1994)
- BREDER, C.D.; DEWITT, D.; KRAIG, R.P.: Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **355**, 296-315 (1995)
- BREYER, M.D.: COX2 selective NSAIDs and renal function: gain without pain? *Kidney Int.*, **55**, 738-739 (1999)
- BRIAN, J.E.; MOORE, S.A.; FARACI, F.M.: Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. *Stroke*, **29**, 2600-2606 (1998)
- BRIESKORN, C.H.; SÜSS, H.P.: Triterpenoide der Birnen- und Apfelschale. *Arch. Pharm.*, **307**, 949-961 (1974)
- BRIESKORN, C.H.; WUNDERER, H.: Pomol- und Pomonsäure. *Chem. Ber.*, **100**, 1252-1265 (1967)
- BROACH, J.R.; THORNER, J.: High-throughput screening for drug discovery. *Nature*, **384**, (Suppl.), 14-16 (1996)
- BROCK, T.G.; MCNISH, R.W.; PETERS-GOLDEN, M.: Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E₂. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11660-11666 (1999)
- BROWN, M.: Do vitamin E and fish oil protect against ischaemic heart disease? *Lancet*, **354**, 441-442 (1999)

- BRUNE, K.; HINZ, B.: COX-1 und COX-2: Funktion und pharmakologische Beeinflussung. *Pharm. unserer Zeit*, **28**, 1, 21-29 (1999)
- BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C.: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3688-3699 (1963)
- BUT, P.P.H.; HU, S.Y.; KONG, Y.C.: Vascular plants used in Chinese medicine. *Fitoterapia*, **3**, 245-264 (1980)
- CANNON, G.W.; CALDWELL, J.R.; HOLT, P.; MCLEAN, B.; SEIDENBERG, B.; BOLOGNESE, J.; EHRICH, E.; MUKHOPADHYAY, S.; DANIELS, B., for the Rofecoxib phase III protocol 035 study group: Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium. *Arth. Rheum.*, **43**, 978-987 (2000)
- CAPDEVILA, J.H., MORROW, J.D.; BELOSLUDTSEV, Y.Y.; BEAUCHAMP, D.R.; DUBOIS, R.N.; FALCK, J.R.: The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H₂ synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s). *Biochem.*, **34**, 3325-3337 (1995)
- CHANG, H.M.; BUT, P.P.H. (Hrsg.): Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica, Vol. 2, World Scientific Publishing, Singapore (1987)
- CHARETTE, L.; MISQUITTA, C.; GUAY, J.; RIENDEAU, D.; JONES, T.R.: Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 1561-1567 (1995)
- CHEN, D. (Hrsg.): Zhongguo Zhongyaocai Zhenwei Jianbie Tudian, Vol. 3, Guangdong Science & Technical Publisher, Guangzhou (1997)
- CHEN, W.; PAWELEK, T.R.; KULMACZ, R.J.: Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and-2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20301-20306 (1999)
- CHRUBASIK, S.; EISENBERG, E.; BALAN, E.; WEINBERGER, T.; LUZZATI, R.; CONRADT, C.: Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am. J. Med.*, **109**, 9-14 (2000)
- CHURCHILL, L.; GRAHAM, A.G.; SHIH, C.K.; PAULETTI, D.; FARINA, P.R.; GROB, P.M.: Selective inhibition of human cyclooxygenase -2 by meloxicam. *Inflammopharmacology*, **4**, 125-135 (1996)
- CLEMETT, D.; GOA, K.L.: Celecoxib: eine Übersicht über den Einsatz bei Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis und akuten Schmerzzuständen. *Drugs*, **59**, 957-980 (2000)

- COLQUHOUN, A., DEMELLO, F.E.P., CURI, R.: Regulation of tumor cell fatty acid oxidation by n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **44**, 143-150 (1998)
- COPELAND, R.A.; WILLIAMS, J.M.; GIANNARAS, J.; NURNBERG, S.; COVINGTON, M.; PINTO, D.; PICK, S.; TRZANKOS, J.M.: Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11202-11206 (1994)
- CRAKER, L.E.; SIMON, J.E. (Hrsg.): Herbs, spices, and medicinal plants, recent advances in botany, horticulture, and pharmacology. Vol. 4, Food Products Press (Haworth Press Inc.), New York London (1989)
- CRÉMINON, C.; HABIB, A.; MACLOUF, J.; PRADELLES, P.; GRASSI, J.; FROBERT, Y.: Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassay. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1254**, 341-348 (1995)
- CROFFORD, L.J.: COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.*, **24**, (Suppl.), 49 (1997)
- CROFFORD, L.J.; LIPSKY, P.E.; BROOKS, P.; ABRAMSON, S.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.A.: Basis biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arth. Rheum.*, **43**, 4-13 (2000)
- CROMLISH, W.A.; KENNEDY, B.P.: Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1777-1785 (1996)
- CROXTALL, J.D.; NEWMAN, S.P.; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R.J.: The concerted regulation of cPLA 2, COX 2 and lipocortin 1 expression by IL-1 β in A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **220**, 491-495 (1996)
- CULLEN, L.; KELLY, L.; CONNOR, S.O.; FITZGERALD, D.J.: Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 578-582 (1998)
- CURTIS, C.L.; HUGHES, C.E.; FLANNERY, C.R.; LITTLE, C.B.; HARWOOD, J.L.; CATERSON, B.: n-3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 721-724 (2000)
- CYONG, J.; OTSUKA, Y.: A pharmacological study of the anti-inflammatory activity of chinese herbs. *Int. J. Acupunct. Electro-Ther. Res.*, **7**, 173-202 (1982)
- DANERT, S.†; HANELT, P.; HELM, I.; KRUSE, I.; LEHMANN, C.O.; SCHULTZEMOTEL, J. et al.: Urania Pflanzenreich, Höhere Pflanzen I, Urania-Verlag, Leipzig-Jena-Berlin (1971)

- DANNHARDT, G.; HAHN, L.: COX-2 Inhibitoren: aktueller Stand und Ausblick. *Pharmazie in unserer Zeit*, **29**, 100-106 (2000)
- DANZ, H., STOYANOVA, S.; HAMBURGER, M.; BRATTSTRÖM, A.: Determination of the antiinflammatory potential of *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae). Int. Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medical Plant Research (GA), 6th International Congress on Ethnopharmacology of the International Society for Ethnopharmacology (ISE), SL 20, Zürich, August 2000
- DEGNER, F.; TÜRCK, D.; PAIRET, M.: Meloxicam: pharmacological, pharmacokinetic and clinical profil. *Drugs of Today*, **34**, (Suppl.) (1998)
- DELGADO, G.; HERNÁNDEZ, J.; PEREDA-MIRANDA, R.: Triterpenoid acid from *Cunila lythrifolia*. *Phytochem.*, **28**, 1483-1485 (1989)
- DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISAAC, O.: The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta med.*, **60**, 516-520 (1994)
- DEQUEKER, J.; HAWKEY, C., KAHAN, A.; STEINBRÜCK, K.; ALEGRE, C.; BAUMELOU, E.; BÉGAUD, B.; ISOMÄKI, H.; LITTLEJOHN, G.; MAU, J.; PAPAZOGLU, S. ON BEHALF OF THE SELECT-STUDY GROUP: Improvement in gastrointestinal tolerability of selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor, meloxicam, compared with piroxicam: results of the safety and efficacy large-scale evaluation of COX-inhibiting therapies (SELECT) trial in Osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.*, **37**, 946-951 (1998)
- Deutsches Arzneibuch 1996 (Amtliche Ausgabe), Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart; Govi-Verlag GmbH, Frankfurt a.M./ Eschborn (1996)
- DINCHUK, J.E.; CAR, B.D.; FOCHT, R.J.; JOHNSTON, J.J.; JAFFEE, B.D.; COVINGTON, M.B.; CONTEL, N.R.; ENG, V.M.; COLLINS, R.J.; CZERNIAK, P.M.; GORRY, S.A.; TRZASKOS, J.M.: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, **378**, 406-409 (1995)
- EBERHARDT, M.V.; LEE, C.Y.; LIU, R.H.: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, **405**, 903-904 (2000)
- ELING, T.E.; CURTIS, J.F.: Xenobiotic metabolism by prostaglandin H synthase. *Pharm. Ther.*, **53**, 261-273 (1992)
- ELING, T.; TAINER, B.; ALLY, A.; WARNOCK, R.: Separation of arachidonic acid metabolites by high-pressure liquid chromatography. In LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, Acad. Press., New York, (1982)

