

Untersuchungen zur Leukotrienbiosynthese-hemmenden Wirkung chinesischer
Arzneidrogen, insbesondere von *Salviae miltiorrhizae radix*

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

vorgelegt von
Kerstin Paulus
aus Wadern-Büschfeld

Düsseldorf, 2002

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: 8. Juli 2002

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.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rudolf Bauer möchte ich ganz besonders herzlich für die sehr gute Betreuung und großartige Unterstützung dieser Arbeit, auch über die Distanz Graz-Düsseldorf hinweg, danken. Außerdem möchte ich mich für das stets sehr gute Arbeitsklima bedanken, das entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. G. Willuhn und Herrn Prof. Dr. P. Proksch danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie anfertigen zu können.

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

Für meine Eltern und Großeltern
Für Tommi

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung.....	1
B	Wirkung und Hemmmöglichkeiten der 5-Lipoxygenase.....	2
1	Physiologische Bedeutung der Leukotriene.....	2
2	Biosynthese der Leukotriene.....	4
3	Hemmung der Leukotrienwirkung.....	7
C	Entwicklung eines verbesserten 5-Lipoxygenase Screening Testsystems.....	10
1	Zielsetzung und Motivation.....	10
2	Bisherige Testsysteme.....	10
3	Entwicklung eines verbesserten Testsystems.....	13
3.1	Enzymquelle.....	13
3.2	Minimierung des Inkubationsansatzes.....	13
3.3	Vorbereitung der Enzym Immunoassay Probelösung.....	18
3.4	Bestimmung der LTB4 Konzentration mittels Enzym Immunoassay.....	19
3.5	Endgültige Durchführung des Assays.....	24
3.5.1	Testdurchführung.....	24
3.5.2	Plattendesign.....	24
3.5.3	Nordihydroguaiarsäure.....	25
3.6	Umstellung der Detektion.....	26
4	Zusammenfassung.....	27
D	Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen.....	29
1	Zielsetzung und Motivation.....	29
2	Auswahl der entzündungshemmend wirkenden Drogen.....	29
2.1	Drogen und ihre Inhaltsstoffe.....	30
2.2	Anwendung und Wirkung der untersuchten Drogen in der TCM.....	34
3	Pharmakologisches Screening der Extrakte.....	38
3.1	<i>n</i> -Hexan-Extrakte.....	38
3.2	Dichlormethanextrakte.....	40
3.3	Methanolextrakte.....	42
4	Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration einiger Drogen.....	42
5	Fraktionierung zweier ausgewählter Drogen und Testung der Fraktionen.....	45
5.1	Platycodi radix.....	45
5.2	Salviae miltiorrhizae radix.....	46
6	Zusammenfassung.....	47
E	Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu <i>Salvia miltiorrhiza</i>	49
1	Allgemeine Übersicht.....	49
1.1	Systematische Einordnung von <i>Salvia miltiorrhiza</i>	49
1.2	Makroskopische Beschreibung der Droge.....	50

1.3	Mikroskopische Beschreibung der Droge.....	50
1.4	Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin.....	51
1.5	Bisher bekannte Inhaltsstoffe.....	52
1.6	Bisher bekannte pharmakologische Wirkung.....	58
2	Ergebnisse eigener pharmakologischer Untersuchungen.....	61
2.1	Einfluss von <i>Salvia miltiorrhiza</i> auf die Leukotrienbiosynthese.....	61
2.1.1	Wirkung der Extrakte auf die Leukotrienbiosynthese.....	61
2.1.2	Wirkung der verschiedenen Drogenchargen im 5-Lipoxygenaseassay.....	63
2.1.3	Wirkung der Fraktionen des <i>n</i> -Hexanextraktes von <i>Danshen</i>	64
2.1.4	Zusammensetzung der Fraktionen.....	66
2.1.5	Wirkung der isolierten Verbindungen im 5-LOX Test.....	68
2.2	Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung zweier Hauptinhaltsstoffe aus <i>Salvia miltiorrhiza</i>	75
2.2.1	Die Rolle von Sauerstoffradikalen bei patophysiologischen Vorgängen.....	75
2.2.2	Testsysteme mit polymorphkernigen Granulozyten.....	76
2.2.3	Wirkung der untersuchten Verbindungen.....	77
2.3	Wirkung verschiedener isolierter Verbindungen im PGHS1 und PGHS2 Test.....	77
2.3.1	Prostaglandin H Synthase 1 und 2.....	77
2.3.2	Testsysteme zur Bestimmung der PGHS1- und 2 Hemmwirkung.....	78
2.3.3	Wirkung verschiedener Inhaltsstoffe im Test.....	78
3	Ergebnisse eigener phytochemischer Untersuchungen.....	81
3.1	Analytik.....	81
3.1.1	HPLC-Fingerprintanalyse.....	81
3.1.2	Dünnschichtchromatographische Analyse.....	85
3.2	Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe mittels HPLC.....	89
3.3	Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus <i>Salviae miltiorrhizae radix (Danshen)</i>	92
3.3.1	Wirkungsorientierte Isolierung.....	92
3.3.2	Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen.....	94
4	Diskussion.....	125
F	Zusammenfassung.....	131
G	Experimenteller Teil.....	134
1	Herkunft des Drogenmaterials und der Referenzsubstanzen.....	134
1.1	Drogenmaterial zum pharmakologischen Screening.....	134
1.2	Drogenmaterial zur Untersuchung von <i>Salvia miltiorrhiza</i>	134
2	Verwendete Reagenzien.....	135
3	Pharmakologische Untersuchungen.....	137
3.1	5-Lipoxygenase-Test (5-LOX-Test).....	137
3.1.1	Gewinnung der Leukozyten aus Schweineblut.....	137
3.1.2	Benötigte Pufferlösungen.....	137
3.1.3	Vitalitätsprüfung.....	138

3.1.4	Zellzahl.....	138
3.2	Durchführung des 5-LOX Assays nach Zschocke (1998).....	139
3.2.1	Probenvorbereitung.....	139
3.2.2	Inkubation.....	139
3.2.3	Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse.....	140
3.2.4	Auswertung.....	140
3.3	Durchführung des neu entwickelten Testassays.....	140
3.3.1	Herstellung der Reagenzien.....	140
3.3.2	Probenvorbereitung.....	140
3.3.3	Testdurchführung.....	141
3.3.4	Detektion von LTB4 mit EIA (Enzym Immuno Assay).....	143
3.4	Cyclooxygenase Test (COX-1 und –2 Test).....	144
3.4.1	Probenvorbereitung.....	144
3.4.2	Durchführung der Inkubation.....	144
3.4.3	Auswertung.....	145
3.5	Chemilumineszenztest mit polymorphkernigen Granulozyten.....	145
4	Phytochemische Untersuchungen.....	147
4.1	Herstellung der Pflanzenextrakte.....	147
4.1.1	Soxhletextrakte für Analytik und Screening.....	147
4.1.2	Soxhletextrakte zur Isolierung.....	147
4.1.3	Dekokt.....	147
4.2	Chromatographische Arbeitsmethoden.....	148
4.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	148
4.2.2	Offene Säulenchromatographie	150
4.2.3	Vakuumflüssigchromatographie (VLC).....	150
4.2.4	Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC).....	151
4.2.5	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	152
4.2.6	Gaschromatographie.....	155
4.3	Spektroskopische und physikalische Arbeitsmethoden.....	155
4.3.1	UV-Spektroskopie.....	155
4.3.2	Massenspektrometrie (MS).....	155
4.3.3	NMR-Spektroskopie.....	156
4.4	Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe aus <i>Salvia miltiorrhiza</i>	156
4.5	Isolierung der Inhaltsstoffe aus <i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	158
4.6	Physikalische und spektroskopische Daten der isolierten Verbindungen.....	161
H	Literaturverzeichnis.....	164
I	Anhang.....	179
1	<i>n</i> -Hexanextrakte aller untersuchten <i>Danshen</i> -Drogenmuster.....	179

ABKÜRZUNGEN

AA	Arachidonsäure
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CI	Chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy (NMR-Methode)
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
EIA	Enzym-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
FM	Fließmittel
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IR	Infrarotspektroskopie
5-LOX	5-Lipoxygenase
LT	Leukotrien
LTB ₄	Leukotrien B ₄
mAU	Milli-Absorption-Units
MG	Molekulargewicht
MeOH	Methanol
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektroskopie
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RP-18	Reversed phase (Umkehrphase mit durchschnittlicher Kettenlänge C-18)
R _t	Retention time (Retentionszeit HPLC)
SC	offene Säulenchromatographie
Sm	Salvia miltiorrhiza
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TIC	Total Ion Current
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	Visuelles Licht (Tageslicht)
VLC	Vakuum-Flüssig-Chromatographie
VS	Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

A Einleitung

Asthma, rheumatoide Arthritis, Psoriasis und andere entzündliche Erkrankungen zählen nach wie vor zu den großen medizinischen Herausforderungen, da es bislang kein befriedigendes Therapiekonzept gibt. Für ihre symptomatische Behandlung werden häufig Glucocorticoide verwendet, bei denen bei langfristiger Anwendung mit erheblichen Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Die 1983 von Samuelsson entdeckten Leukotriene sind potente Entzündungsmediatoren und besitzen eine große Bedeutung bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen. Leukotrien B₄ wirkt chemotaktisch auf inflammatorische Zellen und es wird eine Beteiligung an der Entstehung von rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei Asthmaanfällen angenommen. Peptidleukotriene spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Asthma, sie wirken bronchokonstriktorsch und erhöhen die Schleimsekretion. Die medikamentöse Beeinflussung der Entstehung und Wirkung von Leukotrienen ist daher ein interessanter Ansatz auf der Suche nach neuen Asthmawirkstoffen. Bereits seit einiger Zeit sind synthetische 5-Lipoxygenasehemmstoffe und Peptidleukotrienrezeptorantagonisten im Einsatz. Die Suche nach einer zweiten und dritten Generation von Wirkstoffen ist jedoch Gegenstand intensivster Forschung.

Die traditionelle chinesische Medizin (TCM) kennt eine Vielzahl pflanzlicher Arzneidrogen, die erfolgreich in der Therapie von Entzündungen, Rheuma und Asthma eingesetzt werden. Diese können daher als eine wichtige Resource bei der Suche nach neuen potenten Naturstoffen mit Hemmwirkung auf den Leukotrienstoffwechsel dienen.

Für ein Screening von chinesischen Arzneipflanzen auf Hemmung der Leukotrienbiosynthese sollte daher ein schneller durchsatzstarker Assay im Mikrotitermaßstab etabliert werden. Eine besonders potente Droge sollte damit ausgewählt und anschließend pharmakologisch und phytochemisch näher untersucht werden. Neben der Aufklärung des Wirkprinzips stand die Suche nach neuen Leitstrukturen mit Einfluss auf den Leukotrienstoffwechsel im Vordergrund der Arbeit.

B Wirkung und Hemmmöglichkeiten der 5-Lipoxygenase

1 Physiologische Bedeutung der Leukotriene

Die 5-Lipoxygenase (5-LOX) stellt das Schlüsselenzym für die Bildung der Leukotriene dar. Leukotriene sind Entzündungsmediatoren, die an der Pathogenese von Asthma, rheumatischen Erkrankungen, Psoriasis und anderen entzündlichen Erkrankungen beteiligt sind (Hay, 1995). Die 5-LOX katalysiert den ersten Schritt der Umwandlung von Arachidonsäure in die Leukotriene.

Insbesondere LTB₄ ist ein wichtiger Mediator bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen. Er besitzt schon in geringsten Konzentrationen eine hohe chemotaktische und chemokinetische Wirkung auf Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Desweiteren wird durch LTB₄ die Freisetzung lysosomaler Enzyme sowie aktiver Sauerstoffspezies aktiviert.

Die Sulfidopeptid-Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ waren lange Zeit als „slow reacting substances of anaphylaxis“ bekannt, bevor ihre endgültige Struktur 1983 von Samuelsson entdeckt und aufgeklärt werden konnte. Sie verursachen eine Kontraktion der glatten Muskulatur und spielen daher bei der Entstehung von Asthma eine große Rolle. In zahlreichen Studien wurde belegt, dass Peptidleukotriene neben ihrer starken bronchokonstriktorisches Wirkung die mikrovaskuläre Permeabilität der Bronchien erhöhen und damit Eosinophilen, denen bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren bei Asthma eine Schlüsselrolle zukommt, einen verstärkten Einfluss ermöglichen. Auch die Schleimsekretion wird unter dem Einfluss der Peptidleukotriene erhöht und der ziliäre Transport des Schleims nachweislich verlangsamt (Diers, 1998).

Die Rolle der Leukotriene bei anderen entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Psoriasis und rheumatischer Arthritis, ist dagegen noch nicht vollständig geklärt. In einer Studie von Roberts *et al.* (1997) zeigte der Einsatz von 5-LOX- und FLAP-Inhibitoren keinen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Colitis ulcerosa oder von Psoriasis, obwohl Leukotriene an der Pathophysiologie dieser Erkrankungen beteiligt zu sein scheinen.

Für das in der Therapie von Colitis ulcerosa eingesetzte Mesalazin konnte allerdings eine Lipoxygenasehemmung nachgewiesen werden, die zumindest teilweise für die Wirkung verantwortlich scheint. Zur abschließenden Beurteilung der Rolle von Leukotrieninhibitoren bei diesen Krankheitsbildern sind daher noch weitere Studien erforderlich.

Einen Überblick über die physiologische Wirkung der Leukotriene zeigt Abbildung 1.

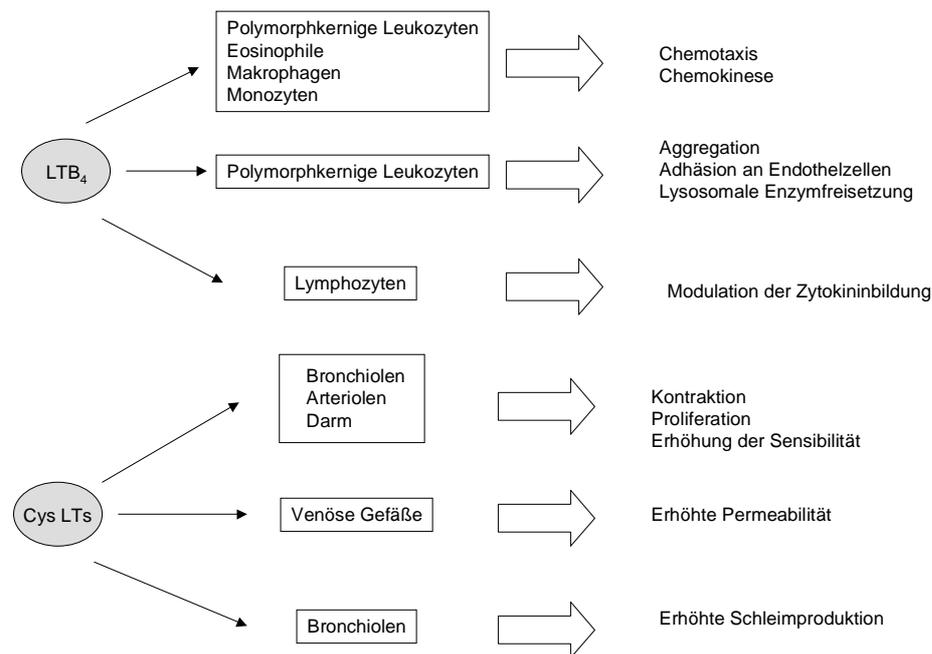


Abbildung 1: Physiologische und pathologische Wirkung der Leukotriene (nach Diersch, 1998)

Leukotrienrezeptoren

Bisher sind 3 verschiedene Leukotrienrezeptoren bekannt. Die Stimulation des Rezeptors für LTB₄ führt hauptsächlich zu einer verstärkten Chemotaxis (Yokomizo *et al.*, 1997). Für die Cysteinyl-Leukotriene sind bisher zwei Subtypen bekannt, Cys LT₁ und Cys LT₂ (Coleman *et al.*, 1995). Die größte Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene wird durch den Cys LT₁ Rezeptor übermittelt. Seine Stimulation bedingt Bronchokonstriktion, Chemotaxis und eine erhöhte Gefäßpermeabilität (Serhan *et al.*, 1996). Der Cys LT₂ ist ebenfalls für Bronchokonstriktion verantwortlich, allerdings sind die Auswirkungen der Rezeptoraktivierung bisher nicht so gut untersucht, wie es für den Cys LT₁ Rezeptor der Fall ist.

2 Biosynthese der Leukotriene

Leukotriene werden nicht gespeichert, sondern bei Bedarf nach Zellaktivierung aus Arachidonsäure neu synthetisiert. Die 5-Lipoxygenase stellt dabei das Schlüsselenzym dar. Die 5-Lipoxygenase ist eine Nicht-Häm-Dioxyreduktase, sie katalysiert in zwei Schritten die Addition von molekularem Sauerstoff an die Arachidonsäure und damit die Bildung des Epoxids LTA_4 . Im ersten Schritt wird dabei in einer stereospezifischen Reaktion, an der die Reduktion des Eisenion im aktiven Zentrum beteiligt ist, ein Wasserstoff von Position C7 der Arachidonsäure abstrahiert. Durch die Anlagerung von Sauerstoff an das C5-Atom entsteht 5-HPETE (5-(S)Hydroperoxy-6,8,11,14(E,Z,Z,Z)-eicosatetraensäure (Abb.2). In einer zweiten Redoxreaktion wird durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms an C-10 der 5-HPETE das Epoxid LTA_4 gebildet. LTA_4 wird dann unter Katalyse von LTA_4 -Hydrolase zu LTB_4 umgewandelt. Durch Konjugation von Gluthation entstehen dagegen die Peptidleukotriene LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 , die auch Cysteinyl-Leukotriene genannt werden (Abb. 3). 5-Lipoxygenase wird dabei ständig durch Fettsäurehydroperoxide von der inaktiven Fe(II)-Form in die aktive Fe(III)-Form umgewandelt.

Die Aktivierung der 5-Lipoxygenase erfolgt in intakten Zellen durch eine erhöhte Ca-Ionen-Konzentration und Anlagerung des Enzyms an die Kernmembran. Verantwortlich für die Translokation der 5-LOX ist das Membranprotein „five lipoxygenase activating protein“, kurz FLAP genannt. Desweiteren dient dieses Protein als Carrier für die aus der Zellmembran freierwerdende Arachidonsäure.

Das Substrat der 5-LOX, die Arachidonsäure, liegt im Organismus nicht frei vor, sondern ist als Bestandteil der Phospholipide an die Zellmembran gebunden. Arachidonsäure kann nach Stimulierung der Zelle mit Hilfe einer Phospholipase freigesetzt werden, wobei bis heute nicht vollständig geklärt ist, welche Phospholipasen in den verschiedenen Zelltypen für die Freisetzung verantwortlich sind (Müller, 1995).

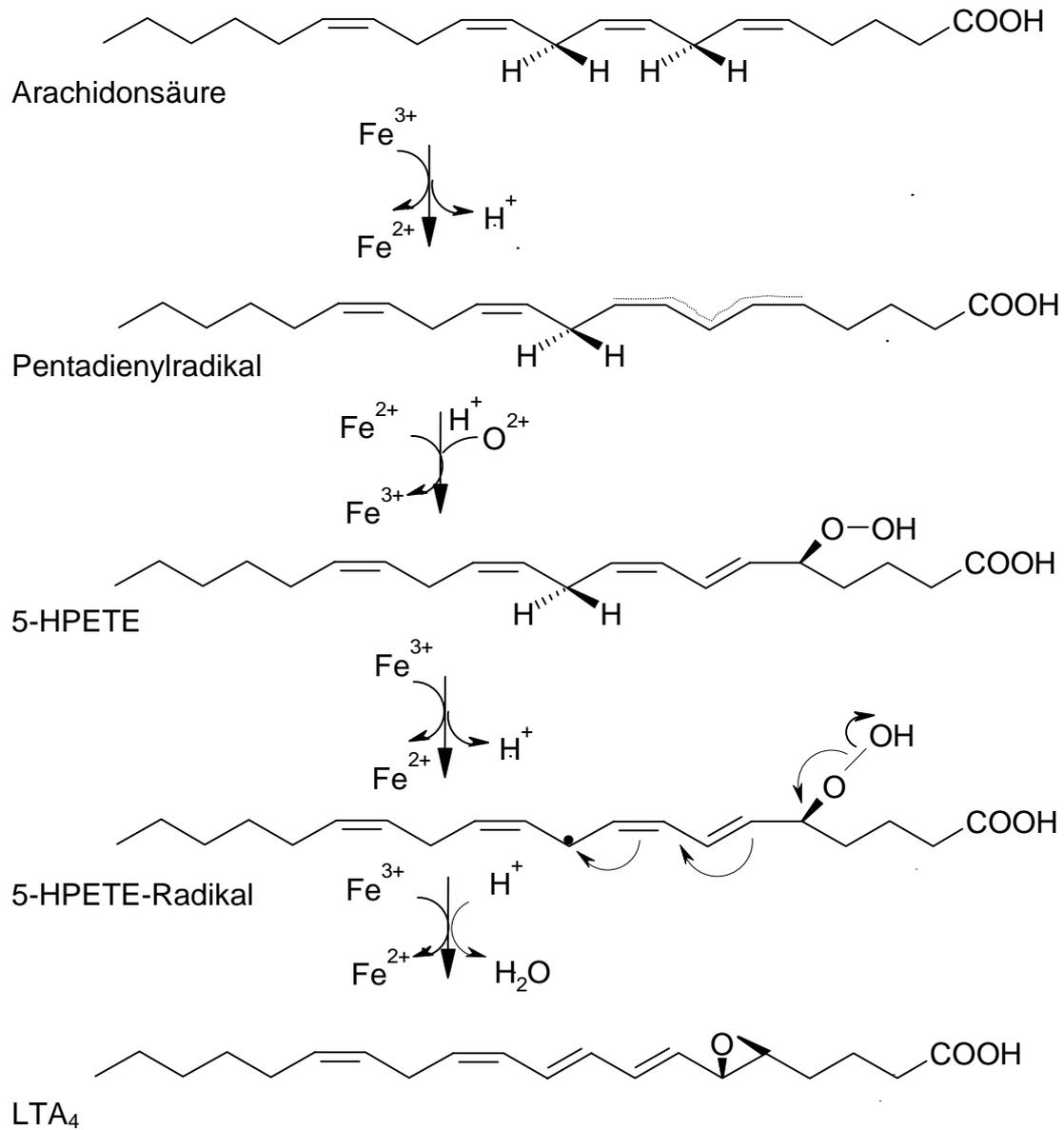


Abbildung 2: Postulierter Mechanismus der 5-LOX katalysierten Reaktion, Müller(1995)