- ELING, T.E.; THOMPSON, D.C.; FOUREMAN, G.L.; CURTIS, J.F.; HUGHES, M.F.: Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 1-45 (1990)
- ENGELHARDT, G.; BÖGEL, R.; SCHNITZER, C.; UTZMANN, R.: Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 21-28 (1996)
- ESKRA, J.D.; PEREIRA, M.J.; ERNEST, M.J.: Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase products. *Anal. Biochem.*, **154**, 332-337 (1986)
- FALES, H.M.; JAOUNI, T.M.; BABASHAK, J.F.: Simple device for preparing ethereal diazomethane without resorting to codistillation. *Anal. Chem.*, **45**, 2302-2303 (1973)
- FERRETTI, A.; FLANAGAN, V.P.; REEVES, V.B.: Stable isotope dilution assay for prostaglandine E metabolite: 24 hour urinary output in healthy male subjects. *Biochem.*, **167**, 174-180 (1987)
- FIEBICH, B., KAMMERER, N.: Antiinflammatory effects of Harpagophytum lysates. *Phytomed.*, **7**, (Suppl. II, 40), SL-79 (2000)
- FINDLAY, J.B.C.; EVANS, W.H. (Hrsg.): Biological membranes, a practical approach. Oxford University Press, London (1990)
- FISCHER, S.M.: Prostaglandin and cancer. *Frontiers in Bioscience*, **2**, 482-500 (1997)
- FITZ-GERALD, G.A.; LAWSON, J.; BLAIR, I.A.; BRASH, A.R.: Analysis of urinary metabolites of thromboxane and prostacyclin by negative-ion-chemical-ionization gas chromatography/ mass spectrometry. *Adv. Prost. Thromb. Leukotriene. Res.*, **15**, 87-93 (1985)
- FLETCHER, B.S.; KUBUJU, D.A.; PERRIN, D.M.; HERSCHMAN, H.R.: Structure of the mitogen-inducible TIS 10 gene and demonstration that the TIS 10-encoded protein is a functional prostaglandin-G/H-synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4338-4344 (1992)
- FLOWER, R.J.; CHEUNG, H.S.; CUSHMAN, D.W.: Quantitative determination of prostaglandins and malondialdehyde formed by arachidonate oxygenase (prostaglandin synthase) system of bovine seminal vesicles. *Prostaglandins*, **4**, 325-341 (1973)
- FLOWER, R.J.; VANE, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature New Biol.*, **240**, 410-411 (1972)
- FRIES, J.F. (Edt.): Selective cyclooxygenase inhibition: promise for future NSAID therapy? *Scand. J. Rheumatol.*, **25**, (Suppl. 102), 1-37 (1996)
- FRIESEN, R.W.; BRIDEAU, C.; CHAN, C.C.; CHARLESON, S.; DESCHENES, D.; DUBE, D.; ETHIER, D.; FORTIN, R.; GAUTHIER, J.Y.; GIRARD, Y.; GORDON, R.; GREIG, G.M.; RIENDEAU, D.; SAVOIE, C.; WANG, Z.; WONG, E.; VISCO, D.; XU, L.J.;

- YOUNG, R.N.: 2-Pyridinyl-3-(4-methylsulfonyl)phenylpyridines: selective and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2777-2782 (1998)
- FRÖLICH, J.: A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *TiPS*, **18**, 30-34 (1997)
- FRÖLICH, J.C.; ROSENKRANZ, B.; FEJES-TÓTH, G.; NARAY-FEJES-TÓTH, FRÖLICH, B.: Analysis of prostanoid metabolites by gas chromatography / mass spectrometry. *Adv. Prost. Thromb. Leukotriene. Res.*, **15**, 47-51 (1985)
- FROHNE, D.; JENSEN, U.: Systematik des Pflanzenreichs. 5. Aufl., Wiss. Verl. Ges. Stuttgart (1998)
- FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P.: The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.*, **256**, 16737-16740 (1990)
- FUTAKI, N.; TAKAHASHI, S.; YOKOYAMA, M.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; OTOMO, S.: NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins*, **47**, 55-59 (1994)
- GASPARD, S.; CHOTTARD, G.; MAHY, J.-P.; MANSUY, D.: Study of the coordination chemistry of prostaglandin G/H synthase by resonance raman spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 529-537 (1996)
- GARAVITO, R.M.: Die Acetylsalicylsäure, *Spektrum der Wissenschaft*, **10**, 124, (1999)
- GEISSLINGER, G.: COX-2 Hemmer: keiner Ulzera, aber verzögerte Wundheilung, *Pharm. Ztg.*, **144**, 1944 (1999)
- GENG, J.; HUANG, W.; REN, T.; MA, X.: Klassische und bewährte Rezepturen der Chinesischen Arzneimitteltherapie. Band 3. Praxis der Chinesischen Arzneimitteltherapie, Verlag für Traditionelle Chinesische Arzneimitteltherapie Dr. Erich Wühr, Kötzing/ Bayer. Wald (1994)
- GIERSE, J.K.; HAUSER, S.D.; CREELY, D.P.; KOBOLDT, C.M.; RANGWALA, S.H.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K.: Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.*, **305**, 479-484 (1995)
- GIERSE, J.K.; MCDONALD, J.J.; HAUSER, S.D.; RANGWALA, S.H.; KOBOLDT, C.M.; SEIBERT, K.: A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **26**, 15810-15814 (1996)

- GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLIS, D.; CHIVERS, J.; PAUL-CLARK, M.J.; WILLOUGHBY, D.A.: Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Med.*; **5**, 698-701 (1999)
- GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico): Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet*, **354**, 447-455 (1999)
- GIULIANO, F.; WARNER, T.D.: Ex vivo assay to determine the cyclooxygenase selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1824-1830 (1999)
- GORECKI, P.: Platycodon in Hagers Handbuch (Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G. (Hrsg.)), Band V, 5.Aufl., Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1992)
- GRANSTRÖM, E.; KINDAHL, H.: A critical approach to eicosanoid assay. *Adv. Prost. Thromb. Leukotr. Res.*, **21**, 295-302 (1990)
- GRUNERT, E.; ARBEITER, K. (Hrsg.): Richter, J.; Götze, R.: Tiergeburtshilfe, 4. Aufl., Paul Parey Verlag, Berlin-Hamburg (1993)
- GRYGLEWSKI, R.J.: Screening for inhibitors of prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Adv. Lipid Res.*, **16**, 327-343 (1978)
- GUANG-YI, L.; GRAY, A.; WATERMAN, P.G.: Pentacyclic triterpenes from fruits of *Rosa sterilis*. *J. Nat. Prod.*, **52**, 162-166 (1989)
- GUO, Q.; WANG, L-H.; RUAN, K-H.; KULMACZ, R.J.: Role of val⁵⁰⁹ in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19134-19139 (1996)
- GOU, X.; ZHANG, L.; QUAN, S.; HONG, Y.; SUN, L.; LIU, M.: Isolation and identification of triterpenoid compounds in fruit of *Chaenomeles lagenaria* (Loisel.) Koidz.. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **23**, 546-547 (1998)
- HALSALL, T.G.; ALPIN, R.T.: A pattern of development in the chemistry of pentacyclic triterpenes. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **22**, 153-202 (1964)
- HARRIS, R.C.; MCKANNA, J.A.; AKAI, Y.; JACOBSON, H.R.; DUBOIS, R.N.; BREYER, M.D.: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.*, **94**, 2504-2510 (1994)
- HAWKEY, C.J.: COX-2 inhibitors. *Lancet*, **353**, 307-314 (1999)
- HAWKEY, C.J.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs gastropathy. *Gastroenterology*, **119**, 521-535 (2000)

- HAWKEY, C.; KAHAN, A.; STEINBRÜCK, K.; ALAGRE, C.; BAUMELOU, E.; BÉGAUD, B.; DEQUEKER, J.; ISOMÄKI, H.; LITTLEJOHN, G.; MAU, J.; PAPAZOGLU AND THE INTERNATIONAL *MELISSA* STUDY GROUP: Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. *Br. J. Rheumatol.*, **37**, 937-945 (1998)
- HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 6, Birkhäuser Verlag Basel & Stuttgart (1973)
- HEINZL, S.: COX-2 Hemmer (Pharmakologie aktuell). *Med. Mo. Pharm.*, **10**, 298-304 (1999)
- HENKEL, T.; BRUNNE, R.M.; MÜLLER, H.; REICHEL, F.: Statistical investigation into the structure complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 643-647 (1999)
- HERSCHMAN, H.R.: Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 125-140 (1996)
- HERSCHMAN, H.R.; XIE, W.; REDDY, S.: Inflammation, reproduction, cancer and all that: The regulation and role of the inducible prostaglandin synthase. *BioEssays*, **17**, 1031-1037 (1995)
- HINZ, B.; BRUNE, K.: COX-1 und COX-2: Funktionen und pharmakologische Beeinflussung. *Pharm. unserer Zeit*, **28**, 21-29 (1999)
- HLA, T.; NEILSON, K.: Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7384-7388 (1992)
- HOGAN, J.C.: Directed combinatorial chemistry, *Nature*, **384**, (Suppl.), 17-19 (1996)
- HUANG, K.C.: The pharmacology of chinese herbs. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo (1993)
- HUANG, M.T.; HO, C.T.; WANG, Z.Y.; FERRARO, T. LOU, Y.R.; STAUBER, K.; MA, W.; GEORGIADIS, C.; LASKIN, J.D.; CONNEY, A.H.: Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.*, **54**, 701-708 (1994)
- HUBBARD, H.L.; ELLER, T.D.; MAIS, D.E.; HALUSHKA, P.V.; BAKER, R.H.; BLAIR, I.A.; VRBANAC, J.J.; KNAPP, D.R.: Extraction of thromboxane B₂ from urine using an immobilized antibody column for subsequent analysis by gaschromatography-mass spectrometry. *Prostaglandins*, **33**, 149-160 (1987)
- HUFF, R.; COLLINS, P.; KRAMER, S.; SEIBERT, K.; KOBOLDT, C.; GREGORY, S.; ISAKSON, P.: A structural feature of N-[2-(cyclohexenyloxy)-4-nitrophenyl]

methanesulfonamide (NS-398) that governs its selectivity and affinity for cyclooxygenase 2 (COX-2), *Inflamm. Res.*, (Suppl.) **2**, S145-S146 (1995)

HULL, M.A.; THOMSON, J.L.; HAWKEY, C.J.: Expression of cyclooxygenase 1 and 2 by gastric endothelial cells. *Gut*, **45**, 529-536 (1999)

HUSS, U.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; VASÄNGE, M.; KARLSSON, R.; BOHLIN, L.: Search for selective COX-2 inhibitors of natural origin. Abstract **507**, Joint Meeting of: ASP, AFERP, GA, PSE, Amsterdam (1999)

ISHII, H.; TORI, K.; TOZYO, T.; YOSHIMURA, Y.: Structures of prosapogenins from roots of *Platycodon grandiflorum* determined by Carbon-13 and hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 671-673 (1978a)

ISHII, H.; TORI, K.; TOZYO, T.; YOSHIMURA, Y.: Structures of Platycodin-D₃, Platyconic acid-A, and their derivatives, saponins isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle, determined by carbon-13 NMR spectroscopy. *Chem. Lett.*, 719-722 (1978b)

IVORRA, M.D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A.: Hypoglycemic and insulin release effects of tormentic acid: a new hypoglycemic natural product. *Planta Med.*, **54**, 282-285 (1988)

JAKOBSSON, P.-J.; THORÉN, S.; MORGENSTERN, R.; SAMUELSSON, B.: Identification of human prostaglandin H synthase: a microsomal glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7220-7225 (1999)

JAMES, M.J.; GIBSON, R.; CLELAND, L.G.: Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71** (Suppl.), 343S-348S (2000)

JOHNSON, J.L.; WIMSATT, J.; BUCKEL, S.D.; DYER, R.D.; MADDIPATI, K.R.: Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**, 26-34 (1995)

JUNGMAYR, P.: Fischöl schützt vor Herzinfarkt und Rheuma. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **139**, 2298-2300 (1999)

KAKUNO, T.; YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S.: Triterpene saponins from fruit of *Ilex crenata*. *Phytochem.*, **31**, 2809-2812 (1992)

KALGUTKAR, A.S.; CREWS, B.C.; ROWLINSON, S.W.; GARNER, C.; SEIBERT, K.; MARNETT, L.J.: Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science*, **280**, 1268-1270 (1998)

KARLINER, J.; DJERASSI, C.: Terpenoids. LVII. Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. *J. Org. Chem.*, **31**, 1945-1956 (1966)