Wirkung und Hemmmöglichkeiten der 5-Lipoxygenase

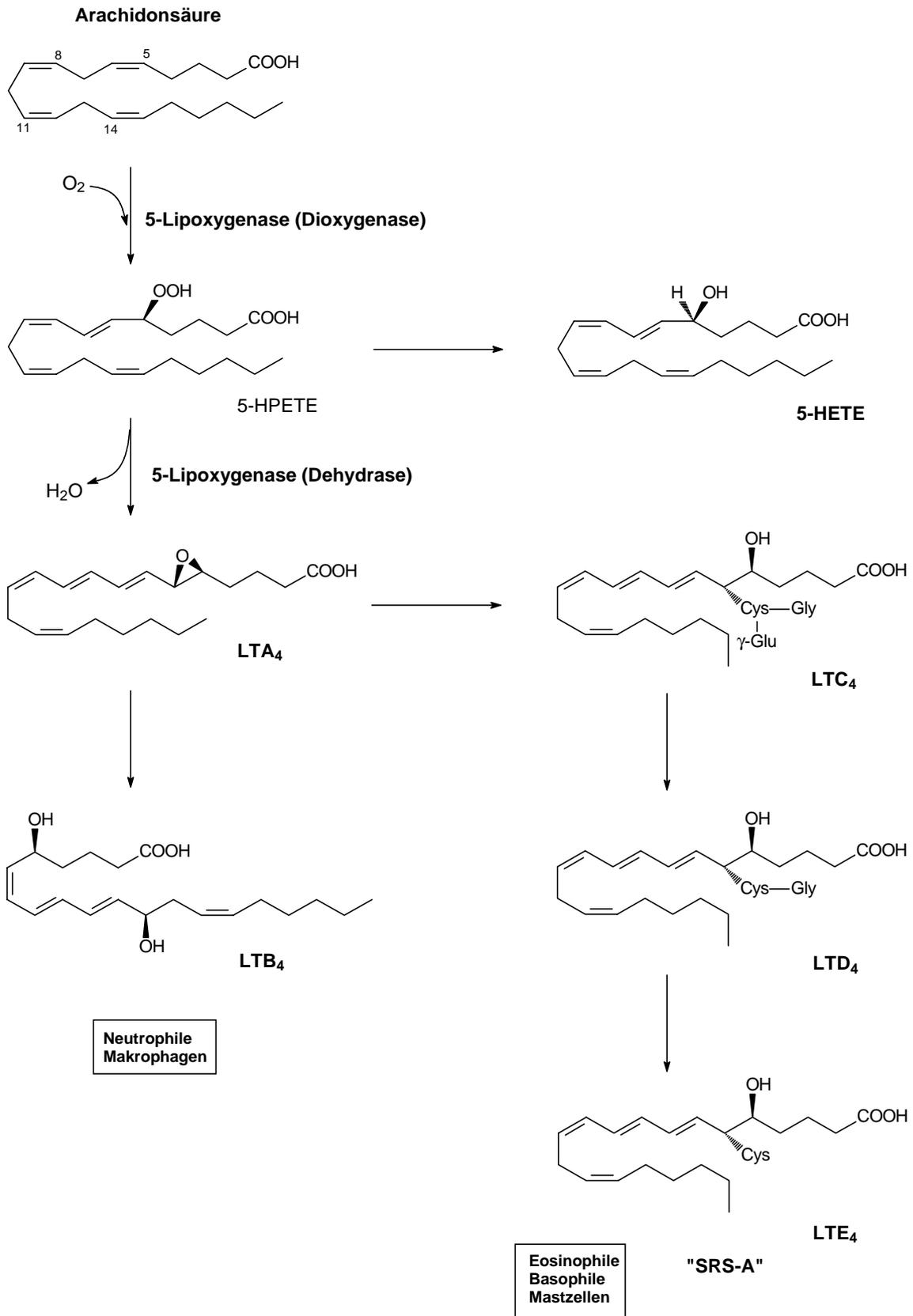
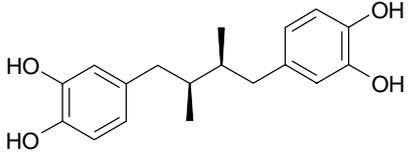
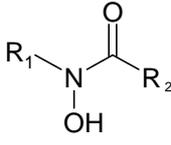
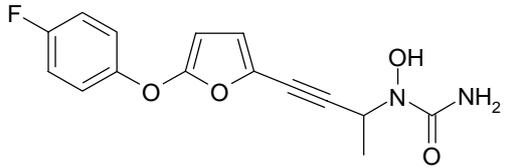
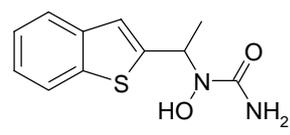
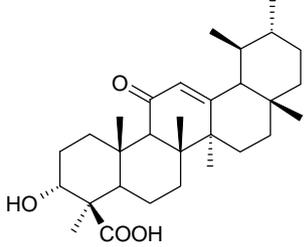
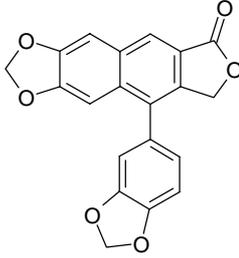
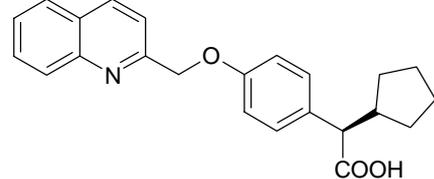
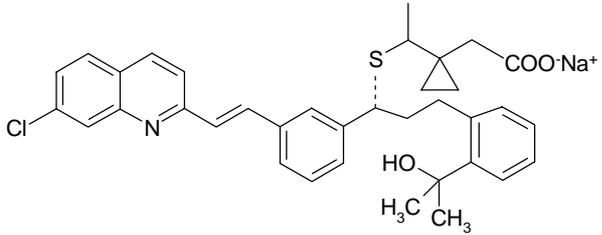


Abbildung 3: Leukotrienbiosyntheseweg

3 Hemmung der Leukotrienwirkung

Aus dem 5-Lipoxygenasestoffwechsel ergeben sich verschiedene Angriffsmöglichkeiten für mögliche Hemmstoffe. Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese lassen sich grob in Redoxinhibitoren, Chelatbildner, Translokationsinhibitoren, kompetitive Inhibitoren und Leukotrienrezeptorantagonisten unterteilen. Redoxinhibitoren reduzieren das Fe^{3+} -Ion in der Lipoxygenase zu Fe^{2+} , das Enzym bleibt somit im inaktiven reduzierten Zustand. Durch Antioxidantien kann somit sehr leicht eine unspezifische Hemmung erzielt werden. Zu den sogenannten Redoxinhibitoren gehören z.B. Flavonoide und verschiedene Kaffeesäurederivate. Durch die geringe Selektivität und mögliche Toxizität kommt diesen Substanzen allerdings keine große therapeutische Bedeutung zu. Chelatbildner können mit dem Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms agieren. Ihre Selektivität für die 5-Lipoxygenase ist etwas höher als die der Redoxinhibitoren. Zu diesem Inhibitortyp gehört unter anderem Zileuton (Zyflo[®]), eine Substanz, die sich in USA bereits zur Behandlung von asthmatischen Erkrankungen im Einsatz befindet. Andere Substanzen sind in der Lage, mit der Arachidonsäure um den Platz im aktiven Zentrum zu konkurrieren. Zu diesen kompetitiven 5-LOX Inhibitoren gehört unter anderem die 11-Keto- β -Boswellinsäure, ein Inhaltsstoff des Weihrauchs (Ammon *et al.*, 1993). Weiterhin diente das Lignan Justicidin E als Leitstruktur bei der Entwicklung neuer kompetitiver 5-LOX-Inhibitoren. Translokationshemmer haben keinen direkten Einfluss auf das Enzym, sondern verhindern die Bindung der 5-Lipoxygenase an das 5-lipoxygenaseaktivierende Protein (FLAP). Somit ist der Einfluss von Hemmstoffen der Translokation nur in intakten Zellsystemen zu beobachten. Eine weitere vielversprechende Gruppe sind Leukotrienrezeptorantagonisten. Als erste Substanz wurde in Deutschland Montelukast (Singulair[®]), ein Cys LT1-Rezeptor-Antagonist eingeführt. Cys LT1-Rezeptor-Antagonisten zeigten sich in klinischen Studien vor allem bei Anstrengungsasthma, Asthma nach Provokation mit kalter Luft und analgetikainduziertem Asthma als wirkungsvoll. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Leukotrieninhibitortypen. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der möglichen Angriffspunkte in den Leukotrienstoffwechsel.

Wirkprinzip	Wirkstoffe
Redoxinhibitoren	 <p>Nordihydroguaiarsäure</p>
Chelatbildner	 <p>Hydroxamsäuren</p>  <p>A-78773</p>  <p>Zileuton</p>
kompetitive 5-LOX-Inhibitoren	 <p>11-Keto-β-Boswellinsäure</p>  <p>Justicidin E</p>
FLAP-Inhibitoren	 <p>Bay-X 1005</p>
CysLT ₁ - Rezeptorantagonisten	 <p>Montelukast</p>

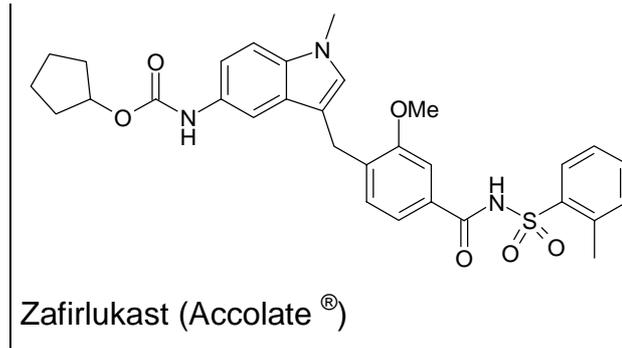


Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Leukotrieninhibitoren (Nach Diersch, 1998)

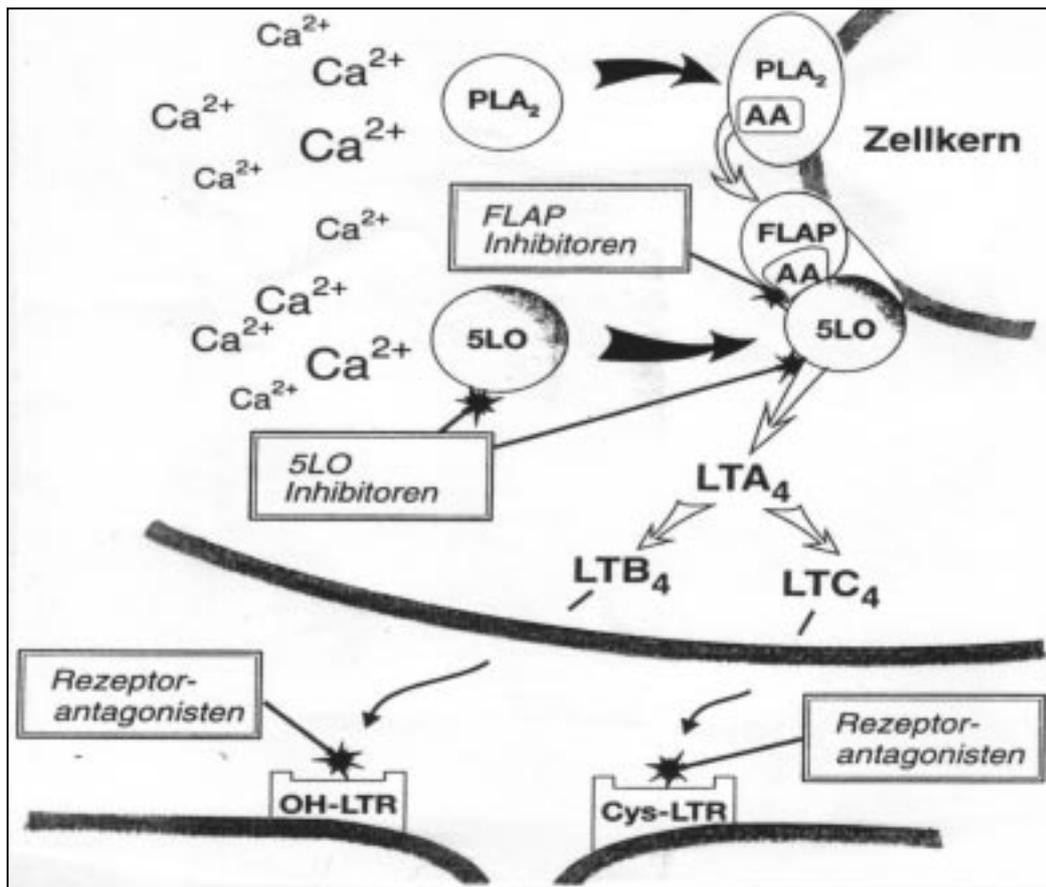


Abbildung 4: Mögliche Angriffspunkte von Leukotrieninhibitoren (nach Müller, 1995)

C Entwicklung eines verbesserten 5-Lipoxygenase Screening Testsystems

1 Zielsetzung und Motivation

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, ein verbessertes Testsystem zu entwickeln, mit dem ein schnelles und sicheres Screening von Pflanzenextrakten und Reinstoffen hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die Leukotrienbiosynthese möglich sein sollte.

In dem bisher in unserem Arbeitskreis angewandten 5-LOX-Assay wurde mit radioaktiv markierter Arachidonsäure als Enzymsubstrat gearbeitet. Die Detektion der gebildeten Metabolite erfolgte hierbei mittels einer HPLC Methode, die langwierig und vom Arbeitsaufwand her sehr aufwändig war (Fessler *et al.*, 1986).

Mit dem neuen Testsystem sollte zudem ein hoher Probendurchsatz erreicht werden. Der Testansatz sollte dazu auf den Mikrotitermaßstab verkleinert und die Assaybedingungen entsprechend angepasst werden.

Die Detektion der entstandenen Metabolite sollte mit Hilfe eines LTB₄-EIA (Enzym-Immuno-Assay) erfolgen und somit den Einsatz radioaktiver Arachidonsäure und eine aufwändige Probenaufarbeitung überflüssig machen.

Mit dem weiterentwickelten Testdesign sollte später eine Automatisierung des Screenings möglich werden.

2 Bisherige Testsysteme

Zur Untersuchung der Wirkung von Arzneistoffen und Pflanzenextrakten auf die Leukotrienbiosynthese sind zahlreiche Assays bekannt. Die Testsysteme unterscheiden sich hierbei hauptsächlich durch unterschiedliche Enzymquellen und unterschiedliche Quantifizierungsmethoden der gebildeten Metabolite. Als Enzymquelle werden unter anderem polymorphkernige Neutrophile (PMNs) von Schweinen (Kuhl *et al.*, 1986), von Rindern (Dannhardt *et al.*, 1997) oder von Menschen (Vasagne *et al.*, 1994) benutzt. Andere Testsysteme arbeiten mit Ganzblut von Schweinen (Spaethe *et al.*, 1989) oder mit isolierter

5-Lipoxygenase (Ueda *et al.*, 1986). Die Handhabung von isoliertem reinem Enzym ist allerdings sehr schwierig, da es sehr oxidationsempfindlich ist.

Als Substrat verwendet man häufig radioaktiv markierte Arachidonsäure. Die Quantifizierung der nach Umsetzung entstandenen Produkte erfolgt dann durch HPLC-Trennung und Radioaktivitätsdetektion. Eine weitere Möglichkeit ist die Isolierung der gebildeten Metabolite (z. B. durch präparative DC; Ueda *et al.*, 1986) und anschließende Messung im Scintillationszähler. In weiteren Testsystemen wird auch bereits die Möglichkeit der Quantifizierung mittels eines Enzym Immuno Assays genutzt (Spaethe *et al.*, 1989; Carty *et al.*, 1997).

In unserem Arbeitskreis wurden Pflanzenextrakte und Reinstoffe bisher mit einem von Fessler *et al.* (1986) entwickelten Testsystem auf ihre Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese hin untersucht. Als Enzymquelle dienten hierbei frisch isolierte Schweineleukozyten, als Enzymsubstrat ^{14}C -Arachidonsäure. Die im Inkubationsansatz gebildeten radioaktiven Metabolite wurden anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC und einem Radioaktivitätsdetektor quantitativ bestimmt. Die gemessenen Hauptumsetzungsprodukte waren hierbei Leukotrien B₄ (LTB₄) sowie die 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) (Abb. 5).

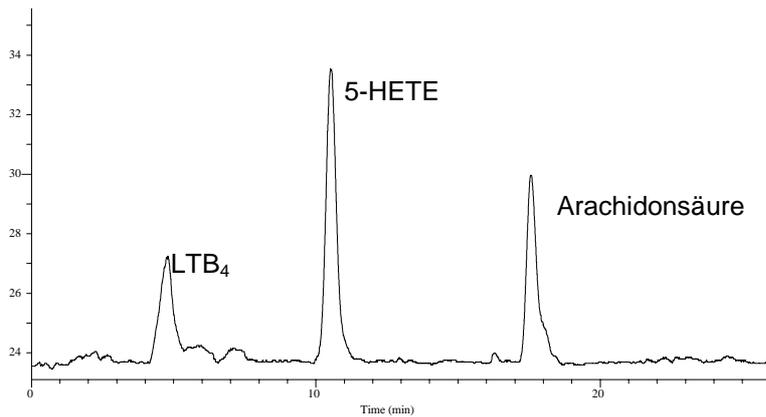
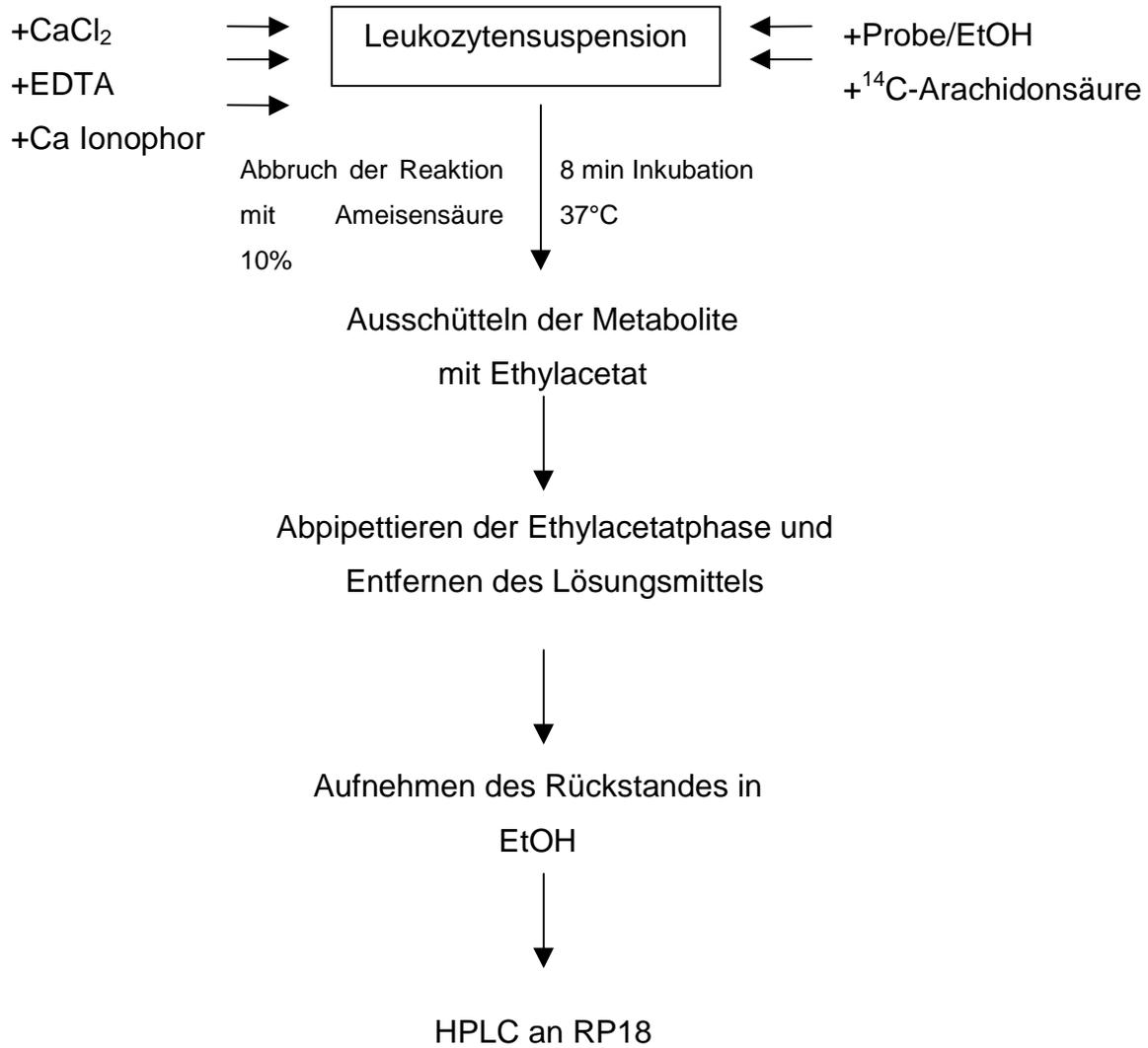


Abbildung 5: Arbeitsschritte des bisherigen 5-LOX Testsystems

Die Hemmung errechnete sich aus dem prozentualen Anteil der Metabolite gegenüber nicht umgesetzter Arachidonsäure in einer Probe mit Inhibitor im Vergleich zu einer Kontrolle, die reines Lösungsmittel enthielt.

3 Entwicklung des verbesserten Screening Testsystems

3.1 Enzymquelle

Als Enzymquelle wurde weiterhin mit isolierten Schweineleukozyten gearbeitet. Dies schien aus mehreren Gründen ratsam. Bei der 5-Lipoxygenase handelt es sich um ein matrixständiges Enzym. Die Verwendung von Reinenzym ist also nur bei gleichzeitiger Zugabe von Zellmembranbestandteilen möglich. Durch die Verwendung eines intakten Zellsystems wurde zudem eine Annäherung an *in vivo*-Bedingungen erreicht. Um zum Wirkort zu gelangen, muss die zu testende Verbindung erst die Zellmembran überwinden. Eine inhibitorische Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese kann daher in diesem Testsystem neben einem direkten Einfluss auf die 5-LOX auch auf einen Einfluss auf FLAP, den Calcium-Ionenstrom oder auch auf Zytotoxizität zurückzuführen sein.

Beim Testdesign musste auch die wenig beeinflussbare Qualität des Zellmaterials berücksichtigt werden. Die Leukozyten wurden vor jedem Test aus frischem Schweineblut isoliert. Die Blutzellen waren somit gewissen Schwankungen unterworfen, da der Allgemeinzustand und die damit einhergehende Qualität des Blutes von Tier zu Tier erheblich variierte. Die Bedingungen mussten daher so gewählt werden, dass diese Schwankungen ausgeglichen werden konnten.

3.2 Minimierung des Inkubationsansatzes

Um ein Screening mit hohem Durchsatz zu gewährleisten, musste der Inkubationsansatz von vormals 2,5 ml / Probe auf den Mikrotitermaßstab, das heißt auf höchstens 300 µl / Probe, reduziert werden. Um trotzdem stabile, reproduzierbare Resultate zu erhalten, mussten die verschiedenen Parameter optimal eingestellt werden.

Leukozytensuspension

Bei der Einstellung der optimalen Zellkonzentration wurde von einem vorgelegten Zellsuspensionsvolumen von 250 µl ausgegangen. Die Konzentration an Zellen musste nun so gewählt werden, dass eine optimale Umsetzung der Arachidonsäure erreicht wurde. Die ursprüngliche Konzentration von 15.000 Zellen / µl erwies sich hierbei als zu gering. Auch bei gleicher Leukozytenkonzentration war die Umsetzung der Arachidonsäure, bedingt durch das uneinheitliche Zellmaterial, sehr unterschiedlich. Verglich man allerdings die durchschnittlich gebildete Menge an LTB₄ bei verschiedenen Zellkonzentrationen, so konnte eine optimale Konzentration ausgemacht werden. Wie Abbildung 6 zeigt, erhöhte sich die Substratumsetzung mit steigender Leukozytenzahl, bis sich ab 20.000 Zellen / µl ein Plateau einstellte. Durch die gewählte Leukozytenkonzentration musste auch gewährleistet werden, dass bei möglichst allen durchgeführten Tests die gebildete Menge an LTB₄ im Detektionsfenster des EIA-Kits lag.

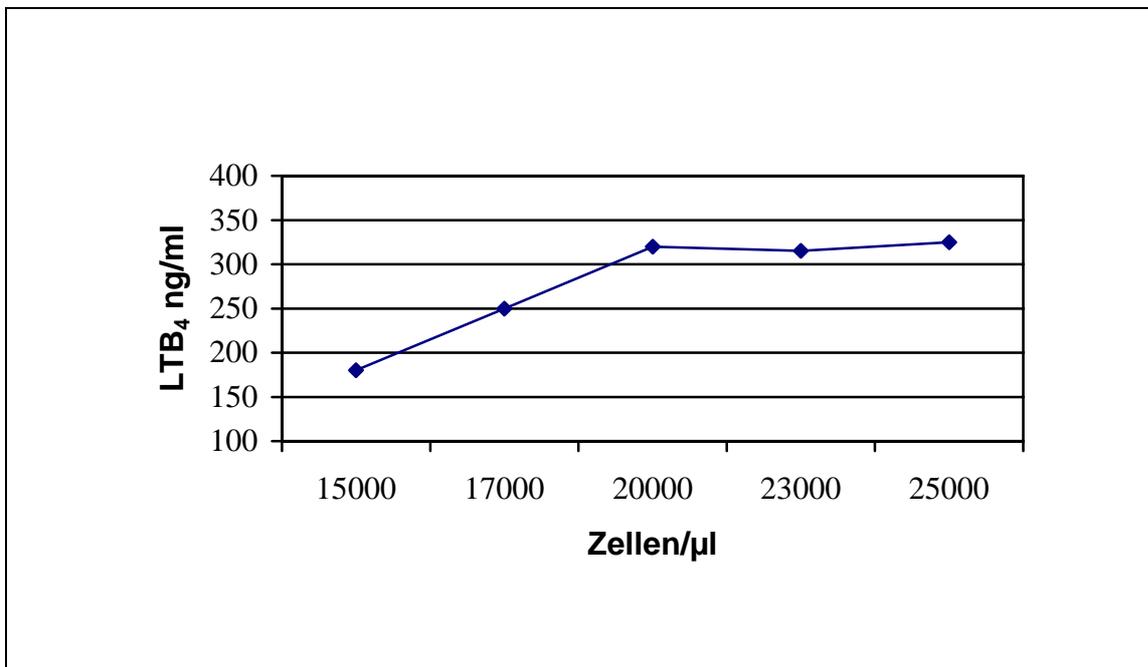


Abbildung 6: Auswirkung der Leukozytenkonzentration auf die Umsetzung

Bei zu gering konzentrierter Suspension kam es häufiger vor, dass die gebildete Metabolitenmenge außerhalb des detektierbaren Konzentrationsfensters lag. Bei Zugabe eines Inhibitors wurde eine scheinbar maximale Hemmung erreicht,

die sich aber bei Anbieten einer höheren Enzymmenge nicht bestätigen ließ. Aus diesem Grund wurde eine Konzentration von 20000 Zellen / μl gewählt.

Cofaktoren und Reagenzien

Die Menge und Konzentration der zugesetzten Cofaktoren musste ebenfalls an den nun verkleinerten Testansatz angepasst werden. Hierzu wurden die Konzentration pro Probe von dem vorhergehenden Test übernommen, die Konzentrationen der zu pipettierenden Lösungen aber auf die entsprechende Gesamtmenge des Testansatzes angeglichen.

Calciumchlorid

Die Umsetzung der Arachidonsäure durch die 5-Lipoxygenase ist eine Calcium-abhängige Reaktion. Das Enzym wird in intakten Zellen unter anderem durch Erhöhung der Ca-Ionen-Konzentration stimuliert. Die für den bisherigen Test gewählte Konzentration von 2 mM CaCl_2 wurde in diesem Testdesign beibehalten.

Eicosatetrainsäure

Die Verwendung von Schweineleukozyten erforderte die Zugabe von Eicosatetrainsäure (ETYA), da diese im Gegensatz zu menschlichen Granulozyten neben der 5-Lipoxygenase- hauptsächlich 12-Lipoxygenase-aktivität besitzen und daher Arachidonsäure unter natürlichen Bedingungen bei Schweinen überwiegend zu 12-HETE und DiHETE metabolisiert wird. Dieser Stoffwechselweg musste daher selektiv gehemmt werden, um Bedingungen zu schaffen, die mit denen des menschlichen Organismus vergleichbar sind. Untersuchungen von Borgeat *et al.* (1982) haben gezeigt, dass ETYA bereits in geringen Konzentrationen die 12-Lipoxygenase selektiv hemmt. Die im ursprünglichen Assay gewählte Konzentration von 10 μM konnte im neuen Testsystem, angepasst an den verminderten Inkubationsansatz, beibehalten werden.

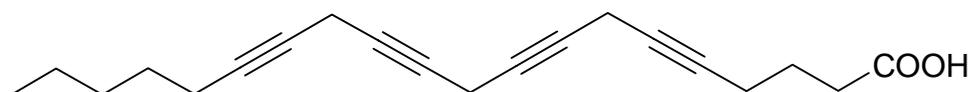


Abbildung 7: Eicosatetrainsäure

Ca-Ionophor A 23187

Durch Ca-Ionophor wird die Translokation cytosolischen Enzyms an die Zellmembran und dadurch seine Aktivierung stimuliert. Während der Entwicklung des Testsystems erwies sich auch hier eine Konzentration von 17 μM als optimal.

Assaypuffer

Für die Verdünnung von Zellsuspension und Probenlösung musste ein geeigneter Puffer gefunden werden. Der vormals verwendete Phosphatpuffer war für die anschließende Detektion mittels EIA nicht geeignet. Anorganische Phosphate stellen einen starken Inhibitor der alkalischen Phosphatase dar. Im verwendeten Immuno Assay wird mit alkalischer Phosphatase konjugiertes LTB_4 genutzt, um die Menge an gebildetem Leukotrien zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.8). Statt dessen wurde nun ein isotonischer TRIS Puffer (pH 7,4) verwandt. Dieser Puffer erwies sich mit dem Bioassay als kompatibel.

Mit TRIS Puffer verdünnte Leukozyten behielten über mehrere Stunden ihre Vitalität im selben Maße, wie es auch mit dem vorher verwandten Phosphatpuffer der Fall war.

Um eventuelle Auswirkungen des Puffers auf die Arachidonsäureumsetzung auszuschließen, wurden mit TRIS Puffer verdünnte Leukozyten unter den Bedingungen des vorhergehenden Testsystems (mit ^{14}C Arachidonsäure als Substrat) eingesetzt und das Metabolitenmuster anschließend mittels HPLC untersucht. Dabei ergaben sich keine Abweichungen von vorhergehenden Vergleichen.

Arachidonsäurekonzentration

Ebenso wie die optimale Leukozytenkonzentration und ein optimaler Zusatz der einzelnen Co-Faktoren war auch eine optimale Konzentration an eingesetzter Arachidonsäure (AA) für ein stabiles Testsystem unerlässlich.

Als optimale Arachidonsäurekonzentration erwies sich im Assay der Zusatz von 5 μl 0,12 mMolarer Arachidonsäure. Bei zu geringer Arachidonsäurekonzentration war die gebildete Menge an LTB_4 nicht ausreichend, um sichere und reproduzierbare Hemmwerte für die eingesetzten Proben zu liefern.

Als Positivkontrolle wurde Nordihydroguaiaretsäure (NDGA) eingesetzt, ein Kaffeesäurederivat, das eine bekannte inhibitorische Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese hat (Bokoch und Reed, 1981). Ein Substratmangel führte insbesondere bei hohen Inhibitorkonzentrationen zu höheren Hemmwerten der NDGA oder die Umsetzung war sogar so gering, dass eine Detektion von LTB₄ im gewählten Verdünnungsschema nicht mehr möglich war (Tab. 2, Abb. 8). Es zeigte sich, dass bei Konzentrationen von 0,12 mM und mehr eine genügend große Substratmenge vorlag, die stabile und reproduzierbare Hemmwerte gewährleistete. So ergaben sich für NDGA IC₅₀ Werte von 0,53 µM bei einer Arachidonsäurekonzentration von 0,12 mM und 0,54 µM bei 0,13 mM .

Arachidonsäurekonzentration	NDGA Hemmung		
	bei 1,25 µM	bei 0,75 µM	bei 0,5 µM
0,10 mM	n.d.	n.d.	n.d.
0,11 mM	n.d.	n.d.	85,3
0,12 mM	82,3	70,5	45,4
0,13 mM	84,2	63,6	39,2

Tabelle 2: Abhängigkeit der NDGA Hemmung von der Arachidonsäurekonzentration

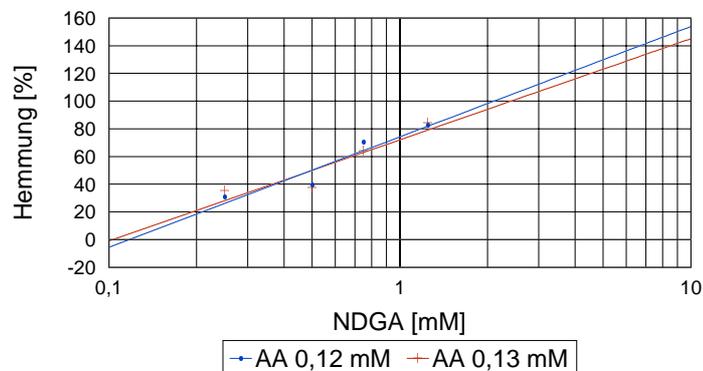


Abbildung 8: Hemmwerte von NDGA bei verschiedenen Arachidonsäurekonzentrationen

Inkubationszeit

Ein wichtiger Parameter für die optimale Durchführung des Assays war die gewählte Inkubationszeit. Auch hier war es wichtig, die Bedingungen so zu wählen, dass in jedem einzelnen Test eine ausreichende Menge LTB₄ gebildet wurde und man zu reproduzierbaren und stabilen Resultaten kam. Abbildung 9 macht deutlich, dass sich die Bildung von LTB₄ mit verlängerter Inkubationszeit im Mittel bis zu einem gewissen Maß steigern ließ. Bei einer Inkubationszeit von 10 min und mehr ließ sich im Durchschnitt keine Verbesserung der Umsetzungsrate mehr erzielen.

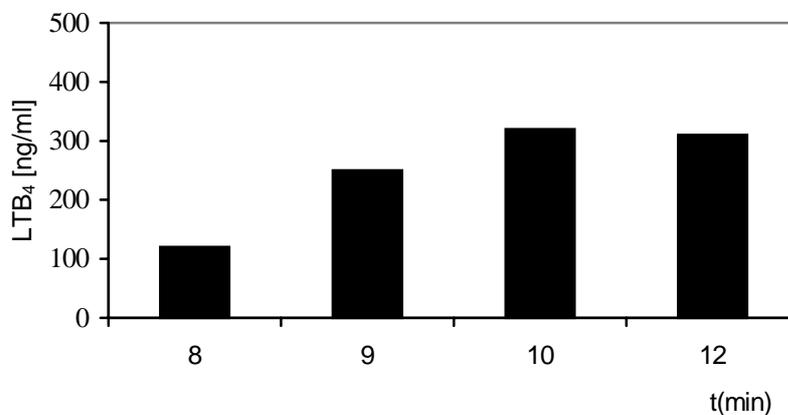


Abbildung 9: Auswirkung der Inkubationszeit auf die Leukotrienproduktion

Die im bisherigen Test gewählte Inkubationszeit von 8 min führte häufig zu LTB₄ Konzentrationen unterhalb des detektierbaren Bereiches bzw. zu instabilen Testergebnissen. Es wurde daher als neue Inkubationszeit 10 min gewählt.

Die Reaktion wurde anschließend mit 20 µl 10%iger Ameisensäure gestoppt.

3.3 Vorbereitung der Enzym Immunoassay Probelösung

Um die Probelösungen problemlos mit Hilfe des EIAs detektieren zu können, musste ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglichte, Zellbestandteile schnell und effektiv zu entfernen, um eine problemlose photometrische Auswertung des Immunoassays zu gewährleisten. Im bisherigen Testsystem wurde die Abtrennung der Zellbestandteile durch aufwändiges Ausschütteln der

Metabolite mit Ethylacetat erreicht. Diese Methode kam für den neu entwickelten Assay nicht in Betracht, da der verminderte Testansatz und die als Reaktionsgefäße gewählten Mikrotiterplatten dies nicht zuließen. Es zeigte sich, dass die Leukozytenbruchstücke durch Zentrifugieren der Mikrotiterplatte in einer Ultrazentrifuge befriedigend abgetrennt werden konnten. Eine Zentrifugationszeit von 15 min mit 1400 RPM war hierbei ausreichend.

Durch Einsatz von speziellen Zentrifugeneinsätzen für Mikrotiterplatten vermied man zudem, den Testansatz in ein anderes Behältnis zu überführen. Nach dem Zentrifugieren konnte der Zellüberstand problemlos abpipettiert und mit TRIS Puffer (pH 7,4) entsprechend der EIA-Kit Anforderungen verdünnt werden. Bei Verwendung des Testkits der Firma R&D Systems (siehe Abschnitt 2.5) war eine 10 fache Verdünnung ausreichend. Bei Verwendung des empfindlicheren Testkits der Firma Cayman Chemicals (siehe Abschnitt 3.5) war eine 300 fache Verdünnung notwendig.

3.4 Bestimmung der LTB₄ Konzentration mittels Enzym Immunoassay

Ein industriell gefertigter Testkit zur Bestimmung von LTB₄ wurde unter anderem von der Firma R&D Systems angeboten. Dieser Assay basiert auf einer kompetitiven Bindungstechnik, bei der das zu bestimmende LTB₄ mit einer bekannten Menge LTB₄, das mit alkalischer Phosphatase markiert ist, um Bindungsstellen an polyklonalen Kaninchenantikörpern konkurriert (Abb. 10).

Der Testkit ist spezifisch für LTB₄. Andere Leukotriene und mögliche Stoffwechselprodukte werden nur in sehr geringem Maß detektiert (Tab.3). Desweiteren reagierte der Kit mit keinem anderen Inhaltsstoff aus dem Assay, so dass der Zellüberstand nach dem Zentrifugieren direkt verdünnt und vermessen werden konnte.

Auch der durch das Abstoppen mit 10%iger Ameisensäure erhöhte pH Wert hatte nach Verdünnung des Überstandes keinen Einfluss auf das Funktionieren des Assays.

Entwicklung eines verbesserten 5-Lipoxygenase Screening Testsystems

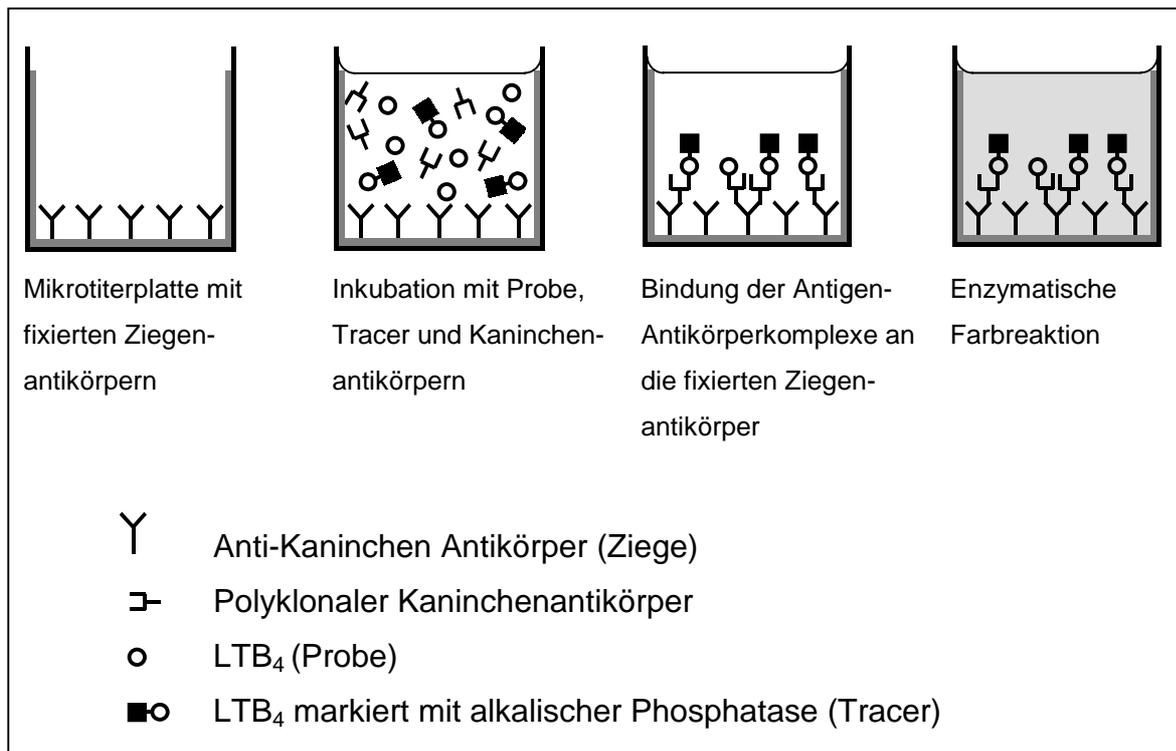


Abbildung 10: Prinzip des kompetitiven Enzym Immuno Assays

Metabolit	Spezifität [%]	
	R&D Systems	Cayman Chemicals
6-trans LTB ₄	79,3	3
6-trans-12-epi-LTB ₄	39	0,03
PGE ₂	3,02	-
PGF _{2α}	0,32	-
20-OH-LTB ₄	0,88	20
12-epi-LTB ₄	0,52	-
20-COOH-LTB ₄	<0,2	0,14
LTC ₄	<0,2	<0,01
LTD ₄	<0,2	<0,01
LTE ₄	<0,2	<0,01
5-(S)-HETE	<0,2	<0,01
12-(S)-HETE	<0,2	<0,01
15-(S)-HETE	<0,2	<0,01

Tabelle 3: Spezifität der LTB₄-Kits von R&D Systems und Cayman Chemicals (Angaben lt. Hersteller)

Die Platte des industriell hergestellten Kits ist mit (Anti-Kaninchen)-Ziegenantikörpern beschichtet. Bei der Inkubation werden zur Probe ein spezifischer LTB₄-Antikörper sowie eine bestimmte Menge LTB₄-Konjugat, wobei alkalische Phosphatase an LTB₄ gebunden ist, zugegeben. Der spezifische Antikörper lagert sich nun an den unspezifischen Antikörper der Plattenbeschichtung an. LTB₄ der Probe konkurriert daraufhin mit dem konjugierten LTB₄ um die Bindungsstellen des Antikörpers. Nach 2 Stunden werden überschüssiges LTB₄ der Probe und LTB₄-Konjugat mit einem Waschpuffer entfernt. Durch Zugabe von p-Nitrophenylphosphat, dem Enzymsubstrat, wird eine enzymatische Reaktion unter Bildung von p-Nitrophenol gestartet (Abb.11), mit dessen Hilfe die Aktivität des gebundenen Enzyms bestimmt werden kann. Durch Zugabe von NaOH zur Abstopfung der Reaktion wird die Farbe durch Entstehung des mesomeriestabilisierten 4-Nitrophenolat-Anions noch weiter verstärkt. Die Intensität der Farbe ist somit umgekehrt proportional zur Konzentration des LTB₄. Sie kann bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem ELISA-Reader, einem Durchlichtphotometer für Mikrotiterplatten, vermessen werden.

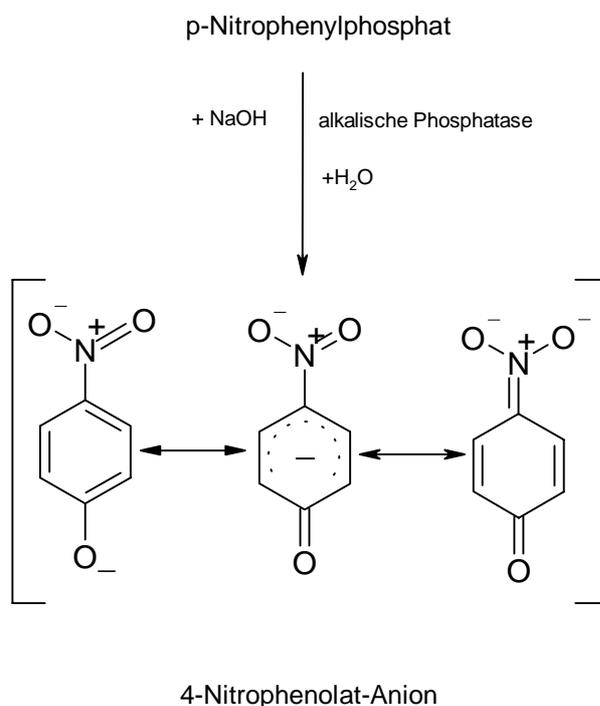


Abbildung 11: Durch alkalische Phosphatase katalysierte Reaktion

Auf Grund der Schwankungen innerhalb der Reagenzien und der Beschichtung der Platte zwischen verschiedenen EIA-Chargen muss für jede neue Platte eine Standardreihe erstellt werden. Zudem werden mit jedem neuen Kit verschiedene Plattenparameter und der einwandfreie Zustand der Reagenzien geprüft.

Wichtige Plattenparameter

Leerwert (BL):

Hierbei erfolgt die Inkubation ohne spezifische Antikörper, Assaypuffer und konjugiertes LTB₄. Mit diesem Wert kann die nichtenzymatische Zersetzung von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) sowie die Durchsichtigkeit der Platte geprüft werden. Alle weiteren ermittelten Werte werden mit diesem Wert abgeglichen.

Höchstaktivität (TA):

Dieser Wert dient dazu, die Aktivität des konjugierten Enzyms zu überprüfen. Konjugiertes LTB₄ wird hierzu direkt mit dem Enzymsubstrat (pNPP) versetzt.

Unspezifische Bindung:

Um unspezifische Bindung auszuschließen oder zu überprüfen, wird hier der spezifische Antikörper weggelassen. An die beschichtete Platte sollten weder LTB₄ noch konjugiertes LTB₄ binden können.

Maximale Bindung (B₀):

Mit diesem Wert wird festgelegt, wieviel markiertes LTB₄ maximal an den Antikörper binden kann. Dazu werden nur spezifischer Antikörper und konjugiertes LTB₄ zusammen gegeben. Da konkurrierendes LTB₄ aus einer Probe fehlt, wird maximal viel markiertes LTB₄ gebunden und pNPP umgesetzt. Der ermittelte Wert wird bei der Auswertung der Platte als 100% Bindung festgelegt, alle weiteren Werte werden hierauf bezogen.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Easy Win) der Firma Tecan, hierbei wurden folgende Rechenschritte durchgeführt:

Leerwertabgleich:	$MW - BL \text{ (Leerwert)} = MW_{\text{korr.}}$
Korrektur der maximalen Bindung:	$B_0 - NSB = B_{0 \text{ korr.}}$
Korrektur aller Messwerte:	$MW_{\text{korr.}} - NSB = B$
Eigentlicher Messwert	$B/B_{0 \text{ korr.}} * 100\%$

Die durch die Standardreihe erhaltenen Werte werden semilogarithmisch aufgetragen und die Konzentration der einzelnen Messwerte rechnerunterstützt abgelesen. Abbildung 12 zeigt, dass der lineare Bereich der Standardkurve zwischen 20 und 85 % B/B_0 liegt. Es konnten daher nur Messwerte berücksichtigt werden, die innerhalb dieses Bereiches lagen.

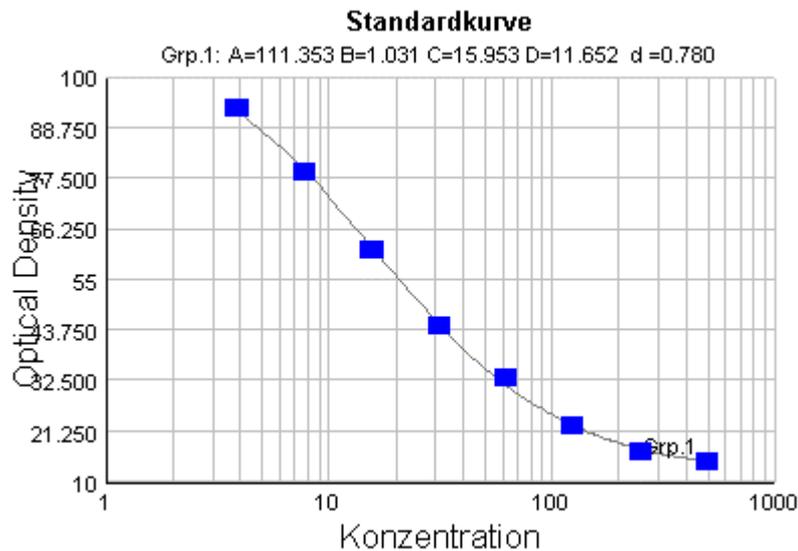


Abbildung 12: Standardkurve des LTB₄-EIA der Firma R&D, Konzentration in pg/ml

Die Verdünnung der Proben musste daher so gestaltet werden, dass die Konzentration an enthaltenem LTB₄ innerhalb der Detektionsgrenzen des Testkits lag. Für den Assay der Firma R&D Systems erwies sich hierbei eine Verdünnung um den Faktor 10 als ausreichend.

Mit den erhaltenen Messwerten konnte somit direkt die LTB₄ Konzentration der einzelnen Proben und die daraus resultierende inhibitorische Wirkung der getesteten Extrakte bzw. Substanzen berechnet werden.

3.5 Endgültige Durchführung des Assays

3.5.1 Testdurchführung

Als optimierte Parameter des Assays wurden schließlich die in Tabelle 4 gezeigten Werte gewählt:

25 µl	Leukozytensuspension	20000 Zellen/µl
10 µl	CaCl ₂	2 mM
10 µl	ETYA	10 µM
5 µl	Probe/Ethanol p.a.	
10 µl	Ca Ionophor A 23187	17 µM
5 µl	Arachidonsäure	120 µM
10 min Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad		
Abstoppen der Reaktion mit 20 µl 10%iger Ameisensäure		
15 min zentrifugieren bei 1400 RPM		
Verdünnung des Überstandes und Durchführung des LTB ₄ EIA		

Tabelle 4: Optimierte Parameter des 5-LOX Assays

3.5.2 Plattendesign

Um ein problemloses Pipettieren und anschließendes Auswerten des Assays zu gewährleisten, wurde das in Abbildung 13 gezeigte Plattendesign zu Grunde gelegt.

Die Standardreihe und alle weiteren Plattenparameter wurden hierbei, wie vom Hersteller vorgeschlagen, jeweils doppelt bestimmt.

Am Ende jeder Reihe lag eine Negativkontrolle (Ko). Bei der Berechnung der Hemmwerte wurden jeweils alle Werte einer Reihe auf den entsprechenden Hemmwert bezogen, es zeigte sich, dass auf diese Weise reproduzierbare und stabile Werte erhalten wurden. Etwaige Pipettierfehler konnten so am ehesten

ausgeglichen werden, zudem wurden die Werte aufeinander bezogen, die in einem möglichst kleinen Zeitfenster bearbeitet wurden.

Std	Std	Bl	Bl	○	○	○	○	○	○	○	○
Std	Std	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Std	Std	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Std	Std	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Std	Std	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B ₀	B ₀	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
NSB	NSB	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
TA	TA	Ko									

PROBEN

Abbildung 13: Plattendesign für den 5-LOX Assay

Am Anfang und am Ende der zu bestimmenden Proben wurde bei jedem Test NDGA (Norgihydroguaiaretsäure) als Positivkontrolle eingesetzt, um Aussagen über die Qualität der jeweils im Assay erhaltenen Ergebnisse treffen zu können.

3.5.3 Nordihydroguaiaretsäure

Nach Optimierung aller Testparameter wurde für die Positivkontrolle NDGA ein IC_{50} von $0,53 \mu M$ ermittelt. Dieser Wert lag somit im Bereich der Aktivität im ursprünglichen Testsystem. Werte, die im alten und im neuen Testsystem ermittelt wurden, konnten somit miteinander verglichen werden.