- KARMALI, R.A.: Prostaglandins and cancer. *Prostaglandins*, **5**, 11-28 (1980)
- KASHIWADA, Y.; WANG, H-K.; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C-Q; YEH, E.; LEE, K-H.: Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1090-1095 (1998)
- KATORI, M.; MAJIMA, M.; HARADA, Y.: Possible background mechanism of the effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), S107-S111 (1998)
- KAWAI, S.: Cyclooxygenase selectivity and the risk of gastrointestinal complications of various non-steroidal anti-inflammatory drugs: a clinical consideration. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), S102-S106 (1998)
- KAWAI, S.; NISHIDA, S.; KATO, M.; FURUMAYA, Y.; OKAMOTO, R.; KOSHINO, T.; MIZUSHIMA, Y.: Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells. *Eur. J. Pharm.*, **347**, 87-94 (1998)
- KIM, K.S.; EZAKI, O.; IKEMOTO, S.; ITAKURA, H.: Effects of Platycodon grandiflorum feeding on serum and liver lipid concentration in rats with diet induced hyperlipidemia. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **41**, 485-491 (1995)
- KIUCHI, F.; SHIBUYA, M.; SANKAWA, U.: Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 754-757 (1982)
- KLETTER, C.: Chaenomeles in Hagers Handbuch (Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G. (Hrsg.)), Band IV, 5.Aufl., Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1992)
- KOCH, K.: Internationaler Prävalenz-Vergleich: ein Weltatlas der Allergien. *Dt. Ärztebl.*, **95**, 935-936 (1998)
- KOJIMA, H.; OGURA, H.: Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursene-type triterpenes by NMR spectroscopy. *Phytochem.*, **28**, 1703-1710 (1989)
- KOMHOFF, M.; KLEIN, T.; SEYBERTH, H.W.; NÜSING, R.M.: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am. J. Physiol.*, **272**, F460-F468 (1997)
- KOUROUNAKIS, P.N.; TSIAKITZIS, K.; KOUROUNAKIS, A.P.; GALANAKIS, D.: Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology*, **144**, 205-210 (2000)

- KRAEMER, S.A.; MEADE, S.A.; DEWITT, D.L.: Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: Identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.*, **293**, 391-400 (1992)
- KREISELMEYER, B.: Fettsäurequalität und Belastbarkeit im Sport. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **139**, 4466-4467 (1999)
- KRÜSSMANN, G.: Handbuch der Laubgehölze, Band I, Paul Parey, Berlin-Hamburg (1960)
- KULMACZ, R.J.; PENDLETON, R.B.; LANDS, W.E.M.: Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5527-5536 (1994)
- KURUMBAIL, R.G.; STEVENS, A.M.; GIERSE, J.K.; MCDONALD, J.J.; STEGEMAN, R.A.; PAK, J.Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J.M.; PENNING, T.D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.; STALLINGS, W.C.: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **19**, 644-648 (1996)
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- LANEUVILLE, O.; BREUER, D.K.; DEWITT, D.L.; HLA, T.; FUNK, C.D.; SMITH, W.L.: Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **271**, 927-934 (1994)
- LANEUVILLE, O.; BREUER, D.K.; XU, N.; HUANG, Z.H.; GAGE, D.A.; WATSON, J.T.; LAGARDE, M.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L.: Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19330-19336 (1995)
- LANDS, W.E.M.; LE TELLIER P.R.; ROME, L.H. VANDERHOEK, J.H.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Adv. Biosci.*, **9**, 15-27 (1973)
- LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, Acad. Press., New York, (1982)
- LANGENBACH, R.; LOFTIN, C.; LEE, C., TIANO, H.: Cyclooxygenase knockout mice: Models of elucidating isoform-specific functions. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1237-1246 (1999)
- LARSEN, L.W.; HØRVIK, K.; SØRENSEN, H.I.N.; BREMER, I.: Polyunsaturated thia- and oxa fatty acids: incorporation into cell- lipids and their effects on arachidonic acid and eicosanoid synthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **1348**, 346-354 (1997)
- LAUFER, S.; ZECHMEISTER, P.; KLEIN, T.: Development of an in-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflamm. Res.*, **48**, 133-138 (1999)
- LAUTENBACHER, L.M.: Schwarzkümmelöl. *Pharm. Apoth. Ztg.*, **137**, 4602-4603 (1997)

- LEE, E-B.; KIM, S-Y.; KANG, S-S.: The anti-inflammatory components from the root of *Platycodon grandiflorum*. Abstract **273**, Joint meeting of: ASP, AFERP, GA, PSE in Amsterdam, July (1999)
- LEE, S-H.; KANG, S-H.; PARK, J.S.; CHUNG, S.R.; MIN K.R.; KIM, Y.: α -Viniferin: a prostaglandin H₂ synthase inhibitor from root of *Carex humilis*. *Planta Med.*, **64**, 204-207 (1998)
- LEHMANN, W.D.; METZGER, K.; STEPHAN, M.; WITTIG, U.; ZALÁN, I.; HABENICHT, A.J.R.; FÜRSTENBERGER, G.: Quantitative lipoxygenase product profiling by gas chromatography negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **224**, 227-234 (1995)
- LI, C-S.; BLACK, W.C.; CHAN, C-C.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; GAUTHIER, J.Y.; GORDON, R.; GUAY, D.; KARGMAN, S.; LAU, C.K.; MANCINI, J.; OUMET, N.; ROY, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; YOUNG, R.N.; ZAMBONI, R.; PRASIT, P.: Cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and pharmacological activities of 5-methanesulfonamido-1-indanone derivatives. *J. Med. Chem.*, **38**, 4897-4905 (1995)
- LI, J.J.; ANDERSON, G.D.; BURTON, E.G.; COGBURN, J.N.; COLLINS, J.T.; GARLAND, D.J.; GREGOR, Y.S.A.; HUANG, H.C.; ISAKSON, P.C.; KOBOLDT, C.M.; LOGUSCH, E.W.; NORTON, M.B.; PERKINS, W.E.; REINHARD, E.J.; SEIBERT, K.; VEENHUIZEN, A.W.; ZHANG, Y.; REITZ, D.B.: 1,2-Diarylcyclopentenes as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and orally active anti-inflammatory agents. *J. Med. Chem.*, **38**, 4570-4578 (1995)
- LI, Y.; SMITH, T.; GRABSKI, S.; DEWITT, D.L.: The membrane association sequences of the prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 isozymes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29830-29837 (1998)
- LIANG, C.Y.; HUANG, Y.T.; TSAI, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y.; CHEN, C.F.; LIN, J.K.: Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, **20**, 1945-1952 (1999)
- LIANG, Z.Z.; AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.: Polyhydroxylated triterpenes from *Eriobotrya japonica*. *Planta Med.*, **56**, 330-332 (1990)
- LIPSKY, P.E.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.J.; DUBOIS, R.N.; SIMON, L.; VAN DE PUTTE, L.B.A.: The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J. Rheumatol.*, **25**, 2298-2303 (1998)
- LIU, J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharm.*, **49**, 57-68 (1995)

- LIU, J.H.; ZSCHOCKE, S.; REININGER, E.; BAUER, R.: Inhibitory effects of *Angelica pubescens* f. *biserata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Planta Med.*, **64**, 525-529 (1998a)
- LIU, J.H.; ZSCHOCKE, S.; REININGER, E.; BAUER, R.: Comparison of radix *Angelicae pubescentis* and substitutes-constituents and inhibitory effect on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Pharm. Biol.*, **36**, 207-216 (1998b)
- LOLL, P.J.; PICOT, D.; GARAVITO, M.: The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin-H₂-synthase. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 637-643 (1995)
- LOLL, P.J.; PICOT, D.; EKABO, O.; GARAVITO, R.M.: Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin-H₂-synthase cyclooxygenase active site. *Biochem.*, **35**, 7330-7340 (1996)
- LUCAS, A.; MORLEY, R.; COLE, T.J.; LISTER, G.; LEESON-PAYNE, C.: Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet*, **339**, 261-264 (1992)
- MACCHIA, L.; DIPAOLA, R.; GUERRESE, M.C.; CHIECHI, L.M.; TURSI, A.; CAIAFFA, M.F.; HAEGGSTROM, J.Z.: Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2 in human placenta at term. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 496-501 (1997)
- MACLOUF, J.; RIGAUD, M.: Open tubular glass capillary gas chromatography for separating eicosanoids. In: LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, Acad. Press., New York (1982)
- MANCINI, J.A.; RIENDEAU, D.; FALGUEYRET, J.P.; VICKERS, P.J.; O'NEILL, G.P.: Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29372-29377 (1995)
- MÁÑES, S.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; RÍOS, J-L.: Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, **334**, 103-105 (1997)
- MANTRI, P.; WITIAK, D.T.: Inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Curr. Med. Chem.*, **1**, 328-355 (1994)
- MARGALIT, A.; HAUSER, S.D.; ZWEIFEL, B.S.; ANDERSON, M.A.; ISAKSON, P.C.: Regulation of prostaglandin biosynthesis in vivo by glutathione. *Am. J. Physiol.*, **274**, R294-302 (1998)
- MARKEY, C.M.; ALWARD, A.; WELLER, P.E.; MARNETT, L.J.: Quantitative studies of hydroperoxide reduction by prostaglandin-H-synthase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6266-6279 (1987)