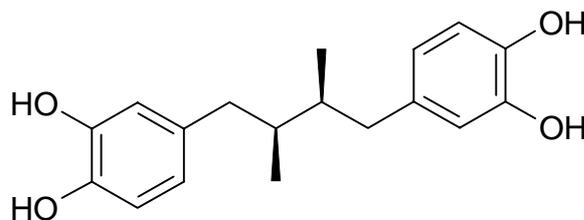


Abbildung 14: Nordihydroguaiaretsäure

3.6 Umstellung der Detektion

Durch eine Umstellung des EIA Kits der Firma R&D-Systems durch den Hersteller waren wir gezwungen, uns nach einer anderen Detektionsmöglichkeit umzusehen. Das im ursprünglichen Assay vorliegende Detektionsfenster von 200-100000 pg/ml LTB₄ wurde zu Gunsten einer höheren Empfindlichkeit abgeändert. Im neuen Assay lag der zu bestimmende Konzentrationsbereich nur noch zwischen 50-800 pg LTB₄ / ml. Dies brachte zum einen den Nachteil mit sich, dass eine 10fache Verdünnung des Überstandes des 5-LOX-Assays nicht mehr ausreichend war und weitere Verdünnungsschritte notwendig wurden. Viel schwerwiegender war allerdings die Tatsache, dass der detektierbare Bereich des EIA stark verkleinert worden war. Wie bereits erwähnt, waren die absoluten Werte an gebildetem LTB₄ großen Schwankungen unterworfen. Es erwies sich als schwierig, die benötigte Verdünnung des Probenüberstandes vorauszusagen, da die erreichte LTB₄-Konzentration der Proben häufig unter bzw. über der jeweiligen Detektionsgrenze lag.

Wir entschieden uns daher für einen LTB₄-EIA-Kit der Firma Cayman Chemicals. Auch bei diesem Kit handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay. Als Detektionsenzym ist hier allerdings Acetylcholinesterase (AChE) an LTB₄ konjugiert. Bei Zugabe von Ellmans Reagenz spaltet AChE das enthaltene Acetylcholin. Das entstandene Thiocholin lagert sich an die 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) an. Die dadurch entstehende 5-Thio-2-nitrobenzoesäure absorbiert stark bei 412 nm. Allerdings war auch der EIA der Firma Cayman empfindlicher als der ursprünglich verwendete Assay (Nachweisgrenze 4 pg/ml). Statt einer 10fachen Verdünnung des Probenüberstandes musste dieser nun 1:300 verdünnt werden. Es waren daher weitere Verdünnungsschritte notwendig. Zudem war die Inkubationszeit des Cayman-EIAs mit 18 Stunden wesentlich höher als die des ursprünglich verwendeten Kits, dessen Inkubationszeit bei 2 Stunden lag.

4 Zusammenfassung

Mit dem hier entwickelten 5-LOX Assay konnte ein durchsatzstarkes und stabiles Testsystem etabliert werden, mit dessen Hilfe in großem Umfang Pflanzenextrakte und Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese getestet werden können.

Der 5-LOX Screening Assay wurde auf der Grundlage des von Fessler 1987 etablierten Testsystems entwickelt. Dieses Testdesign arbeitete mit Schweineleukozyten als Enzymquelle, die Detektion der Metaboliten erfolgte durch Radioaktivitätsmessung mit Hilfe eines entsprechenden HPLC-Systems.

Im modifizierten Testsystem wurde die Detektion von LTB₄ mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays vorgenommen. Dadurch konnte auf den Einsatz von radioaktiv markierter Arachidonsäure verzichtet werden, was auch die hohen Sicherheitsvorkehrungen und die aufwändige Entsorgung des Abfalls überflüssig machte.

Lag die Konzentration der gebildeten Metabolite beim ursprünglichen Testsystem bereits an der Detektionsgrenze der HPLC-Methode, so konnten durch Konzentrationsbestimmung mittels EIA die nachweisbaren Mengen der Umsetzungsprodukte noch weiter gesenkt werden. Dies ermöglichte eine Verkleinerung des Testansatzes von 2,5 ml auf 265 µl pro Probe. Der Assay konnte dadurch nun im Mikrotitermaßstab durchgeführt werden, was die Handhabung stark vereinfachte. Auch die Probenzahl konnte damit entscheidend erhöht werden.

Im neuen Testdesign wurde die Probenaufarbeitung wesentlich vereinfacht. War zuvor noch aufwändiges Ausschütteln der Metabolite mit Ethylacetat und anschließendes Einrotieren notwendig, konnte jetzt der entsprechend verdünnte Überstand direkt vermessen werden, da der verwendete Kit so spezifisch ist, dass er nur mit dem gebildeten LTB₄ reagiert. Ein Nachteil war hierbei allerdings, dass nun nur noch LTB₄ bestimmt werden konnte. Bei der vormals verwendeten HPLC Methode konnte auch die Menge an gebildeter 5-HETE ermittelt und der Umfang der Arachidonsäureumsetzung genauer kontrolliert werden. Tabelle 5 zeigt einen Vergleich zwischen dem bisherigen und dem neuen Testdesign.

Das neue Design des Screening Assays ermöglicht eine vollständige Automatisierung der Durchführung und ist für den Einsatz von Pipettierrobotern geeignet.

	Bisheriges Testdesign	Neues Testdesign
Detektion	HPLC	EIA
Substrat	¹⁴ C Arachidonsäure	„kalte“ Arachidonsäure
Assaymaßstab	2,5 ml/Probe	Mikrotitermaßstab
Probenaufarbeitung	sehr aufwändig	nicht nötig
Zeitaufwand	8h (reine Arbeitszeit)	2,5h (reine Arbeitszeit)
Max.Probenmenge/ Testdurchführung	24	66
Detektierte Stoffe	Arachidonsäure 5-HETE LTB ₄	LTB ₄
Auswertung	„von Hand“	direkt rechnerunterstützt
Einsatz eines Pipettierroboters	nicht möglich	möglich

Tabelle 5: Vergleich zwischen neuem und altem Testsystem

D Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

1 Zielsetzung und Motivation

Traditionell angewandte Arzneipflanzen bieten eine Grundlage für viele alternative Behandlungswege, die meist nur in jahrhundertelangen empirischen Beobachtungen begründet sind. Für die Wissenschaft stellt sich dabei die Frage nach einer rationellen Erklärung für diesen Einsatz. Zudem können volksmedizinisch verwandte Drogen eine interessante Quelle für neue Wirkstoffe und Leitstrukturen darstellen.

In einem umfassenden pharmakologischen Screening sollten daher Arzneidrogen, die in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) seit langem als entzündungshemmende Arzneimittel angewandt werden, auf ihre Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese untersucht werden, um so eine Aussage darüber zu machen, ob es eine Korrelation zwischen traditionellem Indikationsgebiet und Aktivität in diesem Testsystem gibt und somit ein entsprechender Wirkmechanismus vorliegt.

Darüber hinaus sollte dieses Screening dazu dienen, eine besonders potente und interessante Droge auszuwählen, um diese dann näher pharmakologisch und phytochemisch zu untersuchen und neue Leitstrukturen zu isolieren.

2 Auswahl der entzündungshemmend wirkenden Drogen

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Drogen wurde besonderes Augenmerk auf solche gelegt, die bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen und rheumatischen Leiden eingesetzt werden.

Von den schätzungsweise 7000 in China volksmedizinisch verwendeten Pflanzenarten werden über 1300 zur Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises verwendet (But *et al.*, 1980) Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden insbesondere Drogen untersucht, die in der einzigen deutschen TCM Klinik in Kötzing häufig und mit Erfolg eingesetzt wurden.

2.1 Drogen und ihre Inhaltsstoffe

Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Familie oder ein bestimmtes zu erwartendes Inhaltsstoffmuster spielte bei der Zusammenstellung der zu untersuchenden Drogen keine Rolle. Ausschlaggebend war vielmehr, dass die Droge bei Indikationen Anwendung findet, bei denen eine Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese als Wirkmechanismus möglich erschien.

Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die untersuchten Drogen, deren Stammpflanzen und Familien, sowie deren bereits identifizierte Inhaltsstoffgruppen bzw. Inhaltsstoffe.

Droge	Stammpflanze	Familie	Bekannte Inhaltsstoffe/ Stoffgruppen
Achyranthis bidentatae radix	Achyranthes bidentata	Amaranthaceae	Triterpene, Saponine
Aconiti kusnezoffii praeparatae radix	Aconitum kusnezoffii	Ranunculaceae	Diterpenalkaloide
Acori graminei rhizoma	Acorus gramineus	Araceae	Äth. Öl, Asaron
Agrimoniae herba	Agrimonia pilosa	Rosaceae	Phenole, Flavonoidglycoside, Kaffeensäurederivate
Angelicae dahuricae radix	Angelica dahurica	Apiaceae	Furanocumarine, Cumaringlycoside, Lactone
Arctii fructus	Arctium lappa	Asteraceae	Lignane, Sesquiterpene, Triterpene, Polyene, Polysaccharide
Artemisiae herba	Artemisia annua	Asteraceae	Sesquiterpenlactone, Sesquiterpene, äth. Öl, Flavonoide, Cumarine, Polyacetylene
Atractylodis	Atractylodes	Asteraceae	Äth. Öl,

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

macrocephalae rhizoma	macrocephala		Polyacetylene, Chinone
Bupleuri radix	Bupleurum chinensis, B. scorzonerifolium	Apiaceae	Triterpensaponine
Cephalanoploris herba	Cephalanoplos segetum, C. setasum	Asteraceae	Alkaloide, Chinolin, Saponine
Chaenomelis fructus	Chaenomeles speciosa	Rosaceae	Saponine, Flavone, Oleanolsäure
Cimicifugae rhizoma	Cimicifuga heracleifolia, C. dahurica, C. foetida	Ranunculaceae	Triterpene, Phenolcarbonsäuren, Furochromene, Alkaloide
Cinnamomi ramulus	Cinnamomum cassia	Lauraceae	Äth. Öl, Cumarin, Protocatechusäure, Vanillin
Clematidis radix	Clematis sinensis	Ranunculaceae	Saponine, Oleanolsäure
Cnidii fructus	Cnidium monnieri	Apiaceae	Äth. Öl, Cumarine, Monoterpene, Hemiterpene, Benzofuranderivate
Coptidis rhizoma	Coptis chinensis, C. deltaoidea, C. teeta	Ranunculaceae	Alkaloide, Phenole, Ferulasäure
Cuscutae semen	Cuscuta chinensis	Convolvulaceae	Flavonoide, Lignane, Alkaloide, Phenolsäuren,
Cyperi rhizoma	Cyperus rotundus	Cyperaceae	Äth. Öl
Dictamni radices cortex	Dictamnus dasycarpus	Rutaceae	Alkaloide, Cumarine, Saponine, äth. Öl
Erythrinae cortex	Erythrina variegata, E. arborescens	Fabaceae	Alkaloide, Saponine

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

Eucommiae cortex	Eucommia ulmoides	Eucommiaceae	Lignane, Iridoide, Betulin, Ursolsäure, Vanillinsäure
Evodiae fructus	Evodia rutaecarpa	Rutaceae	Alkaloide, Flavonoide
Fraxini cortex	Fraxinus rhynchophylla, F. chinensis, F. stylosa	Oleaceae	Cumarine
Gardeniae fructus	Gardenia jasminoides	Rubiaceae	Iridoidglycoside, Kaffeesäurederivate
Indigo naturalis			
Isatidis folium	Isatis indigotica	Brassicaceae	Indolchinolinalkaloide
Leonuri herba	Leonurus heterophyllus	Lamiaceae	Alkaloide
Linderae radix	Lindera aggregata	Lauraceae	Äth. Öl, Sesquiterpene
Lonicerae flos	Lonicera japonica, L. confusa, L. hypoglauca, L. dasycarpa	Caprifoliaceae	Äth. Öl, Flavanone, Iridoidglycoside, Saponine
Lophateri herba	Lophaterum gracile	Poacea	Triterpene
Lycii radices cortex	Lycium chinense	Solanaceae	Sesquiterpene, Zimtsäure
Lysimachiae herba	Lysimachia christiana	Primulaceae	Flavone, Tannine, äth. Öl
Mori radices cortex	Morus alba	Moraceae	Flavone, Flavanone, Chalcone, Benzofurane, Umbelliferon, Alkaloide, Chromene
Morindae officinalis radix	Morinda officinalis	Rubiaceae	Alkaloide
Perillae fructus	Perilla frutescens	Lamiaceae	Fettes Öl, Fettsäuren
Peucedani radix	Peucedanum praeruptorium, P. decursivum	Apiaceae	Cumarine

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

Phellodendri cortex	Phellodendron chinense	Rutaceae	Alkaloide, Flavone, Triterpene
Platycodi radix	Platycodon grandiflorum	Campanulaceae	Triterpensaponine, Polysaccharide,
Puerariae radix	Pueraria lobata, P. thomsonii	Fabaceae	Isoflavonoide, Saponine, Cumarine, Glykoside
Rehmanniae radix	Rehmannia glutinosa	Scrophulariaceae	Iridoidglycoside, Phenolglycoside, Monoterpenglycoside
Rubiae radix	Rubia cordifolia	Rubiaceae	Anthrachinone, Triterpene
Salviae miltiorrhizae radix	Salvia miltiorrhiza	Lamiaceae	Tanshinone, Kaffesäurederivate
Schizonepetae herba	Schizonepeta tenuifolia	Lamiaceae	Äth. Öl, Flavone, Benzofurane
Scrophulariae radix	Scrophularia ninpoensis, S. buergeriana	Scrophulariaceae	Äth. Öl, Alkaloide, Flavonoide, Iridoidglycoside
Sophorae flavescentis radix	Sophora flavescens	Fabaceae	Chinolizidinalkaloide, Flavanoide, Saponine
Taraxaci herba	Taraxacum mongolicum, T. sinicum	Asteraceae	Sequiterpensäuren, Triterpene, Kaffeesäure, Flavanoide
Typhae pollen	Typha angustifolia, T. orientalis	Typhaceae	Flavone, Alkaloide, Phytosterole
Uncariae cum uncis ramulus	Uncaria rhynchophylla, U. macrophylla, U. hirsuta, U. sinensis, U. sessilifructus	Rubiaceae	Alkaloide, Cumarine

Violae herba	Viola yedoensis	Violaceae	Saponine, Flavonoide, Gerbstoffe
Xanthii fructus	Xanthium sibiricum	Asteraceae	Alkaloide, Sesquiterpene
Zanthoxyli pericarpium	Zanthoxylum armatum	Rutaceae	Alkaloide, Cumarine, Flavonoide, Lignane
Zingiberis rhizoma	Zingiber officinalis	Zingiberaceae	Gingerole, äth. Öl

Tabelle 6: Im Screening untersuchte Pflanzen und ihre bereits bekannten Inhaltsstoffe/-stoffgruppen.

2.2 Anwendung und Wirkung der untersuchten Drogen in der TCM

Die Indikationen der TCM sind wegen der unterschiedlichen Theoriegebäude nicht unmittelbar mit denen der westlichen Medizin vergleichbar. So gibt es in der traditionellen chinesischen Medizin nicht den Begriff der „Entzündung“. Daher wurde versucht, die innerhalb der traditionellen chinesischen Medizin beschriebenen Anwendungen auf diejenigen Indikationen der westlichen Medizin zu übertragen, die für die Problemstellung der vorliegenden Arbeit von Interesse waren, also im besonderen eine antiinflammatorische, anti-rheumatische, antiasthmatische und antiallergische Wirkung zum Inhalt hatten. Tabelle 7 zeigt eine Aufstellung der in der traditionellen chinesischen Medizin beschriebenen Wirkung der einzelnen Drogen. Neben der besonders berücksichtigten antiinflammatorischen Wirkungen werden auch die jeweiligen Hauptindikationen für den Einsatz der Droge aufgeführt.

Die angegebenen Wirkungen sind entnommen aus Huang, 1993; Tang *et al.*, 1992; Zhu, 1998; und der Pharmacopoeia of the Peoples's Republic of China, 1997.

Droge	Chinesischer Name	antiinflammatorisch	antirheumatisch	Atemwege	Antiallergisch	Andere Anwendungen/ Wirkungen
Achyranthis bidentatae radix	Niuxi	●	●			durchblutungsfördernd
Aconiti kusnezoffii praeparatae radix	Zhicaowu	●	●			antiarrhythmisch, sedativ
Acori graminei rhizoma	Shichangpu			●		Menstruationsprobleme Appetitlosigkeit
Agrimoniae herba	Xianhecao					antibakteriell, Malaria
Anemarrhenae rhizoma	Zhimu					antipyretisch, sedativ, diuretisch
Angelicae dahuricae radix	Baizhi	●			●	analgetisch, antipyretisch
Arctii fructus	Niubangzi	●		●		antiulcerativ
Artemisiae herba	Qinghao	●				Malaria
Atractylodis macrocephalae rhizoma	Baizhu	●				Verdauungsstörungen
Bupleuri radix	Chaihu	●				Prämenstruelles Syndrom
Cephalanoploris herba	Xiaoji	●				antibakteriell, Verdauungsstörungen
Chaenomelis fructus	Mugua	●	●			Durchfall und Erbrechen
Cimicifugae rhizoma	Shengma	●				Masern
Cinnamomi ramulus	Guizhi		●			analgetisch, antipyretisch

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidroge

Clematidis radix	Weilingxian	●	●			
Cnidii fructus	Shechuangzi	●				antifungal, antiviral, Impotenz
Coptidis rhizoma	Huanglian	●				antiviral, antibakteriell
Cuscutae semen	Tusizi					hepatoprotektiv, Regulation der Nierentätigkeit
Cyperi rhizoma	Xiangfu	●				Menstruationsprobleme
Dictamni radice cortex	Baixianpi	●	●		●	Röteln
Erythrinae cortex	Haitongpi	●	●			diuretisch
Eucommiae cortex	Duzhong	●				diuretisch
Evodiae fructus	Wuzhuyu					analgetisch, antipyretisch, adstringierend
Fraxini cortex	Qinpi	●		●		antibakteriell, analgetisch
Gardeniae fructus	Zhizi	●				antipyretisch, antifungal
Indigo naturalis	Qingdai	●				antibakteriell, anticonvulsiv
Isatidis folium	Daqingye	●				antiviral, antibakteriell, antifungal
Leonuri herba	Yimucao	●				diuretisch, Menstruationsstörungen
Linderae radix	Wuyao					analgetisch
Lonicerae flos	Jiyinhua	●				antiviral, analgetisch
Lophateri herba	Danzhuye					antipyretisch, antibakteriell

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

Lycii radicis cortex	Digupi					Tonikum, hypoglykämisch
Lysimachiae herba	Jinqiancao	●				choleretisch
Mori radicis cortex	Sangbaipi	●		●		diuretisch
Morindae officinalis radix	Bajitian		●			Impotenz, Unfuchtbarkeit
Perillae fructus	Zisuzi	●		●		antibakteriell
Peucedani radix	Qianhu	●		●		krampflösend
Phellodendri cortex	Huangbai	●				Hautkrankheiten
Platycodi radix	Jiegeng	●			●	bei Erkältungen
Puerariae radix	Gegen	●				Diabetes, antipyretisch
Rehmanniae radix	Dihuang	●				antidiabetisch
Rubiae radix	Qiancao		●			Nasenbluten, Menstruationsprobleme
Salviae miltiorrhizae radix	Danshen	●				hepatoprotektiv, koronare Herzkrankheiten
Schizonepetae herba	Jingjie	●				analgetisch
Scrophulariae radix	Xuanshen	●				antidiabetisch
Sophorae flavescens radix	Kushen	●		●		antiarrhythmisch, antibakteriell
Taraxaci herba	Pugongying	●				choleretisch
Typhae pollen	Puhuang	●			●	antiödematös
Uncariae cum uncis ramulus	Gouteng					antipyretisch, analgetisch

Violae herba	Zihuadiding	●		●		analgetisch, sedativ
Xanthii fructus	Cangerzi	●	●	●		antidiabetisch
Zanthoxyli pericarpium	Huajiao	●	●		●	Erbrechen, Diarrhoe
Zingiberis rhizoma	Ganjiang	●		●		antipyretisch, analgetisch

Tabelle 7: Anwendung der für das Screening ausgewählten Arzneidrogen

3 Pharmakologisches Screening der Extrakte

Die Drogen wurden jeweils sukzessive mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol extrahiert. Mit diesem Verfahren wurden die Inhaltsstoffe gemäß ihrer ansteigenden Polarität fraktioniert extrahiert. Durch das Screening der verschiedenen Extrakte konnte somit sehr schnell aufgezeigt werden, ob wirksame Inhaltstofffraktionen im lipophileren oder polarerer Bereich zu finden sind.

Alle Extrakte wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese überprüft. Die Ergebnisse vorausgehender Arbeiten (Resch, 1999; Zschocke, 1998; Stöhr 1999) ließen vermuten, dass die wirksamen Inhaltstofffraktionen hauptsächlich im lipophilen Bereich zu finden waren.

3.1 *n*-Hexan-Extrakte

Die *n*-Hexan-Extrakte der bearbeiteten Drogen wurden in einer Konzentration von 5 µg / ml getestet. Das pharmakologische Screening wurde noch mit dem in Kapitel C beschriebenen 5-Lipoxygenase Assay mit radioaktiv markierter Arachidonsäure durchgeführt, da der neu entwickelte Test zu Beginn der Untersuchung noch nicht zur Verfügung stand. Einige ausgewählte Extrakte wurden später nochmals im neu entwickelten Mikrotiter-Screening-Assay eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse aufzuzeigen. Tabelle 8 zeigt die im Screening ermittelten Hemmwirkungen der *n*-Hexan-Extrakte.

Pharmakologisches Screening traditionell angewandter chinesischer Arzneidrogen

	Drogenname	Hem[%]
1	Achyranthis bidentatae radix	14,3
2	Aconiti kusnezoffii praep. rad.	6,8
3	Acori graminei rhizoma	6,3
4	Agrimoniae herba	2,3
5	Angelicae dahuricae radix	15,7
6	Arctii fructus	7
7	Artemisiae herba	34,4
8	Atractylodis macrocephalae rhiz.	15,6
9	Bupleuri radix	28,8
10	Cephalanoploris herba	22,5
11	Chaenomelis fructus	13,9
12	Cimicifugae rhizoma	29,5
13	Cinnamomi ramulus	9,2
14	Clematidis radix	8,5
15	Cnidii fructus	4,7
16	Coptidis rhizoma	34,5
17	Cuscutae semen	31,6
18	Cyperii rhizoma	4,7
19	Dictamni radices cortex	8,1
20	Erythrinae cortex	11,4
21	Eucommiae cortex	24,1
22	Evodiae fructus	37,2
23	Fraxini cortex	66,6
24	Gardeniae fructus	12,3
25	Indigo naturalis	45,2
26	Isatidis folium	7,1
27	Leonuri herba	15,1
28	Linderae radix	8,7
29	Lonicerae flos	9,7
30	Lophateri herba	4,2
31	Lycii radices cortex	4
32	Lysimachiae herba	3,7
33	Mori radices cortex	54,9
34	Morindae officinalis radix	49,3
35	Perillae fructus	30,3
36	Peucedani radix	25,1
37	Phellodendri cortex	4,1
38	Platycodi radix	48,3
39	Puerariae radix	26,7
40	Rehmanniae radix	16,3
41	Rubiae radix	87,7
42	Salviae miltiorrhizae radix	61,9
43	Schizonepetae herba	10
44	Scrophulariae radix	15,8
45	Sophorae flavescens radix	11,8
46	Taraxaci herba	9,9
47	Typhae pollen	27,5
48	Uncariae cum unci ramulus	27,2
49	Violae herba	34,9
50	Xanthii fructus	51,6
51	Zanthoxyli pericarpium	70,5
52	Zingiberis rhizoma	66,3

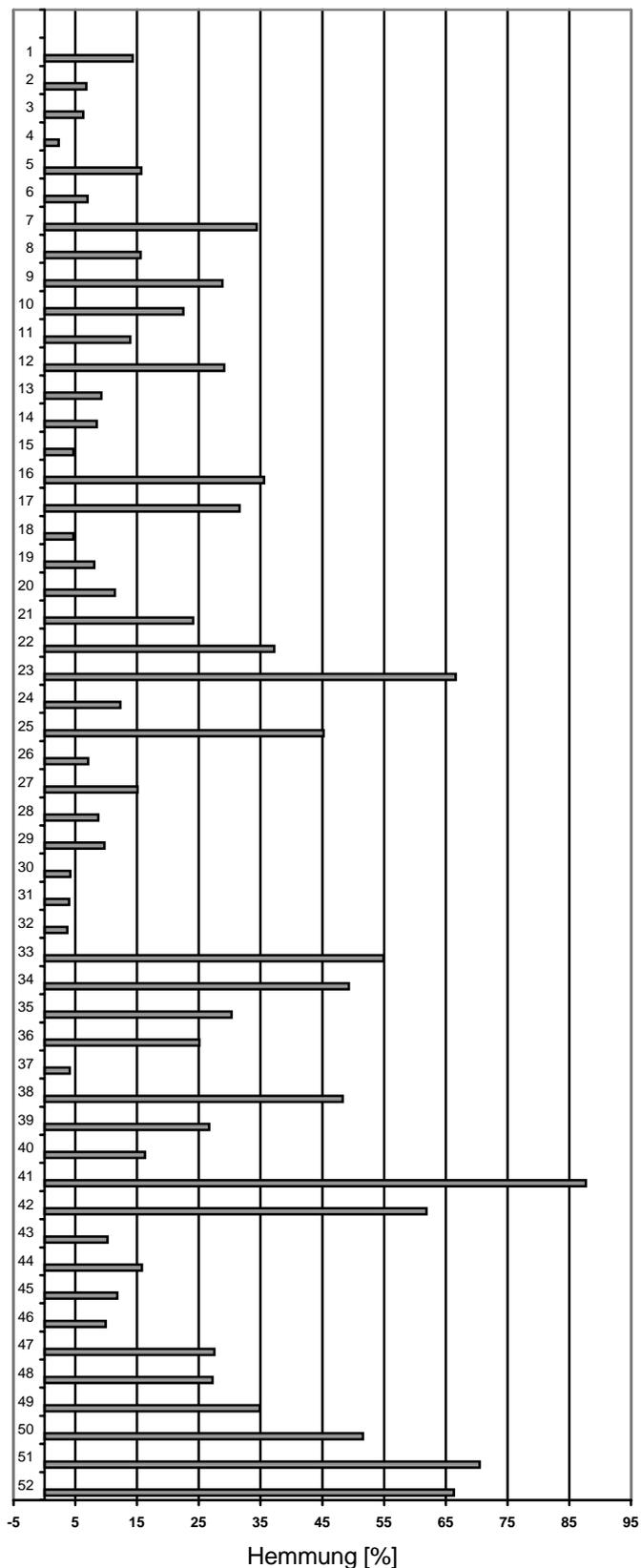


Tabelle 8: Hemmende Eigenschaften der n-Hexanextrakte auf die Leukotrienbiosynthese bei einer Testkonzentration von 5 µg/ml (Hemmung in %)

Wir erwartet zeigten nur wenige Extrakte bei der gewählten niedrigen Testkonzentration eine sehr gute Hemmung. Eine Auswahl der aktivsten Drogen zeigt Tabelle 9.