- MARNETT, L.J.; KALGUTKAR, A.S.: Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *TiPS*, **20**, 465-469 (1999)
- MARTIN, M.; NEUMANN, D.; HOFF, T.; RESCH, K.; DEWITT, D.L.; GOPPEL-STRUEBE, M.: Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int.*, **45**, 150-158 (1994)
- MARTIN, R.M.; BISWAS, P.; MANN, R.D.: Inzidenz von unerwünschten Ereignissen und Risikofaktoren für Störungen im Gastrointestinaltrakt im Zusammenhang mit Meloxicam bei 19.087 Patienten in Allgemeinpraxen in England: eine Kohortenstudie. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **50**, 35-42 (2000)
- MASCOLO, N.; PINTO, A.; CAPASSO, J.: Flavonoids, leucocyte migration and eicosanoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 293-295 (1988)
- MEADE, E.A.; SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.: Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by Aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6610-6614 (1993)
- METZ, G.: PZ-Serie Phytamine: nicht nur würzig, sondern ausgesprochen gesund (Diketone). *Pharm. Ztg.*, **19**, 1512-1516 (2000)
- MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R.: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11693-11697 (1994)
- MITCHELL, J.A.; EVANS, T.W.: Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), 88-92 (1998)
- MITCHELL, J.A.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T.J.: Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1535-1542 (1995)
- MITCHELL, J.A.; SAUNDERS, M.; BARNES, P.J.; NEWTON, R.; BELVISI, M.G.: Sodium salicylate inhibits cyclooxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor κ B) activation- role of arachidonic acid. *Mol. Pharmacol.*, **51**, 907-912 (1997)
- MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.: Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1121-1132 (1999)
- MIYAMOTO, T.; OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O.: Purification of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629-2636 (1976)
- MIZUNO, K.; YAMAMOTO, S.; LANDS, W.E.M.: Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxydase activities. *Prostaglandins*, **23**, 743-757 (1982)

- MOONEN, P.; BUYTENHEK, M.; NUTGEREN, D.H.: Purification of PGH-PGE isomerase from sheep vesicular glands. In: LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, 85-91, Acad. Press., New York (1982)
- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M.R.; OTTO, I.C.; HORI, T.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L.: Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide-H-synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10902-10908 (1995)
- MERFORT, I.: Lipophile Inhaltsstoffe der Blätter und Früchte von *Symphoricarpus alba* (L.) Blake. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1980)
- NISHIMURA, K.; FUKUDA, T.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; CHEN, X-M.: Activity-guided isolation of triterpenoid acyl CoA cholesteryl acyl transferase (ACAT) inhibitors from *Ilex kudincha*. *J.Nat. Prod.*, **62**, 1061-1064 (1999)
- NISHINO, H.; NISHINO, A.; TAKAYASU, J.; HASEGAWA, T.; IWASHIMA, A.; HIRABAYASHI, K.; IWATA, S.; SHIBATA, S.: Inhibition of the tumorpromoting action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate by some oleanane-type triterpenoid compounds. *Cancer Res.*, **48**, 5210-5215 (1988)
- NOBLE, S.; BALFOUR, J.A.: Meloxicam. *Drugs*, **51**, 424-430 (1996)
- NOREEN, Y.; RINGBOM, T.; PERERA, P.; DANIELSON, H.; BOHLIN, L.: Development of a Radiochemical Cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, **61**, 2-7 (1998)
- NOREEN, Y.; SERRANO, G.; PERERA, P. BOHLIN, L.: Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Med.*, **64**, 520-524 (1998)
- NUMATA, A.; YANG, P.; TAKAHASHI, C.; FUJIKI, R.; NABAE, M.; FUJITA, E.: Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 648-651 (1989)
- NUTGEREN, D.H.; HAZELHOF, E.: Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, **326**, 448-461 (1973)
- O'BANION, M.K.; SADOWSKI, H.B.; WINN, V.; YOUNG, D.A.: A serum- and glucocorticoid-regulated-4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23261-23267 (1991)
- O'BRIEN, P.J.: Radical formation during the peroxidase catalyzed metabolism of carcinogens and xenobiotics: the reactivity of these radicals with GSH, DNA, and unsaturated lipids. *Free Rad. Biol. Med.*, **4**, 169-183 (1988)

- OHWI, Y. (Hrsg.): Flora of Japan (in English). National Science Museum Tokyo, Japan; Smithsonian Institution Washington, D.C. (1965)
- OKAZAKI, T.; SUETSUGU, M.; YOSHIDA, T.: Hair tonics containing oleanolic acid derivatives. Patent No. JP 6293,215 [8793,215] (Cl. A61K7/06) zit. in: *Chemical Abstracts*, **107**, P161369v (1987)
- OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; KIN, B.; NISHIMOTO, K.; YAMAZAKI, N.: Health drinks containing ursolic acid and/or oleanolic acid. Patent No. JP 0139,973 [8939,973] (Cl. A23L2/00) zit. in: *Chemical Abstracts*, **112**, P54097m (1990)
- OLSEN, S.F.; SECHER, N.J.; TABOR, A.; WEBER, T.; WALKER, J.J.; GLUUD, C.: Randomised clinical trials of fish oil supplementation in high risk pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, **107**, 382-396 (2000)
- O'NEILL, G.P.; FORD-HUTCHINSON, A.W.: Expression of mRNA for COX-1 and COX-2 in human tissues. *FEBS Lett.*, **330**, 156-160 (1993)
- OTSUKA, H.; FUJIMURA, H.; SAWADA, T.; GOTO, M.: Studies on antiinflammatory agents II. Antiinflammatory constituents from rhizome of *Coptis japonica* Makino. *Yakugaku Zasshi*, **94**, 796-801 (1981)
- OTTO, J.C.; SMITH, W.L.: The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 in the endoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19868-19875 (1994)
- OTTO, J.C.; SMITH, W.L.: Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *J. Lipid Med. Cell Signal.*, **12**, 139-156 (1995)
- OUELLET, M.; PERCIVAL, D.: Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.*, **306**, 247-251 (1995)
- OZAKI, Y.: Studies of antiinflammatory effect of Japanese oriental medicines (Kampo medicines) used to treat inflammatory diseases. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 559-562 (1995)
- PACE-ASCIAK, C.R.: Profiling of prostaglandins and related products by GC/MS with negativ-ion chemical-ionization detection. *Adv. Prost. Thromb. Leukotriene Res.*, **15**, 39-43 (1985)
- PANG, L.; PITT, A.; PETKOVA, D.; KNOX, A.J.: The COX-1/COX-2 balance in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 1050-1058 (1998)
- PAIRET, M.; VAN RYN, J.: Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), S93-S101 (1998)
- PATRIGNANI, P.; PANARA, M.R.; GRECO, A.; FUSCO, O.; NATOLI, C.; IACOBELLI, S.; CIPOLLONE, F.; GANCI, A.; CRÉMINON, C.; MACLOUF, J.; PATRONO, C.:

Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1705-1712 (1994)

PAULUS E., DING Y.-H. (Hrsg.) Handbuch der traditionellen chinesischen Heilpflanzen, Karl F. Haug Verlag, Heidelberg, 1987

PELLETIER, S.W.; CHOKSHI, H.P.; DESAI, H.K.: Separation of diterpenoid alkaloid mixtures by vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.*, **49** (5), 892-900 (1986)

PENNISI, E.: Building a better Aspirin. *Science*, **280**, 1191-1192 (1998)

PETERSON, W.L.; CRYER, B.: COX-1-sparing NSAIDs- is the enthusiasm justified? *JAMA*, **282**, 1961-1963 (1999)

PETSKO, G.A.: For medical purposes. *Nature*, **384**, (Suppl.), 7-9 (1996)

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English edition), Chemical Industry Press, Beijing (1997)

PICOT, D.; LOLL, P.J.; GARAVITO, R.M.: The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature*, **367**, 243-249 (1994)

PORTIER, P.; DAS, B.C.; BUI, A.-M; JANOT, M.-M; POURRAT, A.; POURRAT, H.: Structure de l'acide tormentique, acide triterpénique pentacyclique isolé des racines de *Potentilla tormentilla* Neck. (Rosacées). *Bull. Soc. Chim.*, **11**, 3458-3465 (1966)

POWELL, W.S.: Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases. *Anal. Biochem.*, **148**, 59-69 (1985)

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J.: Enzym Immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.*, **57**, 1170-1173 (1985)

PRITCHARD, K.A.; O'BANION, M.K.; MIANO, J.M.; VLASIC, N.; BHATIA, U.G. YOUNG, D.A.; STEMERMAN, M.B.: Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8504-8509 (1994)

PRÖBSTLE, A.: Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von *Houttuynia cordata* THUNB., einer entzündungshemmend wirkenden Arzneipflanze aus der Traditionellen Chinesischen Medizin, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1994)

RAGUENES-NICOL, C.; RUSSO-MARIE, F.; DOMAGE, G.; DIAB, N.; SOLITO, E.; DRAY, F.; MACE, J.L.G.; STREICHENBERGER, G.: Anti-inflammatory mechanism of Almpirofen: action on the phospholipid metabolism pathway. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 433-443 (1999)

- RAZ, A.; SCHWARTZMAN, M.; KENIG-WASHAL, R.: Chemical and enzymatic transformations of prostaglandin endoperoxides: evidence for the predominance of 15-Hydroperoxy pathway. *Eur. J. Biochem.*, **70**, 89-96 (1976)
- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; RIOS, J.L.: Structural consideration on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.*, **60**, 232-234 (1994)
- REDL, K.; BREU, W.; DAVIS, B.; BAUER, R.: Anti-inflammatory active polyacetylenes from *Bidens campylotheca*. *Planta Med.*, **60**, 58-62 (1994)
- REGLIN, F.: Die Teufelskralle- eine wertvolle Hilfe in der Rheumatherapie. *Praxis-Telegramm*, **1**, 16-17 (1995)
- RESCH, M., Zur Inhaltsstoffführung und antiphlogistischen Wirkung der Rhizome von *Atractylodes lancea* und verwandter Arten, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1999)
- RIEKE, C.J.; MULICHAK, A.M.; GARAVITO, R.M.; SMITH, W.L.: The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17109-17114 (1999)
- RIENDEAU, D.; PERCIVAL, M.D.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FALGUEYRET, J.P.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; GORDON, R.; GREIG, G.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; LEGER, S.; MANCINI, J.A.; O'NIELL, G.; QUELLET, M.; RODGER, I.W.; THERIEN, M.; WANG, Z.; WEBB, J.K.; WONG, E.; CHAN, C.C., et al.: Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 105-117 (1997)
- RIMPLER, H. (Hrsg.): Biogene Arzneistoffe; 2.Aufl., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (1999)
- RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN L.: Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1212-1215 (1998)
- RÍOS, J.L.; GINER-LARZA, E.; MÁNEZ, S.; GINER, R.M.; RECIO, M.C.: Effects of *Pistacia terebinthus* on acute and chronic models of inflammation. Abstract **518**, Joint Meeting of: ASP, AFERP, GA, PSE ,Amsterdam, July 1999
- RÖSSLER, S.; RUDZKI, K.; TSOLODIMOS, C.: Der andere Weg. Chinesische Medizin: was sie besser kann, wo ihre Grenzen sind. *Brigitte*, **11**, Dossier (1996)
- ROWLINSON, S.W.; CREWS, B.C.; GOODWIN, D.C.; SCHNEIDER, C.; GIERSE, J.K.; MARNETT, L.J.: Spatial requirements for 15-(R)-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6586-6591 (2000)

- RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, Paul Parey Verlag, Berlin-Hamburg (1991)
- RUF, H.H.: Prostaglandin endoperoxide synthase- a heme and free radical enzyme. A status report on spectroscopic properties, three-dimensional structure and reaction mechanism. *in*: TRAUTHEIM, A.X. (Hrsg..) Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG, Bioinorganic chemistry transition metals in biology and their coordination chemistry (research report), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 373-384 (1997)
- RUSTGI, A.K.: Cyclooxygenase-2: the future is now. *Nature Med.*, **4**, 773-774 (1998)
- SAFAYHI, H.; SAILER, E.R.; AMMON, H.P.T.: Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1212-1216 (1995)
- SAILER, E.R.; SUBRAMANIAN, L.; RALL, B.; HOERNLEIN, R.F.; AMMON, H.P.T.; SAFAYHI, H.: Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 615-618 (1996)
- SAJIKI, J.; KAKIMI, H.: Identification of eicosanoids in red algae, *Gracilaria asiatica*, using high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A*, **795**, 227-237 (1998)
- SANTOS, G.G.; ALVES, J.C.N.; RODILLA, J.M.L.; DUARTE, A.P.; LITHGOW, A.M.; URONES, J.G.: Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*. *Phytochem.*, **44**, 1309-1312 (1997)
- Satelliten-Symposium mit VANE, J.R.; STICHTENOTH, D.O.; FRÖLICH, J.C.; HÄNTZSCHEL, H.; BARNER, A.; ZEIDLER, H.: COX-2-Hemmung: von der Wissenschaft zur Klinik. 28. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Baden-Baden, 1998
- SCHNEEBELI-GRAF, R.: Nutz- und Heilpflanzen Chinas. Umschau Verlag Breidenstein GmbH, Frankfurt a. M. (1992)
- SCHNEIDER, A.; HARENDZA, S.; ZAHNER, G.; JOCKS, T.; WENZEL, U.; WOLF, G.; THAISS, F.; HELMCHEN, U.; STAHL, R.A.K.: Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular MCP-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **55**, 430-441 (1999)
- SCHNORR, B.: Embryologie der Haustiere. 3. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1996)
- SCHORMÜLLER, J. (Red.): Handbuch der Lebensmittelchemie, V/2 Obst, Gemüse, Kartoffeln, Pilze, Springer Verlag, Berlin- Heidelberg- New York (1968)
- SCHREINER, G.F.; KLAHR, S.: Diet and kidney disease: the role of dietary fatty acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **197**, 1-11 (1991)