Droge	Hemmung[%]
Fraxini cortex	66,6
Mori radices cortex	54,9
Morindae officinalis radix	49,3
Platycodi radix	48,3
Rubiae radix	87,7
Salviae miltiorrhizae radix	61,9
Xanthii fructus	51,6
Zanthoxyli pericarpium	70,5
Zingiberis rhizoma	66,3

Tabelle 9: Auswahl der am besten wirksamen *n*-Hexanextrakte

3.1.1 Dichlormethanextrakte

Die Dichlormethanextrakte wurden zum Teil noch mit dem in Kapitel C beschriebenen 5-Lipoxygenase Assay mit radioaktiv markierter Arachidonsäure getestet. Die erzielten Ergebnisse wurden später im weiterentwickelten Assay überprüft. Zum Screening wurden die Extrakte mit Ethanol p.a. auf eine Konzentration von 0,53 mg/ml eingestellt, was einer Testkonzentration von 10 µg/ml entspricht. Alle Extrakte wurden auch hier in mindestens drei unterschiedlichen Testläufen getestet. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Wirkung der DCM-Extrakte im Screeningassay. Eine Auswahl der aktivsten Dichlormethanextrakte zeigt Tabelle 11.

	Drogenname	Hem[%]
1	Achyranthis bidentatae radix	12,1
2	Aconiti kusnezoffii praep. rad.	17,4
3	Acori graminei rhizoma	66,3
4	Agrimoniae herba	20,3
5	Angelicae dahuricae radix	19,5
6	Arctii fructus	30,5
7	Artemisiae herba	51,3
8	Atractylodis macrocephalae rhiz.	25,7
9	Bupleuri radix	24,2
10	Cephalanoploris herba	34,4
11	Chaenomelis fructus	10,2
12	Cimicifugae rhizoma	5,4
13	Cinnamomi ramulus	9,2
14	Clematidis radix	17,8
15	Cnidii fructus	46,4
16	Coptidis rhizoma	37,8
17	Cuscutae semen	7,2
18	Cyperii rhizoma	4,3
19	Dictamni radices cortex	2,6
20	Erythrinae cortex	49,8
21	Eucommiae cortex	17,2
22	Evodiae fructus	44,5
23	Fraxini cortex	5,2
24	Gardeniae fructus	44,5
25	Indigo naturalis	73,3
26	Isatidis folium	44,1
27	Leonuri herba	15,4
28	Linderae radix	5,3
29	Lonicerae flos	26,7
30	Lophateri herba	4,2
31	Lycii radices cortex	4,9
32	Lysimachiae herba	34,6
33	Mori radices cortex	91,3
34	Morindae officinalis radix	25,4
35	Perillae fructus	15,2
36	Peucedani radix	14,5
37	Phellodendri cortex	2,1
38	Platycodi radix	47,9
39	Puerariae radix	20,4
40	Rehmanniae radix	27,1
41	Rubiae radix	44,9
42	Salviae miltiorrhizae radix	60,2
43	Schizonepetae herba	7,2
44	Scrophulariae radix	30,2
45	Sophorae flavescents radix	88,7
46	Taraxaci herba	5,7
47	Typhae pollen	16,2
48	Uncariae cum unci ramulus	12,3
49	Viola herba	45,9
50	Xanthii fructus	30,2
51	Zanthoxyli pericarpium	40,3
52	Zingiberis rhizoma	70,3

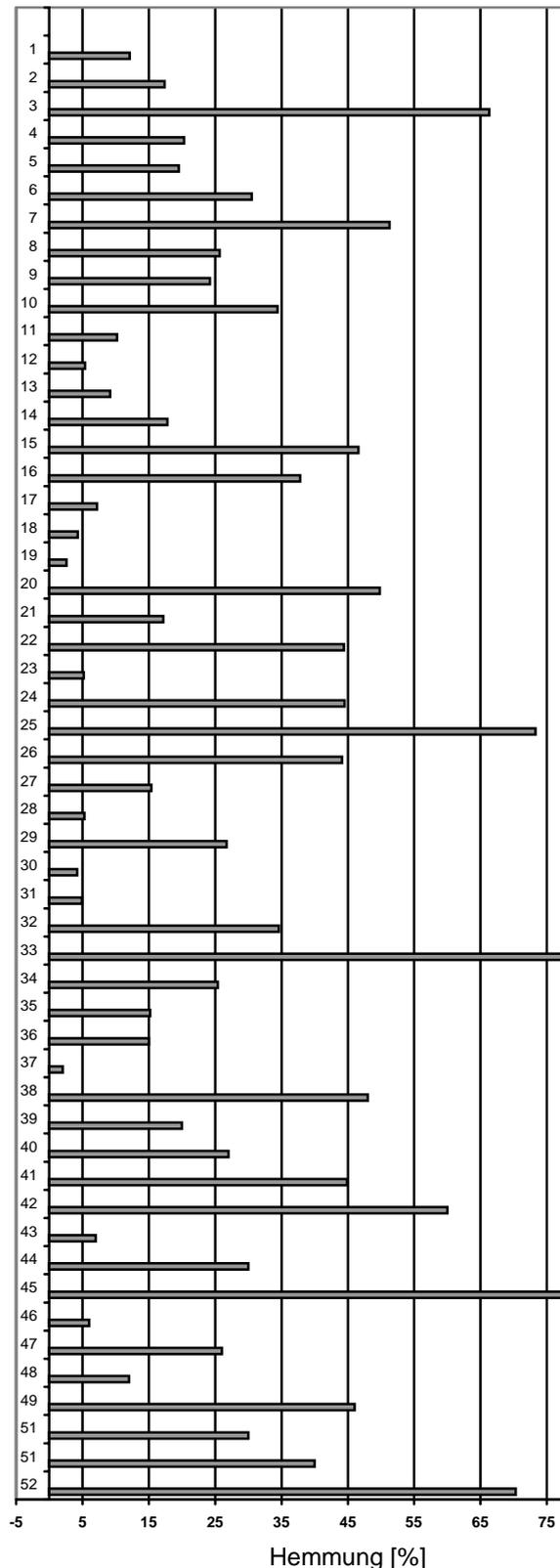


Tabelle 10: Hemmende Eigenschaften der Dichlormethanextrakte auf die Leukotrienbiosynthese bei einer Testkonzentration von 10 µg/ml

Drogenname	Chinesischer Name	Hemmg.[%]
Acori gramin.	Shichangpu	66,3
Artemisiae herba	Qinghao	51,3
Indigo naturalis	Quingdai	73,3
Mori radicis cortex	Sangbaipi	91,3
Salviae miltiorrhizae radix	Danshen	60,3
Sophorae flavescentis radix	Kushen	80,7
Zingiberis rhizoma	Ganjiang	70,3

Tabelle 11: Auswahl der aktivsten Dichlormethanextrakte

3.1.2 Methanolextrakte

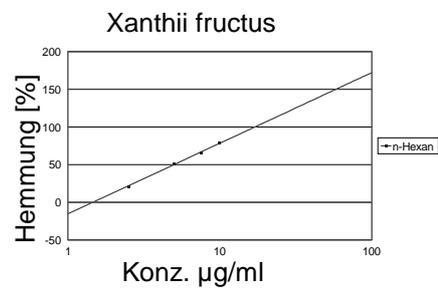
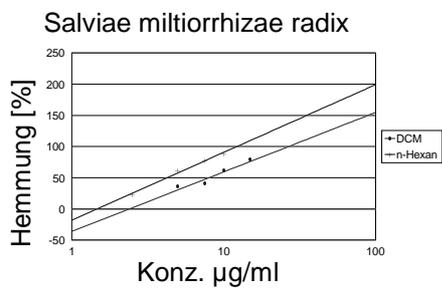
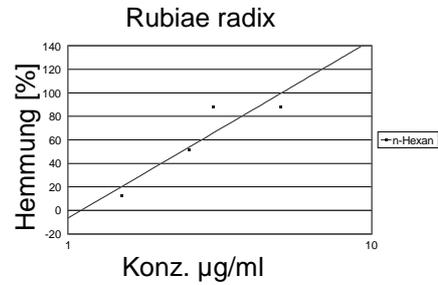
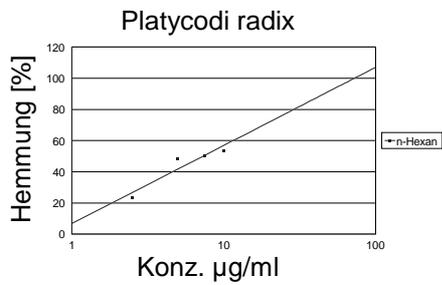
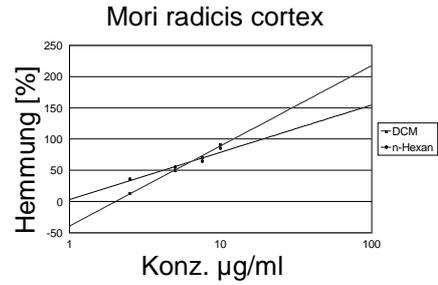
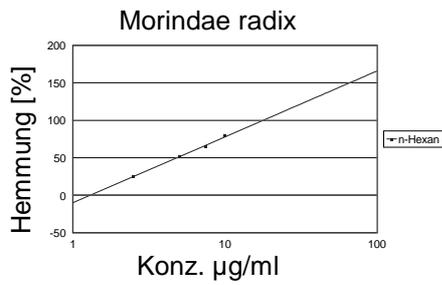
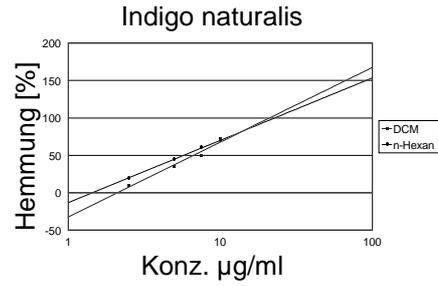
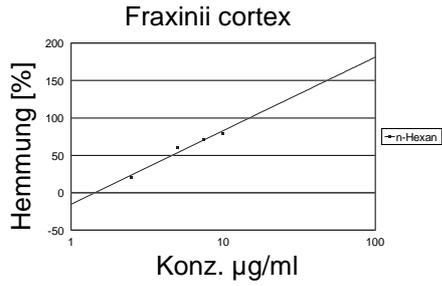
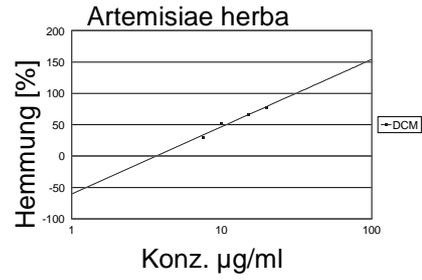
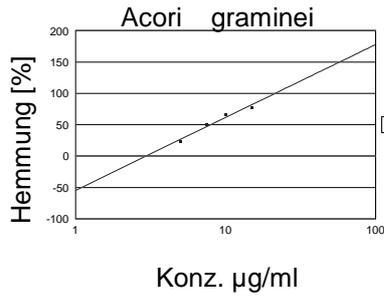
Die durch sukzessive Extraktion hergestellten Methanolextrakte wurden mit einer Testkonzentration von 10 µg/ml im in Kapitel C beschriebenen neu entwickelten 5-LOX-Assay getestet. Hierbei erreichte kein Extrakt eine Hemmwirkung von mehr als 20%. Es ist daher anzunehmen, dass die für die Wirkung der einzelnen Drogen verantwortlichen Inhaltsstoffe bereits erschöpfend mit den lipophilen Lösungsmitteln extrahiert worden waren.

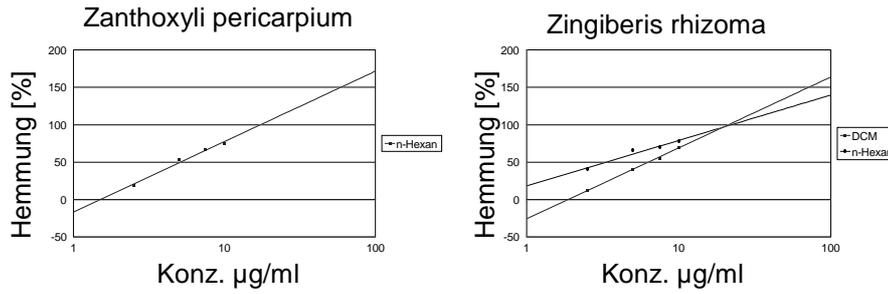
4 Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration einiger ausgewählter Drogen

Für Drogen, die beim Screening eine signifikante Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese gezeigt haben, wurde die halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) bestimmt.

Die einzelnen Proben wurden dazu in mindestens 4 Konzentrationen eingesetzt und jede Bestimmung mindestens dreimal durchgeführt.

Die im Folgenden aufgeführten Graphen veranschaulichen die Ermittlung der einzelnen IC_{50} Werte. Von den Drogen, bei denen sowohl *n*-Hexan- als auch -Dichlormethanextrakt gute Hemmeigenschaften aufwiesen, sind die entsprechenden Kurven gemeinsam aufgeführt.





Hexanextrakte	
Droge	IC ₅₀ Wert
Fraxinii cortex	4,6
Indigo naturalis	5,7
Mori radicis cortex	4,2
Morindae officinalis radix	4,8
Platycodi radix	7,3
Rubiae radix	3,0
Salviae miltiorrhizae radix	5,0
Xanthii fructus	5,0
Zanthoxyli pericarpium	3,1
Zingiberis rhizoma	3,4

Dichlormethanextrakte	
Droge	IC ₅₀ Wert
Acori graminei	7,9
Artemisiae herba	10,7
Indigo naturalis	6,6
Mori radicis cortex	5,0
Salviae miltiorrhizae radix	8,0
Sophorae flavescentis radix	6,1
Zingiberis rhizoma	4,4

Tabelle 12: IC₅₀ Werte der wirksamsten Extrakte

Von den im Screening untersuchten 52 Drogen zeigten siebzehn Extrakte IC₅₀ Werte zwischen 3 und 10 µg / ml. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht über die wirksamsten Drogen.

5 Fraktionierung zweier ausgewählter Drogen und Testung der Fraktionen

Um eine Droge auszuwählen, die daraufhin eingehend untersucht werden sollte, wurden die Extrakte zweier sehr gut wirkender Drogen, *Salviae miltiorrhizae radix* und *Platycodi radix* einer ersten Fraktionierung unterzogen und die erhaltenen Fraktionen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Leukotrienbiosynthese getestet.

Dazu wurde aus jeweils 50 g Droge mittels Soxhletverfahren ein *n*-Hexanextrakt hergestellt und dieser mit Hilfe von Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel aufgetrennt. Als Elutionsmittel dienten verschiedene Mischungen aus *n*-Hexan/Ethylacetat mit steigender Polarität. Abschließend wurde noch mit Methanol eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend in einer Konzentration von 10 µg / ml im 5-LOX Assay (Kapitel C.3) eingesetzt.

5.1 *Platycodi radix*

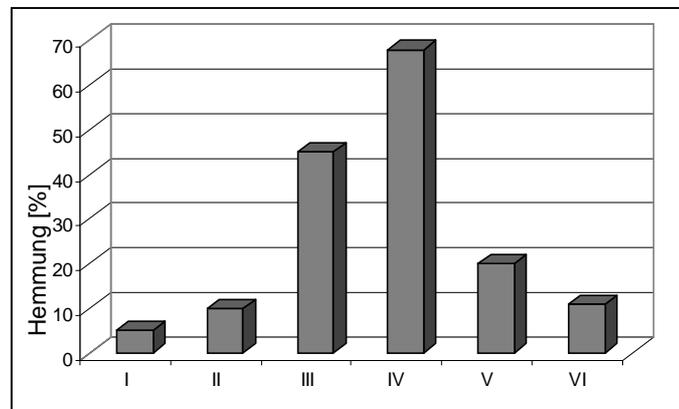


Abbildung 15: Hemmwirkung der Fraktionen des *n*-Hexanextraktes von *Platycodi radix* auf die Leukotrienbiosynthese

Abbildung 15 lässt erkennen, dass vor allem die mittelpolaren Fraktionen mit einem Hexananteil im Elutionsmittel von 50% (III) bzw. 25% (IV) gute Hemmwirkung zeigten. Die sehr lipophilen Fraktionen I und II sowie die polareren Fraktionen V und VI zeigen keine signifikante Hemmwirkung. Der Anteil von Fraktion III und IV machte 60% der Gesamtausbeute aus. Analytische Untersuchungen der interessanten Fraktionen mittels DC ließen die Vermutung zu, dass es sich bei einem der Hauptinhaltsstoffe dieser Verbindung

um Linolsäure handelt. In einer späteren Untersuchung von Reiningger (2001) konnte nachgewiesen werden, dass Linolsäure einer der Hauptinhaltsstoffe des *n*-Hexanextraktes von *Platycodi radix* ist. Linolsäure wurde bereits in der Vergangenheit als Inhibitor der Leukotrienbiosynthese beschrieben (Zschocke, 1998). Die positive Wirkung von ungesättigten Fettsäuren auf entzündliche und immunologische Prozesse wurde ebenfalls untersucht (Sköldstam *et al.*, 1992). Allerdings ist Linolsäure im Pflanzenreich ubiquitär vorhanden. *Platycodi radix* war daher für eine nähere Untersuchung des Einflusses auf die Leukotrienbiosynthese weniger interessant.

5.2 *Salviae miltiorrhizae radix*

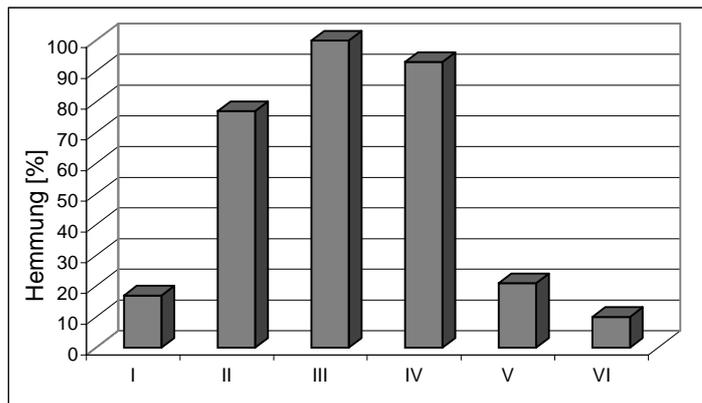


Abbildung 16: Hemmwirkung der Fraktionen des *n*-Hexanextraktes von *Salviae miltiorrhizae radix* auf die Leukotrienbiosynthese.

Bei den untersuchten Fraktionen von *Salviae miltiorrhizae radix* zeigten Fraktion II-IV sehr gute Hemmung, Fraktion III führte selbst bei einer Testkonzentration von 10 μ / ml noch zu einer vollständigen Hemmung der Leukotrienbiosynthese im Test (Abb. 16). Die nicht wirksamen Fraktionen V und VI machen bei dieser Droge ca. 2/3 der Ausbeute aus. Dies lässt darauf schließen, dass in Fraktion II-IV hochwirksame Komponenten enthalten waren.

Die weiteren phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen zu *Salvia miltiorrhiza* sind in Kapitel E beschrieben.

6 Zusammenfassung

52 Drogen, die in der traditionellen chinesischen Medizin bei entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden, wurden in einem Screening auf ihren Einfluss auf die Leukotrienbiosynthese hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass vor allem die lipophileren *n*-Hexan und Dichlormethanextrakte gute Hemmeigenschaften im verwendeten Testsystem entwickelten, wogegen die hydrophilen Methanolextrakte keine signifikanten Auswirkungen zeigten.

Durch die gewählte niedrige Screeningkonzentration wurden nur hochpotente Pflanzenextrakte erfaßt. Für 10 *n*-Hexan- und 7 Dichlormethanextrakte konnten IC_{50} Werte von unter 10 µg/ml ermittelt werden, was einer sehr guten Hemmung entspricht. Bei *Salviae miltiorrhizae radix*, *Indigo naturalis*, *Zingiberis rhizoma* und *Mori cortex* zeigten sowohl die *n*-Hexanextrakte als auch die sukzessiv gewonnenen Dichlormethanextrakte eine sehr gute Hemmwirkung. Dies könnte zum einen an einer Löslichkeit der aktiven Inhaltsstoffe in beiden Lösungsmitteln liegen, zum anderen könnte dafür ein breiteres Spektrum potenter Verbindungen über einen größeren Polaritätsbereich hinweg verantwortlich sein.

13 der 52 getesteten Drogen konnten somit als sehr gut wirksam im verwendeten Testsystem eingestuft werden, was zeigt, dass die Auswahl der Drogen in Anlehnung an ihre Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin sich positiv auf das Auffinden potenter Arzneidrogen ausgewirkt hat.

Eine Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese durch *Zingiberis rhizoma* wurde von Kiuchi *et al.* 1992 bereits beschrieben. *Artemisiae herba* enthält die bekannten Verbindungen Cumarin, Scopoletin und Esculetin (Tang, 1992), die bereits von Fessler (1986) als potente Hemmstoffe der Lipoxygenase beschrieben worden sind.

Ein Screening von Pflanzenextrakten stellt allerdings nur einen ersten Anhaltspunkt für das Auffinden aktiver Verbindungen dar, da die Testergebnisse durch verschiedene Drogenbegleitstoffe falsch positiv beeinflusst werden können. So können Gerbstoffe, die als Nebeninhaltsstoffe weit verbreitet sind, die Arachidonsäureumsetzung im Test beeinflussen. Auch die im Pflanzenreich ubiquitär vorkommende Linolsäure hat einen hohen inhibitorischen Effekt auf die Leukotrienbiosynthese.

Exemplarisch wurde für zwei sehr gut wirkende Drogen eine erste Grobfractionierung mittels Vakuumflüssigchromatographie (VLC) durchgeführt. Hierbei fielen insbesondere Fraktionen des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza* durch eine sehr gute Hemmung auf. *Salvia miltiorrhiza* wurde daher für ausführlichere phytochemische und pharmakologische Untersuchungen ausgewählt.

E Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zu *Salvia miltiorrhiza*

1 Allgemeine Übersicht

1.1 Systematische Einordnung von *Salvia miltiorrhiza*

Salvia miltiorrhiza BUNGE aus der Familie der Lamiaceen ist die in China bekannteste Vertreterin der Gattung *Salvia* und dort seit mehr als 2000 Jahren unter der chinesischen Bezeichnung „*Danshen*“ als Arzneipflanze populär.

Die winterharte Pflanze wird 40-80 cm hoch. Ihr aufrechter Stängel ist stark verzweigt, ihre Blätter sind lanzettförmig, stark behaart und am Rand gekerbt oder gefurcht. Die Pflanze besitzt dicke Pfahlwurzeln, die aussen charakteristisch dunkelrot gefärbt sind. Der Blütenstand besteht aus sechs bis vielen Blüten, die zu einer Traube zusammengesetzt sind. Die Blüte von *Salvia miltiorrhiza* ist blau-violett. Zwei zusammengewachsene Blütenblätter bilden bei dieser extrem zygomorphen Blüte die Unterlippe, drei weitere die Oberlippe. Die Blütenkrone ist umhüllt von einem zweilippigen Kelch, der ebenfalls violett schimmert. Der Fruchtknoten, bestehend aus zwei Fruchtblättern, teilt sich durch falsche Scheidewände in vier Fächer, aus denen sich Klausenfrüchte bilden. Die Pflanze wächst in China zwischen 100 und 1300 m Meereshöhe an Berghängen, Bachufern und in Wäldern (Wu und Raven, 1994). Auf Grund der rotgefärbten Wurzeln wird die Pflanze in Deutschland als Rotwurzsalbei bezeichnet, im Englischen kennt man sie unter dem Namen „Red Sage“.

Nach Engstler (Syllabus der Pflanzenfamilien, 1964) gehört die Gattung *Salvia* innerhalb der Familie der Lamiaceen zur Unterfamilie der Stachyoidae und zum Tribus der Salviaeae.



Abbildung 17: *Salvia miltiorrhiza*, Pflanze und Droge (mit freundlicher Erlaubnis von Subhuti Dharmananda, ITM Portland)

1.2 Makroskopische Beschreibung der Droge

Das Rhizom ist kurz und dick, am oberen Ende befinden sich zuweilen Stängelreste. Die Wurzeln sind langgestreckt und zylindrisch, leicht verdrillt, gelegentlich verzweigt und mit feinen Haarwurzeln besetzt, bis zu 35 cm lang und 0,3 bis 1 cm dick. Die Oberfläche ist rotbraun bis rötlich schwarzbraun gefärbt und weist Längsrünzeln auf. Ältere Wurzeln zeigen eine lockere, zumeist violettbraun gefärbte äußere Korkschicht, die stellenweise schuppenartig abgeblättert ist. Die Konsistenz ist hart und spröde. Die Droge zeigt eine rotbraune Rinde und einen graugelben oder braunvioletten Holzkörper, der gelblichweiße Gefäßbündel führt. Der Geschmack der Droge ist schwach bitter und adstringierend, ihr Geruch ist schwach (Stöger, 1996).

1.3 Mikroskopische Beschreibung der Droge

Bei einem mikroskopischen Querschnitt durch die Droge zeigt sich eine Korkschicht aus 4-6 Zellschichten, teilweise ist eine Borke zu sehen. Man erkennt eine breite Rindenschicht mit zahlreichen Calciumoxalatkristallen. Das

Kambium ist gut sichtbar. Vom Mark aus laufen mehrere Tracheenstränge radiär nach außen.

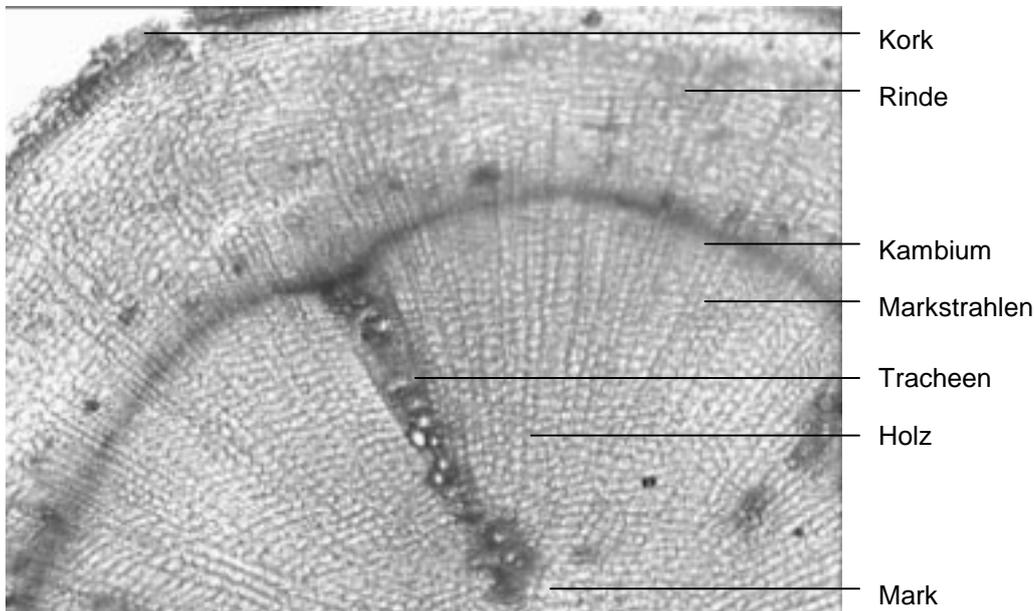


Abbildung 18: Querschnitt durch die Wurzel von *Salvia miltiorrhiza*

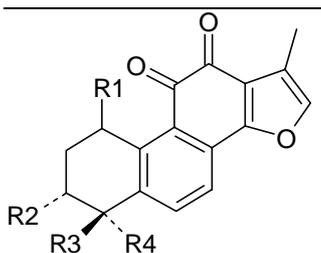
1.4 Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin

Salvia miltiorrhiza wurde erstmals ca. 100 v. Chr. im *Shennong Bencao Jing* erwähnt. Die Arzneidroge Danshen wird entsprechend der Vorstellungen der traditionellen chinesischen Medizin als bitter und schwach kalt beschrieben. Sie wird bei Regelstörungen, Stasen, Schlaflosigkeit, Kreislaufstörungen und koronaren Herzkrankheiten, wie zum Beispiel Angina pectoris eingesetzt. Die Droge findet auch als Mittel gegen Entzündungen Verwendung. Die Dosierung gemäß chinesischem Arzneibuch sieht einen Dekokt aus 9-15 g Droge pro Tag vor. Zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen kann die Dosis bis auf 20 g erhöht werden.

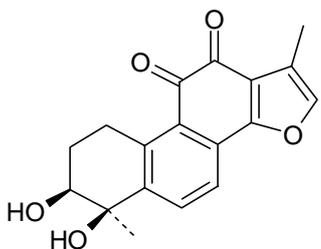
1.5 Bisher bekannte Inhaltstoffe

Die Inhaltsstoffe der Wurzeln von *Salvia miltiorrhiza* sind in der Vergangenheit bereits ausführlich untersucht worden. Zu den Hauptverbindungen von *Danshen* gehören Diterpene vom Abietantyp mit einer Phenantrenchinonstruktur. Diese lassen sich wiederum in zwei Hauptgruppen unterteilen. Zum einen handelt es sich um Phenanthro[1,2*b*]furano-10,11-dione, die Tanshinone, zum anderen um Phenanthro[2,3-*b*]furano-7,11-dione, die sogenannten Isotanshinone (Tang, 1992). 1934 beschrieben Nakao *et al.* zum ersten mal das Vorhandensein roter Pigmentfarbstoffe. In den folgenden Jahrzehnten gelang dann die Strukturaufklärung von Tanshinon I (von Wessely *et al.*, 1940), Tanshinon IIa (Okumura *et al.*, 1961) und Cryptotanshinon (Baille *et al.*, 1968). Das zu den Isotanshinonen gehörende Isotanshinon I wurde 1980 von Feng *et al.* isoliert und aufgeklärt. Darüber hinaus sind für die Pflanze vom Phenanthrengrundgerüst abgeleitete Strukturen ohne einen Furanring bekannt. Ein Vertreter hierfür ist das von Lin *et al.* 1988 entdeckte Danshenxinkun A. Aus dem wässrigen Extrakt von *Salvia miltiorrhiza* wurden weiterhin mehrere wasserlösliche Substanzen isoliert. Hierbei handelt es sich unter anderem um die Kaffeesäurederivate Danshensu (Huang *et al.*, 1981) und Salvianolsäure A (Huang *et al.*, 1980). Inzwischen gelang es auch, einige Tanshinone vollständig zu synthetisieren. So beschreibt Kakisawa die Synthese von Tanshinon IIa, Cryptotanshinon und Tanshinon I (1986). Lee *et al.* gelang 1990 die Totalsynthese von Miltiron. Eine Übersicht über die bekannten Verbindungen und die entsprechenden Strukturformeln gibt Tabelle 13.

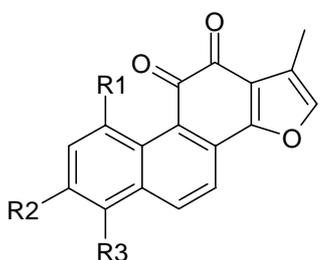
TANSHINONE



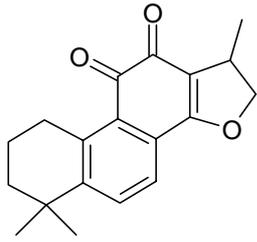
R1	R2	R3	R4		
H	H	CH ₃	CH ₃	Tanshinon II a	Takiura <i>et al.</i> , 1962
H	H	CH ₂ OH	CH ₃	Tanshinon IIb	Kakisawa <i>et al.</i> , 1968
OH	H	CH ₃	CH ₃	1-OH Tanshinon II a	Chen <i>et al.</i> , 1978
H	OH	CH ₃	CH ₃	3-OH Tanshinon II a	Luo <i>et al.</i> , 1985
H	H	CH ₃	CO ₂ CH ₃	Methyltanshinon	Kakisawa <i>et al.</i> , 1969
H	H	CH ₂		Methylentanshinon	Brieskorn <i>et al.</i> , 1964
H	OH	CH ₂		3-OH- Methylentanshinon	Feng <i>et al.</i> , 1980
H	H	OH	CH ₂ OH	Tanshindiol A	Luo <i>et al.</i> , 1985
H	H	OH	CH ₂ OH	Tanshindiol B	Luo <i>et al.</i> , 1985
H	H	O		Nortanshinon	Luo <i>et al.</i> , 1985



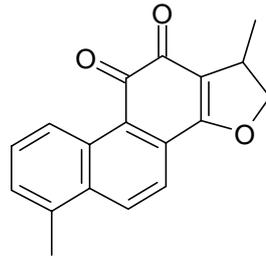
Tanshinol C Luo *et al.*, 1985



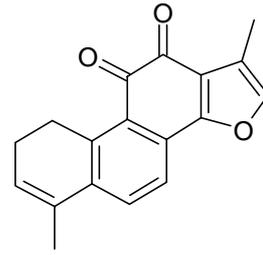
R1	R2	R3		
H	H	CH ₃	Tanshinon I	von Wessely <i>et al.</i> , 1940
H	H	CH ₂ OH	Tanshinol A	Ryu <i>et al.</i> , 1996
H	OH	CH ₃	Tanshinol B	Ryu <i>et al.</i> , 1996



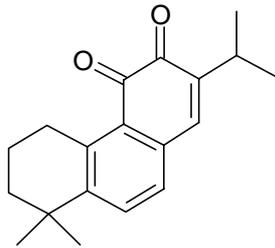
Cryptotanshinon
Baille *et al.*, 1968



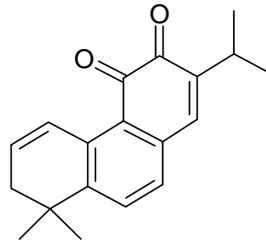
15,16-Dihydro-
tanshinon I
Onitsuka *et al.*, 1982



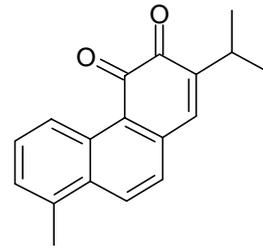
1,2-Dihydrotanshinon
Feng *et al.*, 1980et



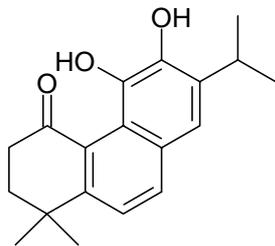
Miltiron
Hayashi *et al.*, 1979



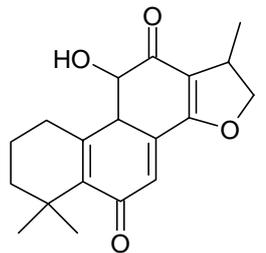
Dehydromiltiron
Lin *et al.*, 1988



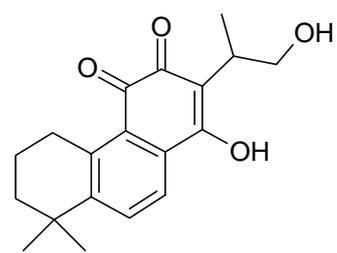
RO 09-0680
Onitsuka *et al.*, 1982



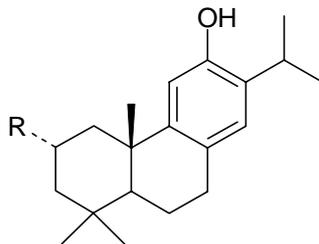
Miltiodiol
Luo *et al.*, 1985



Miltionon II
Ikeshiro *et al.*, 1989

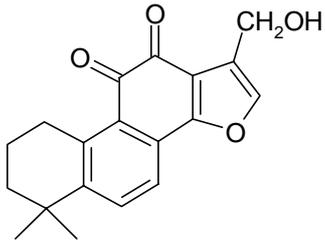


Tanshinon V
Yagi *et al.*, 1989

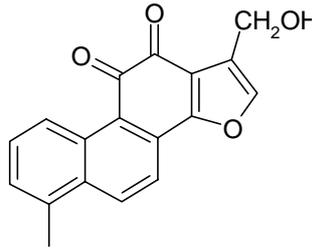


R=H: Ferruginol, Luo *et al.* 1988

R=OH: Salviol, Kakisawa *et al.*, 1971

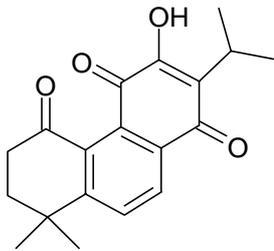


Przewaquinon A
Yang *et al.*, 1981

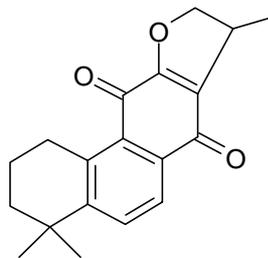


Przewaquinon B
Yang *et al.*, 1981

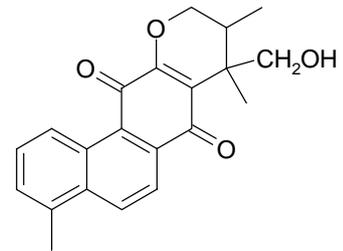
ISOTANSHINONE



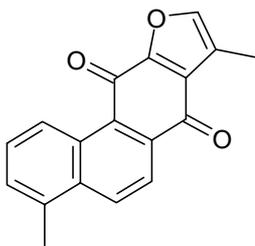
Miltionon I
Ikeshiro *et al.*, 1989



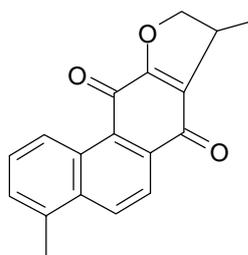
Isocryptotanshinon
Luo *et al.*, 1988



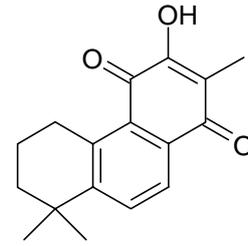
Danshenxinkun D
Luo *et al.*, 1985



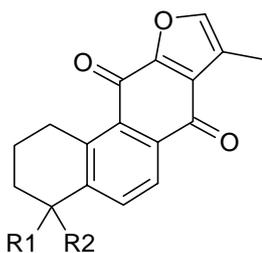
Isotanshinon I
Luo *et al.*, 1985



Dihydroisotanshinon I
Kaisawa *et al.*, 1971

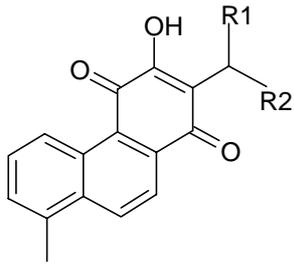


Neocryptotanshinon
Liu *et al.*, 2000



R1=CH₃, R2=CH₃: Isotanshinon II,
Feng *et al.*, 1980

R1=CH₃, R2=CH₂OH: Isotanshinon IIb,
Tomita *et al.*, 1989

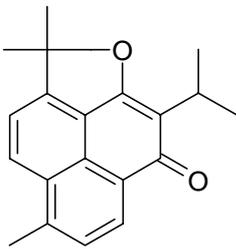


R1=CH₃, R2= CH₂OH: Danshenxinkun A,
Lin *et al.*, 1988

R1=CH₃, R2= CH₃ : Danshenxinkun B,
Ginda *et al.*, 1988

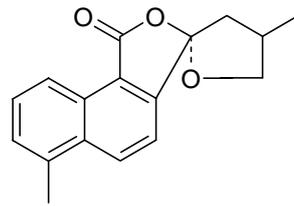
R1=H, R2= H: Danshenxinkun C,
Ikeshito *et al.*, 1989

WEITERE VERBINDUNGEN



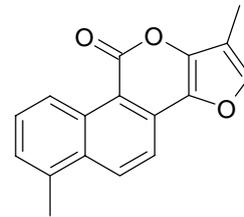
Salviol

Kakisawa *et al.*, 1971



Danshenspiroketalacton

Kong *et al.*, 1985

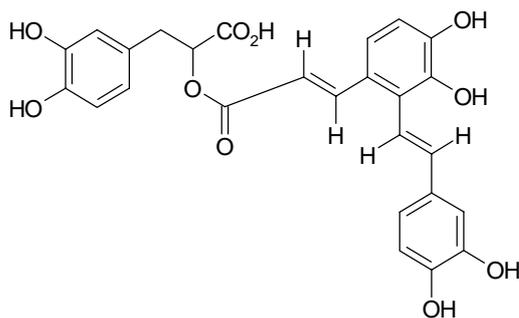


Tanshinlacton

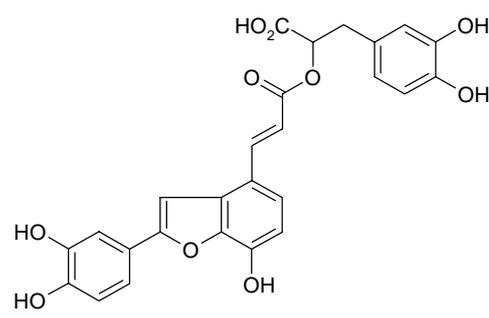
Luo *et al.*, 1986

Epi-Danshenspiroketalacton, Luo *et al.*, 1986

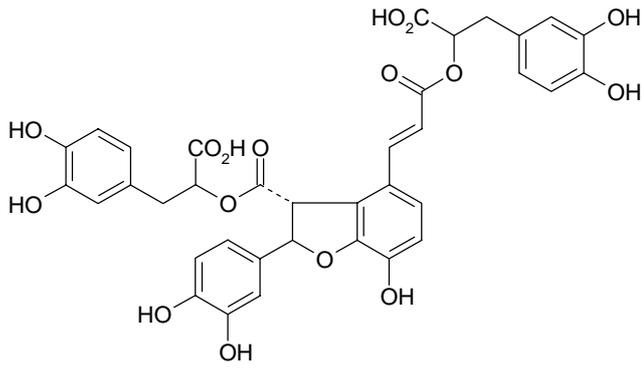
PHENOLSÄUREN



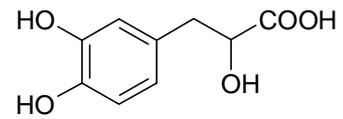
Salviaolsäure A, Li *et al.*, 1984



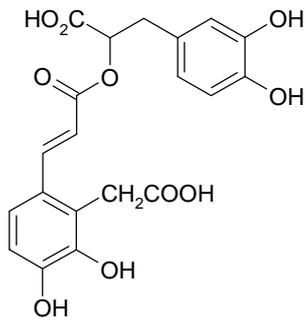
Salviaolsäure C, Ai *et al.*, 1988



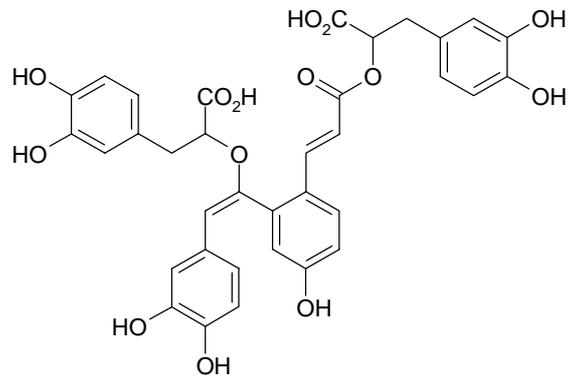
Salvianolsäure B, Ai *et al.*, 1988



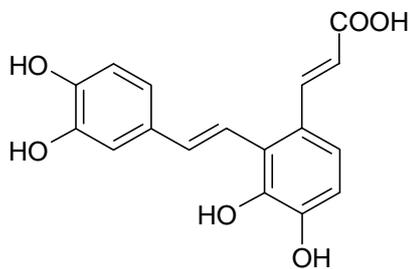
Danshensu,
Chen *et al.*, 1980



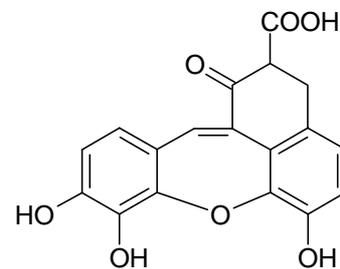
Salvianolsäure D, Ai *et al.*, 1992



Salvianolsäure E, Ai *et al.*, 1992



Salvianolsäure F, Ai *et al.*, 1996



Salvianolsäure G, Ai *et al.*, 1991

Rosmarinsäure, Zhang *et al.*, 1993

Lithospermsäure, Zhang *et al.*, 1993

Tabelle 13: Übersicht über bekannte Inhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza*

1.6 Bisher bekannte pharmakologische Wirkung

Zur pharmakologischen Wirkung von *Salvia miltiorrhiza* und seinen Inhaltsstoffen existieren zahlreiche Studien.

Besonders gut untersucht wurde bisher der Einfluss von *Danshen* auf das kardiovaskuläre System, insbesondere bei koronaren Herzkrankheiten wie Angina pectoris oder Herzinfarkt. So wurden die Symptome eines induzierten Herzinfarktes bei Hunden durch die Therapie mit *Danshen* entscheidend gemindert (Wang *et al.* 1980; Jiang *et al.*, 1981). Die Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels nach Unterversorgung mit Sauerstoff kann durch die Gabe von *Salvia miltiorrhiza* oder von Tanshinon IIa entscheidend verbessert werden (Takeo *et al.*, 1990). Zhao *et al.* (1996) diskutieren als möglichen Mechanismus den Einfluss von Radikalfängereigenschaften der Droge, die bei ischämischen Erkrankungen und der damit einhergehenden Erhöhung freier Radikale zum Tragen kommt. Hierbei wurde der Einfluss eines wässrigen Extraktes und der Reinstoffe Danshensu und Tanshinon IIa näher untersucht. Der Extrakt und Danshensu zeigten hierbei in einem Testdesign, bei dem freie Radikale innerhalb eines Xanthin/Xanthinoxidase Systems gebildet wurden, Radikalfängereigenschaften. Tanshinon IIa hatte keinen Effekt. In einem anderen Testsystem, bei dem der Einfluss von Tanshinon IIa auf freie Radikale, die während der Lipidperoxidation von mitochondrialer Membran entstehen untersucht wurde, zeigte dieser Inhaltsstoff von *Salvia miltiorrhiza* signifikante Aktivität.

Gao *et al.* und Chen *et al.* (1979) beschrieben die antiinflammatorische Wirkung der Droge. In einem *in vivo*-Testsystem wird der Einfluß von *Salvia miltiorrhiza* und Tanshinon IIa auf eine durch Crotonöl induzierte Entzündung am Mäuseohr beschrieben. Chen *et al.* (1979) beschrieben darüber hinaus einen antipyretischen Effekt von *Danshen* in einem *in vivo* Testsystem am Kaninchen. Onitsuka *et al.* untersuchten die antiaggregatorischen Eigenschaften verschiedener Tanshinone in einem *in vitro* Testsystem mit Thrombozyten vom Kaninchen. Hier zeigten vor allem das Tanshinon RO 09-0680 und Cryptotanshinon eine hohe Aktivität.

In klinischen Studien ist ebenfalls eine hepatoprotektive Wirkung von *Salvia miltiorrhiza* Dekokten beschrieben worden (Wang *et al.*, 1985). Cheng *et al.*

(1985) schildern die erfolgreiche Behandlung von Hepatitis bei Kanninchen mit Zubereitungen von *Danshen*. Liu *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang den Effekt eines wässrigen Extraktes von *S. miltiorrhiza* auf den durch Aflatoxin B₁ induzierten oxidativen Stress in Rattenleberzellen. In dieser Untersuchung konnte erneut eine hepatoprotektive Wirkung von *Danshen* beobachtet werden. Liu *et al.* machen hierfür erneut die antioxidativen Eigenschaften des Extraktes verantwortlich.

Rhu *et al.* (1996) beschreiben in einer Studie die zytotoxische Aktivität verschiedener Tanshinone bei 4 unterschiedlichen Tumorzellreihen. Liu *et al.* (2000) untersuchten in diesem Zusammenhang den Einfluss von *Danshen* auf die Apoptose, den programmierten Zelltod. Ein wässriger Extrakt von *Salviae miltiorrhizae radix* hemmte in dieser Untersuchung die Proliferation einer Lebertumorzellreihe durch Apoptoseinduktion.