- SCHWEER, H.; MEESE, C.O.; WATZER, B.; SEYBERTH, H.W.: Determination of prostaglandin E₁ and its main plasma metabolites 15-keto-prostaglandin E₀ and prostglandin E₀ by gas chromatography / negative ion chemical ionization triple-stage quadrupole mass spectrometry. *Biol. Mass Spect.*, **23**, 165-170 (1994)
- SCHWEIZER, S.; VON BROCKE, A.F.W.; BODEN, S.E.; BAYER, E.; AMMON, H.P.T.; SAFAYHI, H.: Workup-dependent formation of 5-lipoxygenase inhibitory boswellic acid analogues. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1058-1061 (2000)
- SCOTT, L.J.; LAMB, H.M.: Rofecoxib. *Drugs*, **58**, 499-505 (1999)
- SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P.: Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12013-12017 (1994)
- SEIBERT, K.; LEFKOWITH, J.; TRIPP, C.; ISAKSON, P.; NEEDLEMAN, P.: COX-2 Inhibitors - Is there cause for concern? *Nature Med.*, **5**, 621-622 (1999)
- SEKIYA, K.; OKUDA, H.; ARICHI, S.: Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 68-72 (1982)
- SEO, B.S.; TOMITA, Y.; TORI, K.: Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 954-955 (1975)
- SHAMMA, M.; GLICK, E.; MUMMA, R.O.: The nuclear magnetic resonance spectra of pentacyclic triterpenes. *J. Org. Chem.*, **27**, 4512-4517 (1962)
- SKÖLDSTAM, L.; BÖRJESSEN, O.; KJÄLLMAN, A.; SEIVING, B.; ÅKESSON, B.: Effect of six months of fish oil supplementation in stable rheumatoid arthritis. A double-blind, controlled study. *Scand. J. Rheumatol.*, **21**, 178-185 (1992)
- SMITH, W.L.; LANDS, W.E.M.: Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6700-6704 (1971)
- SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMED, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.: Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13313-14418 (1998)
- SNATZKE, G.; LAMPERT, F.; TSCHESCHE, R.: Über Triterpene VIII, Zuordnung von Triterpenen zu den Grundtypen durch IR Spektroskopie. *Tetrahedron*, **18**, 1417-1431 (1962)

- SPENCER, A.G.; THURESSON, E.; OTTO, J.C.; SONG, I.; SMITH, T.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M.; SMITH, W.L.: The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32936-32942 (1999)
- SPORN, M.B.; SUH, N.: Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 525-530 (2000)
- STEHLE, R.G.: Physical chemistry, stability, and handling of prostaglandins E₂, F_{2α}, D₂, and I₂: a critical summary. In: LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, Acad. Press., New York (1982)
- STICHTENOTH, D.O.; ZEIDLER, H.; FRÖHLICH, J.C.: Neue nichtsteroidale Antirheumatika: Selektive Hemmstoffe der induzierbaren Cyclooxygenase. *Med. Klin.*, **93**, 407-415 (1998)
- STÖGER, E.A.: Arzneibuch der Chinesischen Medizin, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (1999)
- STÖHR, J.: Vergleichende phytochemische und pharmakologische Untersuchungen chinesischer Pfefferarten, sowie zu Inhaltsstoffen und der antiphlogistischen Wirkung von *Piper sarmentosum*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1999)
- SUBBARAMAIAH, K.; MICHALUART, P.; SPORN, M.B.; DANNENBERG, A.J.: Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Canc. Res.*, **60**, 2399-2404 (2000)
- SUH, N.; HONDA, T.; FINLAY, H.J.; BARCHOWSKY, A.; WILLIAMS, C.; BENOIT, N.E.; XIE, Q.W.; NATHAN, C.; GRIBBLE, G.W.; SPORN, M.B.: Triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.*, **58**, 717-723 (1998)
- SWANK, R.L.; DUGAN, B.B.: Wirkung einer Diät mit niedrigem Gehalt an gesättigten Fettsäuren im Früh- und Spätstadium der Multiplen Sklerose. *Lancet* (dt. Ausg.), **4**, 636-639 (1990)
- TAKAGI, K.; LEE, E.B.: [Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* A. DC. 1. Acute toxicity and central depressant activity of crude platycodin]. *Yakugaku Zasshi*, **92**, 951-960 (1972)
- TAKAHASHI, K.; KAWAGUCHI, S.; NISHIMURA, K-I.; KUBOTA, K.; TANABE, Y.; TAKANI, M.: Studies on the constituents of medical plants: XIII. Constituents of the pericarps of the capsules of *Euscaphis japonica* Pax. (1). *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 650-653 (1974)
- TAKETO, M.M.: COX-2 and colon cancer. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), S112-S116 (1998a)

- TAKETO, M.M.: Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 1529-1536 (1998b)
- TALLEY, J.J.: Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Prog. Med. Chem.*, **36**, 201-234 (1999)
- TANG, W.; EISENBRAND, G.: Chinese drugs of plant origin. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1992
- TAO, X.; MA, L.; MAO, Y.; LIPSKY, P.E.: Suppression of carrageenan-induced inflammation in vivo by an extract of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Inflamm. Res.*, **48**, 139-148 (1999)
- TAVARES, I.A.; BISHAI, P.M.; BENNETT, A.: Activity of nimesulide on constitutive and inducible cyclooxygenases. *Drug Res.*, **45**, 1093-1095 (1995)
- TEGEDER, I.; NIEDERBERGER, E.; ISRAR, E.; GÜHRING, H.; BRUNE, K.; EUCHENHOFER, C.; GRÖSCH, S.; GEISLINGER, G.: Inhibition of NF- κ B and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB J.*, **14**, (epub. ahead of print) (2000)
- TEUSCHER, E.: Biogene Arzneimittel, 5.Aufl., Wiss. Verl. Ges., Stuttgart (1997)
- The Society of Japanese Pharmacopoeia: The Pharmacopoeia of Japan, Eleventh Edition (*JAP. XI*), English Version, Yakuji Nippo, LTD, Tokyo (1986)
- THURESSON, E.D.; LAKKIDES, K.M.; SMITH, W.L.: Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8501-8507 (2000)
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulosesheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979)
- DE TOMMASI, N.; RASTRELLI, L.; CUMANDA, J.; SPERANZA, G.; PIZZA, C.: Aryl and triterpenic glycosides from *Margyicarpus setosus*. *Phytochem.*, **42**, 163-167 (1996)
- TORDJMAN, C.; COGE, F.; ANDRE, N.; RIQUE, H.; SPEDDING, M.; BONNET, J.: Characterization of cyclooxygenase 1 and 2 expression in mouse resident peritoneal macrophages in vitro; interactions of non steroidal anti-inflammatory drugs with COX-2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1256**, 249-256 (1995)
- TSAI, A.; PALMER, G.; XIAO, G.; SWINNEY, D.C.; KULMACZ, R.J.: Structural characterization of arachidonyl radicals formed by prostaglandin H synthase-2 and prostaglandin H synthase-1 reconstituted with Mangano Protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3888-3894 (1998)