Untersucht wurde auch eine etwaige Beeinflussung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bei der gleichzeitigen Gabe einer *Salvia miltiorrhiza* Zubereitung und dem Vitamin K Antagonisten Warfarin (Lo *et al.*, 1992). Die Studie zeigte, dass zu Therapiebeginn die Bioverfügbarkeit von Warfarin erhöht war, die Plasmakonzentration über den gesamten Therapieverlauf allerdings unverändert blieb.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über den Effekt der Droge in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

Wirkung	Verantwortliche Inhaltsstoffe (soweit bekannt)	Quelle
Antacidum	Salvianolsäure A	Murakami <i>et al.</i> , (1998)
antiaggregatorisch	Tanshinone	Onitsuka <i>et al.</i> , (1982) Wang <i>et al.</i> , (1998)
antiallergisch	Tanshinone	Ryu <i>et al.</i> (1990)
antianginal	Tanshinon IIa	Takeo <i>et al.</i> , (1990) Chen <i>et al.</i> , (1978)
antibakteriell	Tanshinone	Zheng <i>et al.</i> , (1981) Honda <i>et al.</i> , (1988)
antioxidativ		Kang <i>et al.</i> , (1997)
antiinflammatorisch	Tanshinon IIa	Chen <i>et al.</i> , (1979)
antiproliferativ	Tanshinone	Ryu <i>et al.</i> , (1996)
antipyretisch	Tanshinon IIa	Chen <i>et al.</i> , (1979)
Apoptose induzierend	Tanshinone	Liu <i>et al.</i> , (2000)
Ca-Kanal blockierende Eigenschaften		Liu <i>et al.</i> , (1990)
fungizid		Honda <i>et al.</i> , (1988)
Hemmung der Monaminoxidase	Dihydrotanshinon I	Hamburger <i>et al.</i> , (2001)
hepatoprotektiv		Liu <i>et al.</i> , (2001) Ikeshiro <i>et al.</i> , (1989)
Radikalfängereigenschaften	Tanshinon IIa Danshensu	Zhao <i>et al.</i> , (1996) Xi <i>et al.</i> , (1994)

Tabelle 14: Bisher nachgewiesenen pharmakologische Wirkungen von *Salvia miltiorrhiza*

2 Ergebnisse eigener pharmakologischer Untersuchungen

2.1 Einfluss von *Salvia miltiorrhiza* auf die Leukotrienbiosynthese

2.1.1 Wirkung der Extrakte auf die Leukotrienbiosynthese

Bei dem in Kapitel D beschriebenen pharmakologischen Screening fielen die Extrakte von *Salviae miltiorrhizae radix* durch ihre hohe inhibitorische Aktivität auf.

Von den sukzessiv mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol hergestellten Extrakten zeigten vor allem der lipophile *n*-Hexan Extrakt und der Dichlormethanextrakt eine gute Hemmwirkung auf die Leukotrienbiosynthese. Bei einer Testkonzentration von 10 µg/ml hemmte der *n*-Hexanextrakt die LTB₄ Synthese um 66%, der Dichlormethanextrakt um 50% und der Methanolextrakt um 14% (Abb. 19, Tabelle 15).

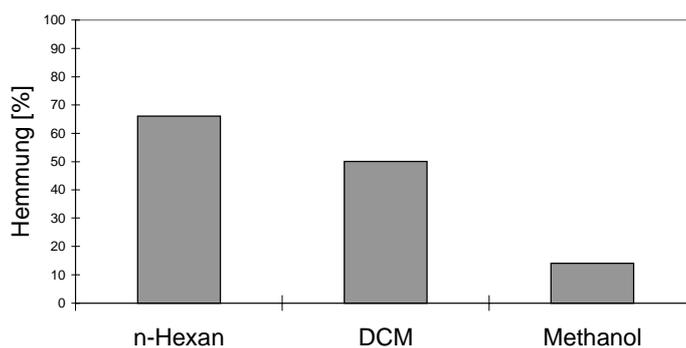


Abbildung 19: Wirkung verschiedener Extrakte von *Danshen* auf die Leukotrienbiosynthese

Extrakt	Hemmung [%] bei 10 µg / ml
<i>n</i> -Hexan	66
Dichlormethan	50
Methanol	14

Tabelle 15: Wirkung der sukzessiv hergestellten Extrakte von *Danshen*

Um die Löslichkeit der wirksamen Inhaltsstoffe in den verschiedenen Lösungsmitteln besser einschätzen zu können, untersuchten wir auch die Aktivität verschiedener Extrakte, die durch direkte Extraktion mit den

verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt wurden (Tab. 16). Für den Dichlormethanextrakt ergab sich dabei eine Hemmung der Leukotrienbiosynthese von 60% bei einer Testkonzentration von 10 µg/ml. Der direkt hergestellte Methanolextrakt zeigte bei dieser Konzentration immerhin noch eine Hemmung von 24%. Vergleicht man die HPLC-Chromatogramme der *n*-Hexan- und Dichlormethanextrakte (s. Kapitel E.1.2), so sieht man eine große Übereinstimmung im Inhaltsstoffmuster der beiden Extrakte. Auch im HPLC-Chromatogramm des direkt hergestellten Methanolextraktes sind neben den dominierenden polaren Inhaltsstoffen die lipophilen Substanzen noch in detektierbaren Mengen enthalten.

Extrakt	Hemmung [%] bei 10 µg / ml
n-Hexan	66
Dichlormethan	66
Methanol	24

Tabelle 16: Vergleich der Hemmwirkungen direkt hergestellter Extrakte von *Salvia miltiorrhiza*

Eine Aufstellung der IC₅₀-Werte der wirksamen Extrakte zeigt Tabelle 17.

Extrakt	IC ₅₀ Wert
n-Hexan	7,6
Dichlormethan (sukzessiv)	9,4
Dichlormethan (direkt)	8,0
Methanol (direkt)	28,7

Tabelle 17: IC₅₀ Werte der verschiedenen Extrakte

Die besten Hemmeigenschaften von *Danshen* wurden somit im lipophilen Bereich der Inhaltsstoffe beobachtet. Die Aktivität des *n*-Hexanextraktes und des direkt hergestellten Dichlormethanextraktes waren vergleichbar. Unter Berücksichtigung der Problematik, die die Verwendung von Dichlormethan hinsichtlich der Abfallentsorgung und der Belastung für Umwelt und Gesundheit mit sich bringt, entschieden wir uns für *n*-Hexan als Extraktionsmittel.

2.1.2 Wirkung der verschiedenen Drogenchargen im 5-Lipoxygenaseassay

Auch eine Auswahl der vorliegenden Drogenmuster wurde auf ihre Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese hin untersucht. Die *n*-Hexanextrakte der verschiedenen Muster wurden in einer Konzentration von 10 µg / ml im 5-LOX Assay eingesetzt. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Chargenbezeichnung	Hemmung [%] bei 10 µg / ml
Sm1	45,6
Sm3	55,8
Sm4	66,7
Sm8	78,3
Sm9	66,7
Sm11	66,4
Sm12	81,3
Sm13	68,1
Sm14	73,1
Sm15	65,7
Sm16	49,7
Sm17	77,3

Tabelle 18: Vergleich der Wirkung verschiedener Drogenchargen von *Salvia miltiorrhiza*

Alle untersuchten Drogenchargen zeigten in der gewählten Konzentration im Testsystem eine signifikante Hemmung der Leukotrienbiosynthese. Am wirksamsten zeigte sich Drogenmuster Sm12, am schwächsten wirksam Muster Sm1. Interessant war in diesem Zusammenhang, ob sich der unterschiedliche Gehalt verschiedener Inhaltsstoffe, der in Abschnitt 3.2 dieses Kapitels aufgeführt ist, mit der Wirkung der Drogenmuster korrelierte. Der hier wirksamste Extrakt liegt mit einem Gehalt von 0,4% Tanshinon IIa nur im mittleren Bereich der untersuchten Drogen. Die mit 78,3 bzw. 77,3 % Hemmung ebenfalls sehr gut wirksamen Drogenmuster Sm8 und Sm17 gehören mit einem Tanshinon IIa-Gehalt von 0,84 und 0,8% dagegen zu den Chargen mit dem höchsten Gehalt. Die am schlechtesten wirksamen Drogenmuster Sm1 und Sm16 liegen mit einem Tanshinon IIa-Gehalt von 0,03 bzw. 0,26% im unteren

Bereich der untersuchten Drogenmuster. Abbildung 20 zeigt den Zusammenhang zwischen Gehalt an Tanshinon IIa und Wirkstärke des *n*-Hexanextraktes. Für dieses Verhältnis wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,41 ermittelt. Im Anhang dieser Arbeit (Kapitel H) sind noch einmal die HPLC-Chromatogramme der untersuchten Drogenmuster aufgeführt.

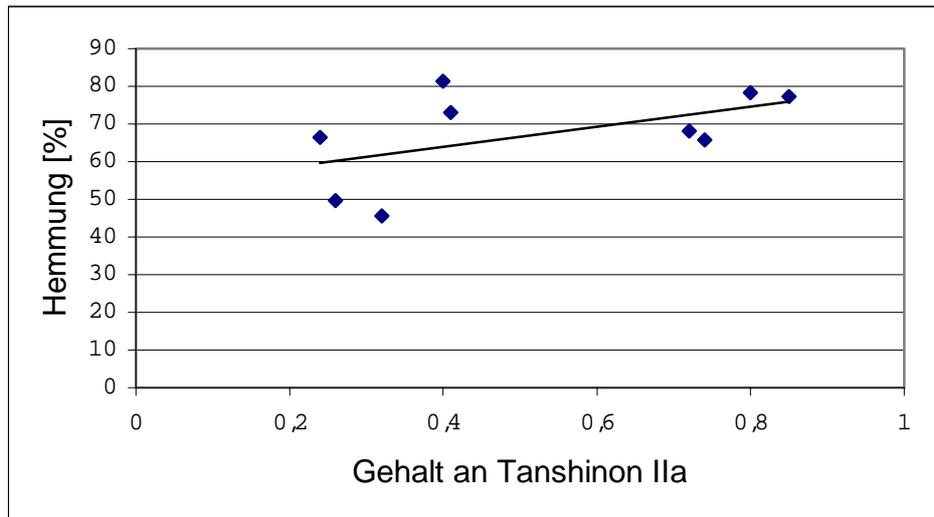


Abbildung 20: Vergleich zwischen prozentualem Gehalt an Tanshinon IIa bezogen auf die getrocknete Droge und der resultierenden Wirkstärke der *n*-Hexanextrakte

2.1.3 Wirkung der Fraktionen des *n*-Hexan Extraktes von *Danshen*

Die Auftrennung des Extraktes wurde unter Berücksichtigung der Wirkung von Fraktionen und Reinstoffen auf die Leukotrienbiosynthese vorgenommen. Nach der ersten Grobfractionierung über Vakuumflüssigchromatographie an Kieselgel wurden die erhaltenen Fraktionen in einer Konzentration von 10 µg / ml getestet. Hierbei zeichnete sich ab, dass vor allem die lipophileren Fraktionen V-XIV für die beobachtete Wirkung verantwortlich waren. Die hydrophileren Fraktionen ab Fraktion XV zeigten dagegen kaum noch inhibitorische Aktivität (Abb. 21).

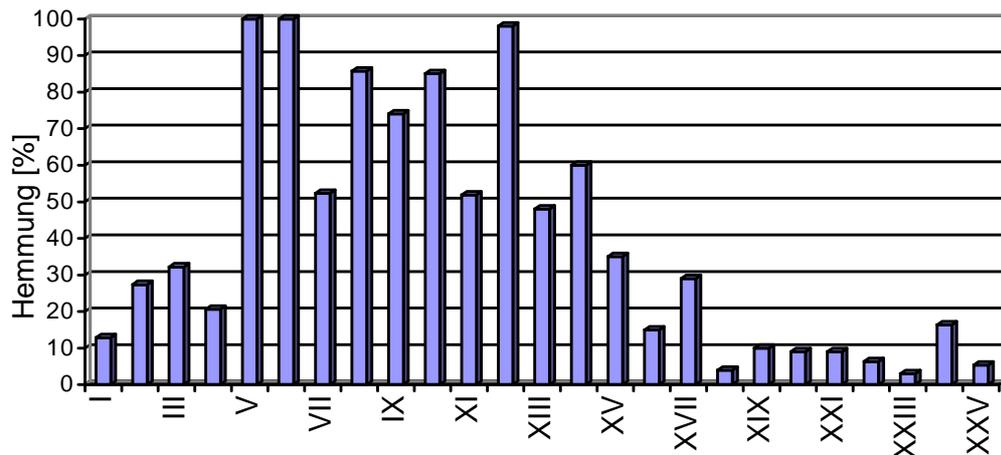


Abbildung 21: Hemmwirkung der einzelnen Fraktionen des *n*-Hexanextraktes von *Danshen* bei einer Testkonzentration von 10 µg/ml

Besonders stark wurde die Leukotrienbiosynthese durch die Fraktionen V, VI, VIII und XII beeinflusst, die daraufhin genauer untersucht wurden.

FRAKTION	Hemmung [%] bei 10 µg / ml
I	12,9
II	27,4
III	32,2
IV	20,6
V	100
VI	100
VII	52,3
VIII	85,7
IX	74,2
X	85,3
XI	51,3
XII	98,2
XIII	48,4
XIV	60,4
XV	35,4
XVI	15,4
XVII	29,7

XVIII	4,3
XIX	10,8
XX	9,7
XXI	9,6
XXII	6,5
XXIII	3,2
XXIV	16,4
XXV	5,4

Tabelle 19: Wirkung der einzelnen VLC-Fractionen des *n*-Hexanextraktes von *Danshen*

Um die Wirkstärken der verschiedenen Fraktionen noch besser beurteilen zu können, wurde von den am besten wirksamen der IC_{50} Wert ermittelt (Tab. 20). Die untersuchten Fraktionen zeigten mit IC_{50} Werten zwischen 4,8 und 5,7 $\mu\text{g/ml}$ eine sehr gute Hemmwirkung auf die Leukotrienbiosynthese und lagen unter dem IC_{50} Wert des Gesamtextraktes von 7,6 $\mu\text{g/ml}$.

Fraktion	IC_{50} Wert
V	4,9
VI	4,5
VIII	5,3
X	5,7
XII	4,8

Tabelle 20: IC_{50} Werte der wirksamsten Fraktionen des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza*

2.1.4 Zusammensetzung der Fraktionen

Die Zusammensetzung der im 5-LOX-Assay aktivsten Fraktionen wurde daraufhin näher untersucht. Ihre weitere Auftrennung erfolgte wiederum wirkungsorientiert, mit dem Ziel, die für die Wirkstärke verantwortlichen Pflanzeninhaltsstoffe zu identifizieren. Als Hauptinhaltsstoffe und hauptsächlich für die Wirkung verantwortlichen Substanzen isolierten wir Tanshinon IIa, Tanshinon I, Cryptotanshinon und 15,16-Dihydrotanshinon. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der gut wirksamen Fraktionen gibt Abbildung 22.

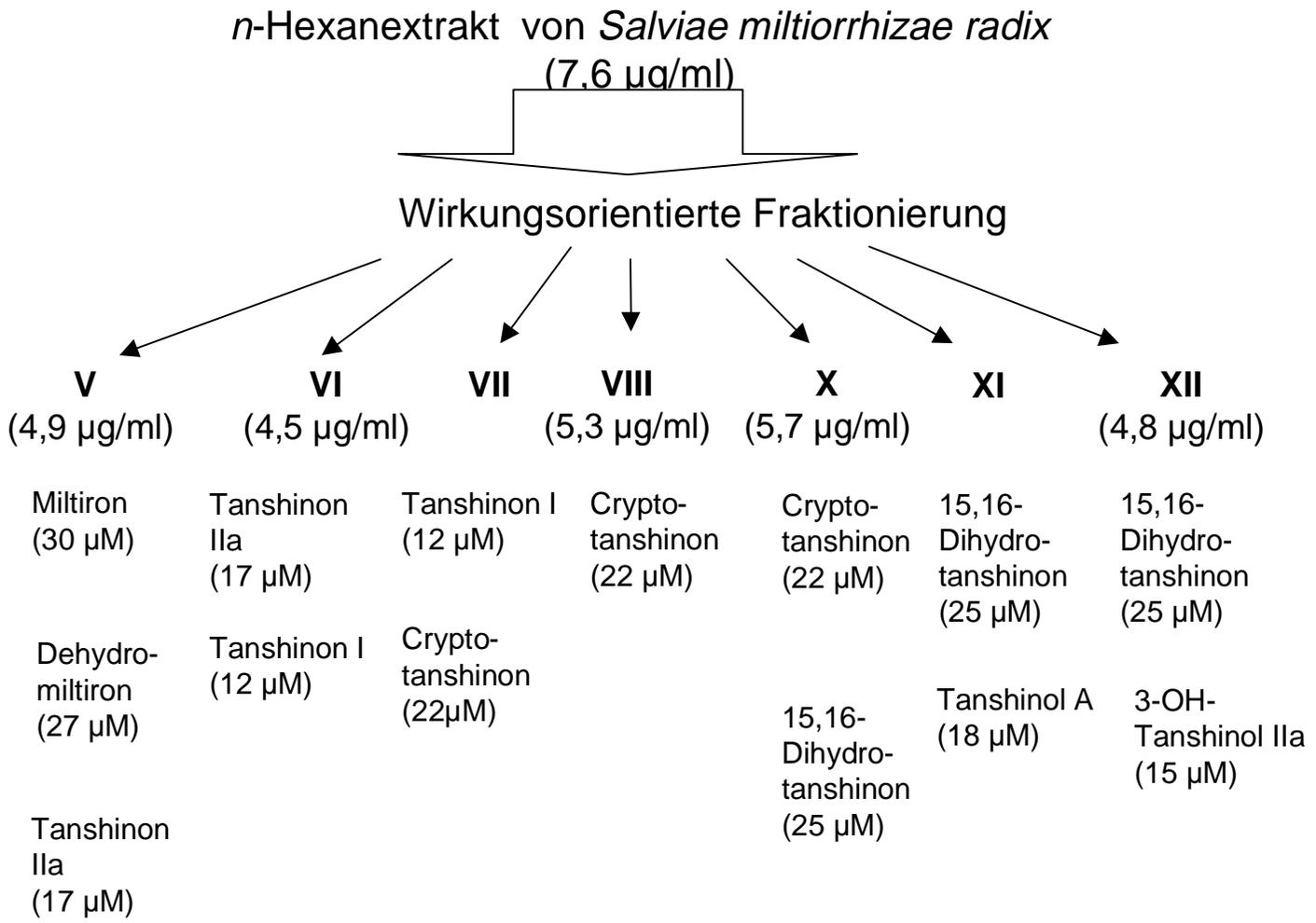


Abbildung 22: Übersicht über die Zusammensetzung der aktiven Fraktionen. Die IC₅₀-Werte sind in Klammern angegeben.

2.1.5 Wirkung der isolierten Verbindungen im 5-LOX Test

2.1.5.1 Tanshinon IIA

Tanshinon IIA, der Hauptinhaltsstoff des *n*-Hexanextraktes, zeigte mit einem IC_{50} Wert von 17 μ M eine gute Hemmwirkung im 5-LOX Test. Dies entspricht einer Konzentration von 4,83 μ g/ml im Test. Tanshinon IIA stellt auch den Hauptinhaltsstoff der Fraktionen V und VI dar. Für diese Fraktionen konnte ein IC_{50} Wert von 4,9 bzw. 4,5 μ g/ml ermittelt werden. Tanshinon IIA scheint also in erheblichem Maß an der Hemmstärke dieser Fraktionen beteiligt zu sein (Abb.23).

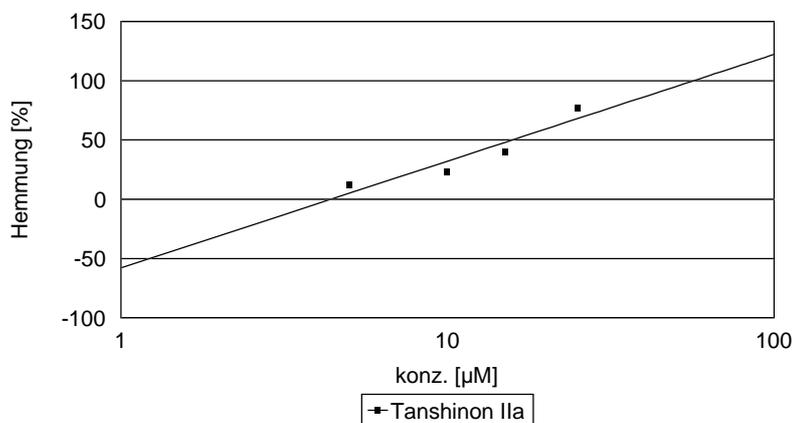


Abbildung 23: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von Tanshinon IIA

2.1.5.2 Tanshinon I

Als weitere Hauptkomponente der aktiven Fraktionen VI und VII konnte neben Tanshinon IIA auch Tanshinon I isoliert werden, eine Substanz, die ebenfalls durch gute Hemmwirkung im Test auf sich aufmerksam machte. Für Tanshinon I ermittelten wir einen IC_{50} Wert von 12 μ M, dies entspricht einer Konzentration von 3,3 μ g / ml im Testansatz. In der in Abschnitt 2.3 in diesem Kapitel beschriebenen Gehaltsbestimmung verschiedener Inhaltsstoffe wurde Tanshinon I als einer der Hauptinhaltsstoffe des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza* ermittelt. Diese sehr gut wirkende Substanz trägt daher zur Aktivität des untersuchten Extraktes bei.

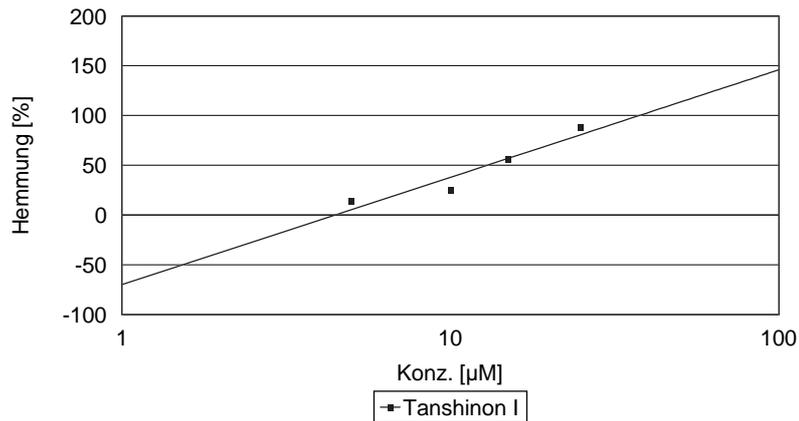


Abbildung 24: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von Tanshinon I

2.1.5.3 Cryptotanshinon

Cryptotanshinon, Hauptinhaltsstoff der gut wirksamen Fraktion VIII zeigte mit einem IC_{50} Wert von 22 μM ebenfalls sehr gute Hemmeigenschaften im 5-LOX Assay. Bei Umrechnung auf die entsprechende Testkonzentration von 6 $\mu\text{g/ml}$ lässt sich hier nach Quantifizierung der Substanz mittels HPLC und nachträgliche Berechnung der Konzentration in Fraktion VIII die gute Hemmwirkung dieser Fraktion im Test mit dem Vorkommen von Cryptotanshinon vollständig erklären.

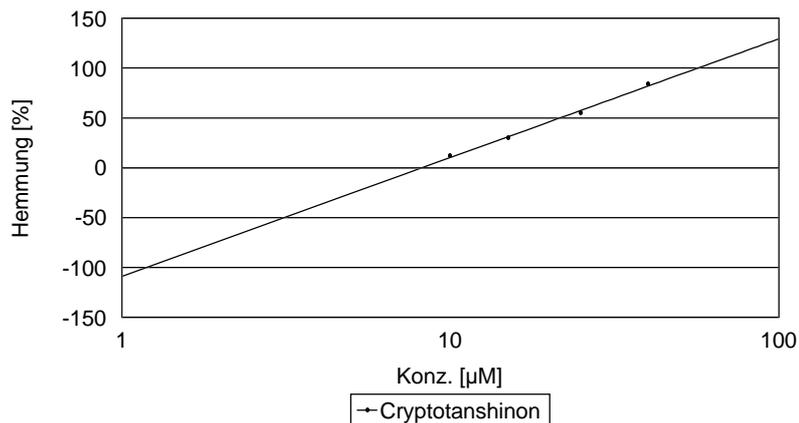


Abbildung 25: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von Cryptotanshinon

2.1.5.4 15,16-Dihydrotanshinon I

Auch für die Hauptkomponente der Fraktionen X-XII, 15,16-Dihydrotanshinon, konnten gute Hemmeigenschaften nachgewiesen werden. Der IC_{50} -Wert dieser

Substanz lag bei 25 μM , dies entspricht einem Wert von 7,11 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Die inhibitorische Aktivität dieser Fraktionen konnte gut durch die Wirkung von Dihydrotanshinon erklärt werden.