- TSAI, A.; WU, G.; KULMACZ, R.J.: Stoichiometry of the interaction of prostaglandin H synthase with substrates. *Biochem.*, **36**, 13085-13094 (1997)
- VAGO, T.; BEVILACQUA, M.; NORBIATO, G.: Effect of nimesulide action time dependence on the selectivity towards prostaglandin G/H synthase / cyclooxygenase activity. *Drug Res.*, **45**, 1096-1098 (1995)
- VAN DER OUDERAA, F.J.G.; BUYTENHEK, M.: Purification of PGH Synthase from sheep vesicular glands. In: LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, 60-68, Acad. Press., New York, (1982)
- VAN DER OUDERAA, F.J.; BUYTENHEK, M.; NUTGEREN, D.H.; VAN DORP D.A.: Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315-331 (1977)
- VANE, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, **231**, 232-235 (1971)
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M.: Cyclooxygenase 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97-120 (1998a)
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M.: New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm. Res.*, **44**, 1-10 (1995)
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M.: Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.*, **47**, (Suppl. 2), S78-S87 (1998b)
- VANE, J.R.; WOJTULEWSKI, J.A.; REGINSTER, J.; LINDÉN, B.; HOSIE, J.; GHOZLAN, P.R.; FRIES, J. (Board): Studies on meloxicam (Mobic) - a cyclooxygenase inhibitor with selectivity towards COX-2. *Br. J. Rheumatol.*, **35**, (Suppl. 1), 1-77 (1996)
- VAN ROLLINS, M.; AVELDAÑO, M.I.; SPRECHER, H.W.; HORROCKS, L.A.: High-pressure chromatography of underivatized fatty acids, hydroxy acids, and prostaglandins having different chain lengths and double-bond positions. In: LANDS, W.E.M.; SMITH, W.L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*, **86**, Acad. Press., New York, (1982)
- VERDINE, G.J.: The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, **384**, (Suppl.), 11-13 (1996)
- VERHAGEN, J.: Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulphidopeptide leukotrienes LTC₄ and LTD₄, using octadecyl reversed-phase extraction columns. *J. Chromatography*, **378**, 208-214 (1986)
- VILLAR, A.; PAYÁ, M.; HORTIGÜELA, M.D.; CORTES, D.: Tormentic acid, a new hypoglycemic agent from *Poterium ancistroides*. *Planta Med.*, **1**, 43-45 (1986)

- VON RAISON, A.J.D.: Untersuchungen zur Sekundärführung der Blüten von *Arnica lonchophylla* sowie zur systematischen Stellung der Gattung *Arnica* innerhalb der Asteraceae anhand der RbcL-Basensequenzen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1999)
- WAGNER, H.: Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Med.*, **55**, 235-241 (1989)
- WAGNER, H.: Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe, 6.Aufl., Wiss. Verl. Ges., Stuttgart (1999)
- WALENGA, R.W.; KESTER M.; CORONEOS E.; BUTCHER S.; DWIVEDI R.; STATT C.: Constitutive expression of PGHS-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins*, **52**, 341-359 (1996)
- WALLAART, R.A.M.: Distribution of sorbitol in Rosaceae. *Phytochem.*, **19**, 603-610 (1980)
- WALLACE, J.L.; CHIN, B.C.: New generation of NSAIDs: the benefits without the risks? *Drugs of Today*, **33**, 371-378 (1997)
- WALLACE, J.L.; REUTER, B.K.; MCKNIGHT, W.; BAK, A.: Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: are they really effective, selective, and GI-safe? *J. Clin. Gastroenterol.*, **27**, (Suppl. 1), S28-S34 (1998)
- WALLACE, J.L.: Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? *TiPS*, **20**, 4-6 (1999)
- WANG, Y.S.: Pharmacology and applications of Chinese materia medica, People's Health Publisher, Beijing (1983)
- WARNER, T.D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J.A.; VANE, J.R.: Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7563-7568 (1999)
- WEBER, A.-A.; ZIMMERMANN, K.C.; MEYER-KIRCHRATH, J.; SCHRÖR, K.: Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet*, **353**, 900 (1999)
- WHITE, H.L.; GLASSMAN, A.T.: A simple radiochemical assay for prostaglandin synthase. *Prostaglandins*, **7**, 123-129 (1974)
- WHO monographs on selected medical plants, Vol 1, World Health Organisation, Geneva (1999)
- WICK, B.; SCHULZ, M.; NEUPERT, W.: Meloxicam: ein Fortschritt für Rheumatiker. *Pharm. Ztg.*, **143**, 666-677 (1998)

- WIERER, M.: Chemische und biologische in-vitro Untersuchungen über Prostaglandinsynthese-Inhibitoren von Arzneipflanzen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1988)
- WIJNGAARDEN, D.: Modified rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **39**, 848-849 (1967)
- WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R.: COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, **355**, 646-648 (2000)
- WIMSATT, J.; NATHANIELSZ, P.W.; SIROIS, J.: Induction of prostaglandin endoperoxide synthase isoform-2 in ovine cotyledonary tissues during late gestation. *Endocrinology*, **133**, 1068-1073 (1993)
- WOLFE, M.M.: Future trends in the development of safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.*, **105**, 44S-52S (1998)
- WOLFF, H.; SAUKKONEN, K.; ANTTILA, S.; KARJALAINEN, A.; VAINIO, H.; RISTIMÄKI, A.: Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.*, **58**, 4997-5001 (1998)
- WU, J.; QIU, D.: Coloured illustrations of Chinese traditional & herbal ordinary drugs in China. Guizhou Science & Technical Publisher, Guiyang (1993)
- WU, K.K-Y.: Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 543-547 (1998)
- XU, H-X.; ZENG, F-Q.; WAN, M.; SIM, K-Y.: Anti-HIV triterpene acids from *geum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 643-645 (1996)
- YAGI, A.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, Y.; NODA, K.; NISHIOKA, I.: Studies on the constituents of *Zizyphi Fructus*. II. Structure of new *p*-Coumaroylates of maslinic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3075-3079 (1978)
- YAMAGUCHI, K.: Spectral data of natural products, Vol.1, Elsevier PC, Tokyo (1970)
- YAMAMOTO, S.: Purification and assay of PGH synthase from bovine seminal vesicles. In: LANDS, W.E.M., SMITH, L. (Hrsg.): Prostaglandins and arachidonate metabolites, *Methods in enzymology*. **86**, 55-60, Acad. Press, New York (1982)
- YASOJIMA, K.; SCHWAB, C.; MCGEER, E.G.; MCGEER, P.L.: Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res.*, **830**, 226-236 (1999)
- YIN, M-J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B.: The anti-inflammatory agent aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, **396**, 77-80 (1998)

ZHANG, Q.; WU, W.X.; BRENNAN, J.T.; NATHANIELSZ, P.W.: The expression of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin Endoperoxide synthase in ovine maternal uterine and fetal tissues during late gestation and labor. *Endocrinology*. **137**, 4010-4017 (1996)

ZHU, Y.P.: Chinese Materia Medica, Chemistry, Pharmacology and Applications. Harwood academic publishers, Amsterdam (1998)

ZIBOH, V.A.; MILLER, C.C.; CHO, Y.: Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, (Suppl.), 361S-366S (2000)

ZIMMERMANN, K.C.; SARBIA, M.; SCHRÖR, K.; WEBER, A-A: Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 536-540 (1998)

ZSCHOCKE, S.: Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von *Notopterygium incisum* Ting ex H.T. Chang und *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels sowie verwandter antiinflammatorischer Arzneidrogen aus der Familie der Umbelliferae. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1998)