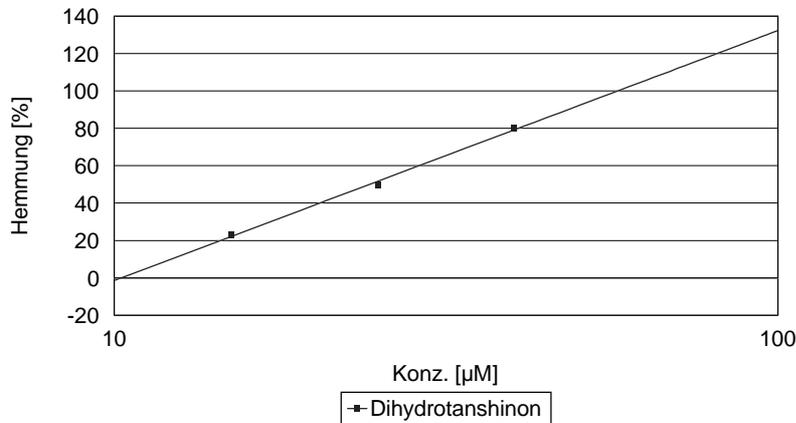


Abbildung 26: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von 15,16-Dihydrotanshinon I

2.1.5.5 *Tanshinol A*

Tanshinol A lag in Fraktion XI nur als Nebenkomponente vor und fiel bei der Bearbeitung dieser Fraktion durch wirkungsorientierte Fraktionierung durch gute Hemmeigenschaften in unserem Testsystem auf. Für diese Substanz konnte ein IC_{50} -Wert von 18 μM ermittelt werden, dies entspricht 5,3 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Die Substanz ist in ihren Hemmeigenschaften also mit den übrigen isolierten Tanshinonen vergleichbar. Allerdings leistet sie, auf Grund des geringen Gehaltes im Extrakt, nur einen kleinen Beitrag zur Wirkstärke von Extrakt und Fraktion.

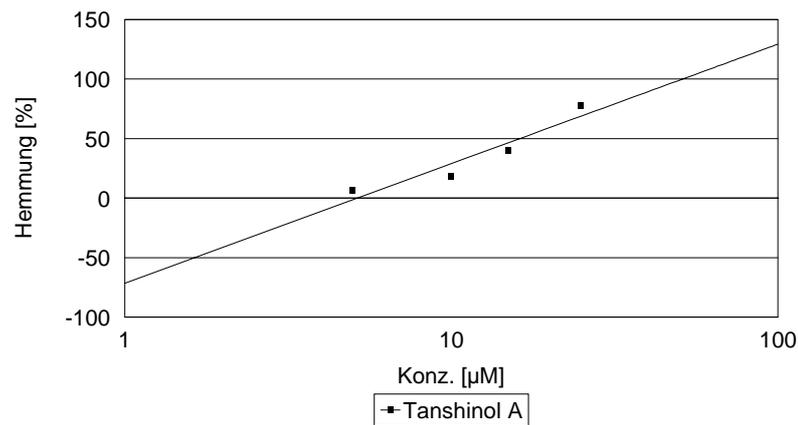


Abbildung 27: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von Tanshinol A

2.1.5.6 3-Hydroxy-Tanshinon IIa

Als aktiver Inhaltsstoff der sehr gut hemmenden Fraktion XII konnte neben 15,16-Dihydrotanshinon I das ebenfalls durch gute inhibitorische Eigenschaften auf sich aufmerksam machende 3-Hydroxy-Tanshinon IIa ermittelt werden. Für diese Substanz ermittelten wir einen IC_{50} -Wert von 18 μM . Im Extrakt von *Salvia miltiorrhiza* stellt diese Substanz nur eine Nebenkomponente dar, und auch in der untersuchten Fraktion XII ist 3-Hydroxy-Tanshinon IIa nicht die Hauptverbindung. Für die guten Hemmeigenschaften dieser Fraktion leistet die Verbindung neben Dihydrotanshinon aber ebenfalls einen erwähnenswerten Beitrag.

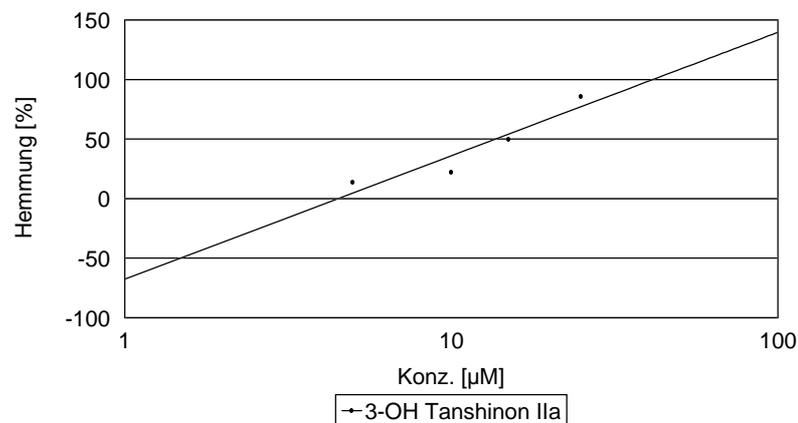


Abbildung 28: Graphische Ermittlung des IC_{50} Wertes von 3-Hydroxy-Tanshinon IIa

2.1.5.7 Miltiron und Dehydromiltiron

Als weitere für die Wirkung der Fraktion V verantwortliche Substanzen konnten Miltiron und Dehydromiltiron isoliert werden. Für Miltiron ermittelten wir einen IC_{50} Wert von $30 \mu\text{M}$. Dies entspricht einer Konzentration von $8,46 \mu\text{g} / \text{ml}$. Für Dehydromiltiron wurde ein IC_{50} -Wert von $27 \mu\text{M}$ ermittelt, was einer Konzentration von $7,56 \mu\text{g} / \text{ml}$ entspricht. Hauptkomponente von Fraktion V ist allerdings das bereits erwähnte Tanshinon IIa. Miltiron und Dehydromiltiron liegen in dieser Fraktion und im Extrakt nur in kleineren Mengen vor und leisten daher nur einen untergeordneten Beitrag zur Wirkstärke des Extraktes und der untersuchten Fraktion.

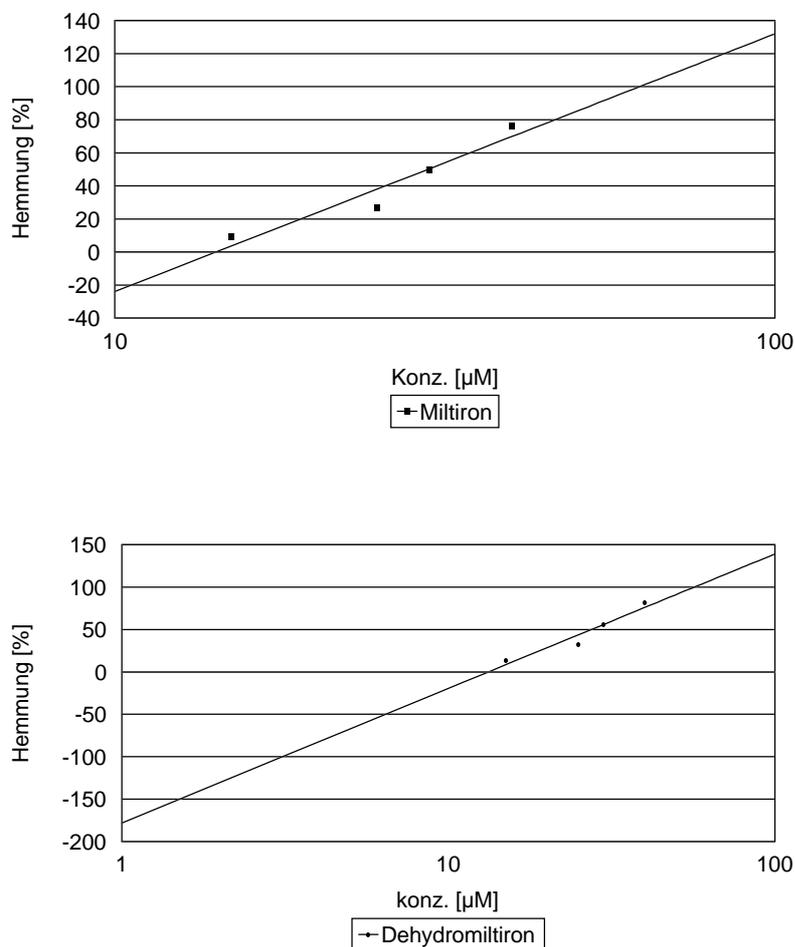


Abbildung 29: Graphische Ermittlung der IC_{50} Werte von Miltiron und Dehydromiltiron

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal zusammengestellt.

Verbindung	IC ₅₀ -Wert [µM]
Tanshinon IIa	17
Tanshinon I	12
15, 16 Dihydrotanshinon I	25
Cryptotanshinon	22
Miltiron	30
Dehydromiltiron	27
3-OH Tanshinon IIa	15
Tanshinol A	18

Tabelle 21: Hemmwirkung der Inhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza* auf die Leukotrienbiosynthese

Alle wirkungsorientiert isolierten Verbindungen gehören zur Klasse der Tanshinone, den für *Salvia miltiorrhiza* typischen roten Farbpigmenten. Die Substanzen zeichnen sich durchgehend durch gute Hemmeigenschaften aus, wobei ihre inhibitorische Aktivität sich untereinander nicht besonders unterscheidet.

Um die chemische Struktur der Verbindungen noch einmal deutlich zu machen, sind in Abbildung 30 die Formeln der einzelnen Komponenten aufgeführt. Für die Wirkung scheint es demnach unerheblich zu sein, ob bei der jeweiligen Verbindung der A Ring der Struktur in aromatischer oder nicht aromatischer Form vorliegt. Tanshinon IIa und Tanshinon I zeigen mit 17 bzw. 12 µM sehr ähnliche IC₅₀ Werte. Betrachtet man die Verbindungen mit einem Furanring im Vergleich mit denen, die mit einer Dihydrofuranstruktur vorliegen, erkennt man allerdings einen leichten Unterschied in der Hemmstärke der Verbindungen. So liegt der IC₅₀ Wert von 15,16-Dihydrotanshinon mit 25 µM doch oberhalb dem von Tanshinon I mit 12 µM. Interessant ist hierbei auch die Tatsache, dass die Verbindungen ohne Furanring, Miltiron und Dehydromiltiron, mit einem IC₅₀ von 30 bzw. 27 µM die schwächsten Verbindungen darstellen. Die Einführung einer Hydroxygruppe in das Molekül scheint dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität der Verbindung zu haben. Der IC₅₀ Wert von 3-OH Tanshinon IIa ist mit 15 µM durchaus dem von Tanshinon IIa mit 17 µM vergleichbar. Der IC₅₀ Wert von Tanshinol A ist mit 18 µM im Gegensatz zur nicht hydroxylierten

Variante Tanshinon I mit 12 μM leicht erhöht. Die Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Verbindungen sind jedoch nur sehr gering.

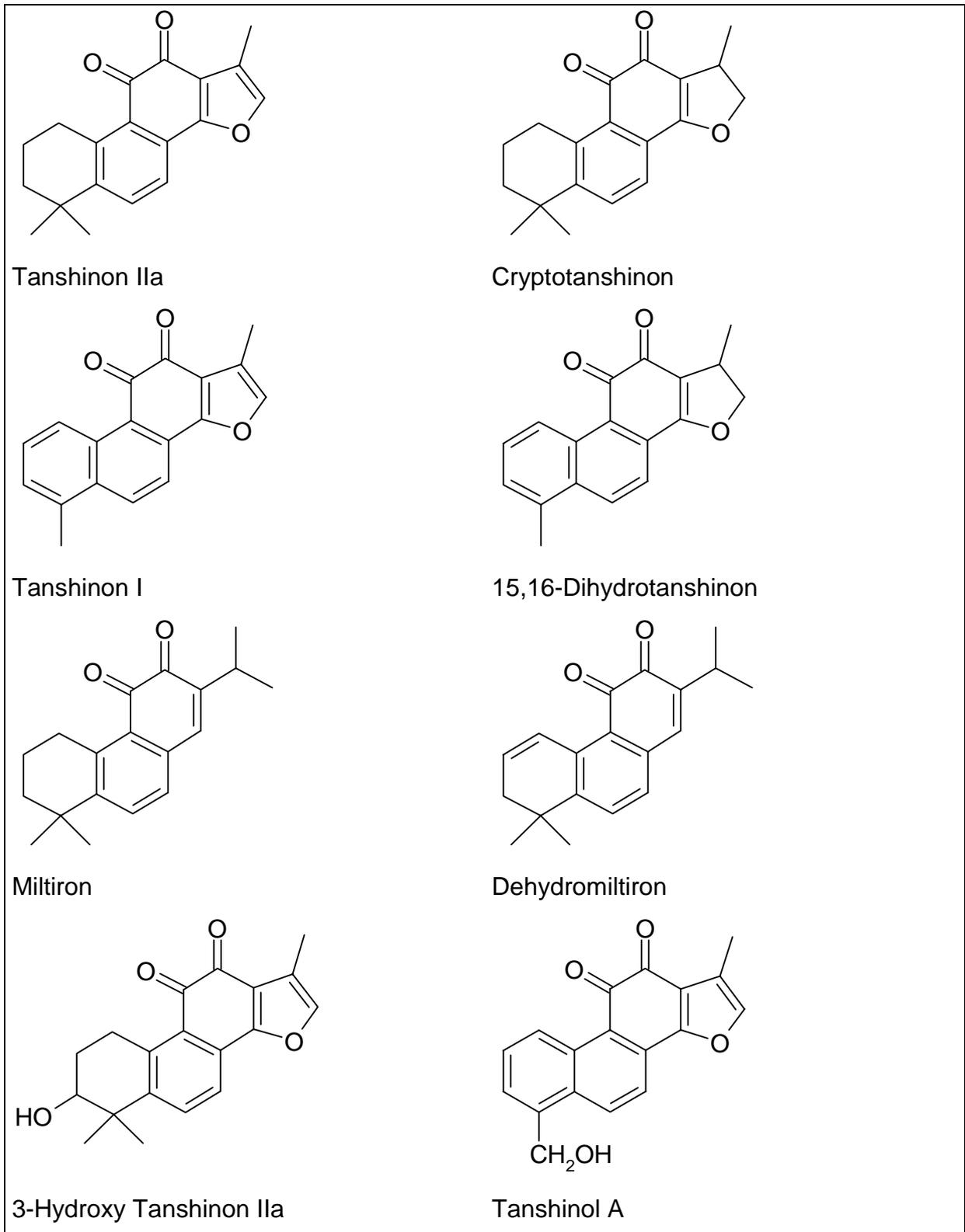


Abbildung 30: Übersicht über die Strukturformeln der getesteten Verbindungen

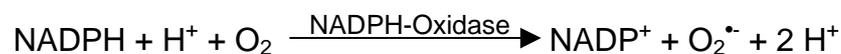
2.2 Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung zweier Hauptinhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza*

In früheren pharmakologischen Untersuchungen zur Wirkungsweise von *Salvia miltiorrhiza* wurde mehrfach eine antioxidative Wirkung der Inhaltsstoffe beschrieben (s. Kapitel E.1.5, S. 53; z.B. Liu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1996). Mit diesen Radikalfängereigenschaften wurden eine Vielzahl der beobachteten pharmakologischen Wirkungen von Danshen erklärt. Dies veranlasste uns, zwei Hauptinhaltsstoffe von *Salvia miltiorrhiza*, Tanshinon IIa und Cryptotanshinon, unter diesem Gesichtspunkt näher zu untersuchen.

2.2.1 Die Rolle von Sauerstoffradikalen bei patophysiologischen Vorgängen

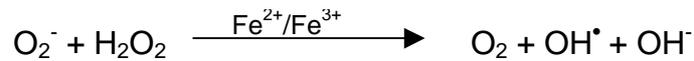
Innerhalb des Abwehrverhaltens eines Organismus werden Fremdelemente, die für das Entstehen entzündlicher Reaktionen verantwortlich sind, durch Phagozytose unschädlich gemacht. Zu diesen zur Phagozytose fähigen Zellen gehören unter anderem polymorphkernige Leukozyten (PMN), Gewebemakrophagen und Monozyten, die jeweils eine wichtige Rolle bei entzündlichen Reaktionen spielen.

Charakteristisch für die Phagozytose ist der erhöhte Sauerstoffbedarf der phagozytierenden Zelle, der sogenannte „respiratory burst“. Gleichzeitig werden reaktive freie Sauerstoffradikale in die Umgebung abgegeben. Ein Vorläufer der reaktiven Sauerstoffspezies ist das Superoxidanionradikal, das von der NADPH-Oxidase aus molekularem Sauerstoff gebildet wird.

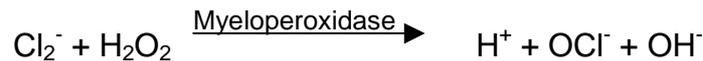


Das Superoxidanionradikal wirkt in Abhängigkeit von seinem Reaktionspartner oxidierend oder reduzierend. Reagieren zwei Moleküle $\text{O}_2^{\bullet-}$ miteinander, wird dabei unter Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) das eine oxidiert und das andere reduziert. Wasserstoffperoxid stellt die Ausgangsverbindung für die Bildung von weiteren reaktiven Sauerstoffspezies dar.

Über die Fenton-Reaktion kann das Hydroxylradikal gebildet werden:



Wasserstoffperoxid kann durch das Enzym Myeloperoxidase bei Anwesenheit von Halogeniden zu toxischen Verbindungen umgesetzt werden:



Aus der Interaktion von H_2O_2 und OCl^- kann hochreaktiver Sauerstoff entstehen, dessen ungepaartes Elektronenpaar ein energetisch höheres Orbital besetzt. Beim Zerfall dieses Sauerstoffs zur thermodynamisch stabileren Form oder bei Interaktion mit einem spezifischen Molekül, das seinerseits anregbar ist, kann die Differenzenergie u.a. in Form von Lichtemission frei werden. Dieser Mechanismus wird als Ursache für die bei der Aktivierung von Phagozyten beobachtete Chemilumineszenz betrachtet und stellt gleichzeitig die Grundlage des hier angewandten Testprinzips dar. Die erwähnten hochreaktiven Sauerstoffspezies sind in der Lage in nicht unerheblichem Maße Körperzellen und –gewebe zu schädigen. Durch die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren kann zum Beispiel die Funktionsfähigkeit von biologischen Membranen verändert werden. Möglich ist auch die Reaktion der genannten Sauerstoffspezies mit körpereigenen Kohlehydraten, Proteine und Nucleinsäuren. Der gesunde Organismus begegnet diesem „oxidativen Stress“ mit zahlreichen Schutzmechanismen, zum Beispiel durch Antioxidantien (GHS, Ascorbinsäure), Radikalfänger (Vitamin E) oder reduzierende Enzyme (Glutathion-Peroxidase). Bei einer Störung dieses Gleichgewichtes kann es als Folge des Angriffs auf gesundes Gewebe zu Entzündungen und anderen Erkrankungen kommen (Chow, 1991).

2.2.2 Testsystem mit polymorphkernigen Granulozyten

Im verwendeten Testsystem wurde die Beeinflussung des „respiratory burst“ durch die zwei Hauptsubstanzen aus *Salvia miltiorrhiza* an polymorphkernigen Granulozyten (PMN) untersucht. Diese wurden durch die Zugabe von N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP), einem synthetischen Derivat des

Amino-Endes von Bakterienproteinen, aktiviert. FMLP bindet an einen spezifischen Rezeptor an der Phagozytenmembran, wodurch über die Aktivierung eines G-Proteins eine mit der Zellmembran assoziierte Phospholipase C stimuliert wird. Dieses Enzym erzeugt zwei „second messenger“, den Calciummobilisator Inositol-1,4,5-triphosphat und den Proteinkinase-C-Aktivator 1,2-Diacylglycerol, wodurch zum einen die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration erhöht und zum anderen die Proteinkinase C aktiviert wird. Dadurch wird schließlich die NADPH-Oxidase zur Bildung von Superoxidanionradikalen angeregt.

Im Testsystem wird die im Vergleich zu einem Blindwert verminderte oder erhöhte Bildung von Radikalen durch Chemilumineszenzmessung bestimmt. Die beim „respiratory burst“ auftretende Emission von Photonen wird durch Zusatz von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) verstärkt und in einem Chemilumineszenzgerät mit Hilfe eines Photomultiplers in elektrische Impulse umgewandelt (ausführliche Testbeschreibung: Kapitel G.3.5).

2.2.3 Wirkung der untersuchten Verbindungen

Zwei der Hauptsubstanzen aus *Salvia miltiorrhiza*, Tanshinon IIa und Cryptotanshinon, wurden auf die Verminderung der Chemilumineszenz hin getestet. Interessanter Weise wurde durch keine der beiden Verbindungen eine Veränderung der Chemilumineszenz im Vergleich zum Blindwert erreicht. Um weitere Aussagen über das antioxidative Potential der untersuchten Droge und ihrer Inhaltsstoffe zu machen, wäre es notwendig, weitere Inhaltsstoffe im angesprochenen Testsystem zu untersuchen, da *Salvia miltiorrhiza* in der Vergangenheit bereits mehrmals als antioxidativ wirkende Droge beschrieben wurde (Zhao *et al.*, 1996, Xi *et al.*, 1997).

2.3 Wirkung verschiedener isolierter Verbindungen im PGHS1 und PGHS2 Test

2.3.1 Prostaglandin H Synthase 1 und 2

Die Prostaglandin H Synthasen 1 und 2 (PGHS) katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu den verschiedenen Prostaglandinen. Prostaglandine sind Gewebshormone, die am Schmerzgeschehen, an entzündlichen

Prozessen und bei der Fieberentstehung beteiligt sind. Darüber hinaus regulieren sie verschiedene physiologische Abläufe und besitzen zellprotektive Eigenschaften. Beim therapeutischen Einsatz von PGHS-Hemmstoffen kommt es daher zu teils starken Nebenwirkungen, die vor allem in Nierenschädigung und Magen-Darm-Ulzera bestehen.

Die 1991 entdeckte Isoform PGHS2 wird im Gegensatz zur konstitutiven PGHS1 erst auf einen Endzündungsreiz hin innerhalb weniger Minuten gebildet und besitzt dann in den Zellen nur eine Halbwertszeit von 5-30 Minuten (Herschmann, 1996). Bei einer spezifischen Hemmung der PGHS2 sollten daher die charakteristischen Nebenwirkungen einer PGHS1 Hemmung nicht auftreten.

2.3.2 Testsystem zur Bestimmung der PGHS1- und -2-Hemmwirkung

Das Testprinzip der beiden *in vitro* Assays beruht auf der Quantifizierung von durch PGHS1/2 gebildetem Prostaglandin E₂ (PGE₂) mittels eines Enzym-Immuno-Assays. Der Inkubationsansatz besteht aus den aus Schafsamenblasen (PGHS1) bzw. Schafsamencotyledonen (PGHS2) isolierten Enzymen, Arachidonsäure als Substrat, der Testsubstanz und verschiedenen Cofaktoren (s. Kapitel F.3.2). Bei den ermittelten Hemmwerten handelt es sich um Relativwerte. Sie errechnen sich aus dem prozentualen Anteil der gebildeten Menge an PGE₂ in einer Probe mit Inhibitor im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Inhibitor.

2.3.3 Wirkung verschiedener Inhaltsstoffe im Test

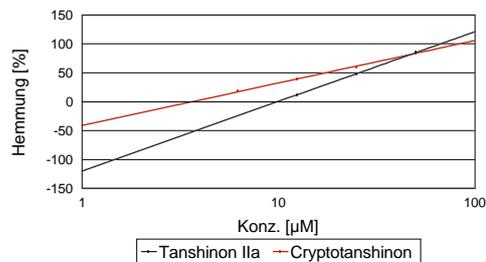
In einem von Reininger (2001) vorgenommenen Screening verschiedener traditionell verwendeter chinesischer Arzneidroge n bezüglich ihrer Wirkung auf die Prostaglandinbiosynthese zeigte der *n*-Hexanextrakt von *Salviae miltiorrhizae radix* bei einer Screeningkonzentration von 50 µg / ml eine Hemmwirkung von 72,7% auf die PGHS1 und von 74,7% auf die PGHS2. Wir untersuchten daher auch die isolierten Verbindungen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften. Tabelle 22 zeigt die beobachteten Hemmwerte bei einer Testkonzentration von 50 µM. Tanshinon IIa und Cryptotanshinon zeigen hierbei die höchste Aktivität mit 85,2% bzw. 90,1% Hemmung.

	PGHS1 Hemmung [%]	PGHS2 Hemmung [%]
Tanshinon IIa	85,2	69,7
Tanshinon I	65,6	5,3
Cryptotanshinon	90,1	81,9
Dihydrotanshinon	20,1	2,3
Miltiron	46,2	52,6

Tabelle 22: Hemmung der PGHS1/2 Aktivität durch Inhaltsstoffe von *Danshen*, Testkonzentration 50 μM

Für die wirksamsten Reinsubstanzen Tanshinon IIa und Cryptotanshinon wurden anschließend die IC_{50} Werte bestimmt (Abb. 31, Tab. 23). Cryptotanshinon erwies sich hierbei als die etwas aktivere Substanz mit einem IC_{50} Wert von 17,3 μM gegenüber der PGHS 1 und 10,2 μM gegenüber der PGHS2. Aber auch Tanshinon IIa zeigte mit 25,7 μM gegen PGHS 1 und 27,4 μM gegenüber der PGHS 2 immer noch eine gute Hemmung.

PGHS 1



PGHS 2

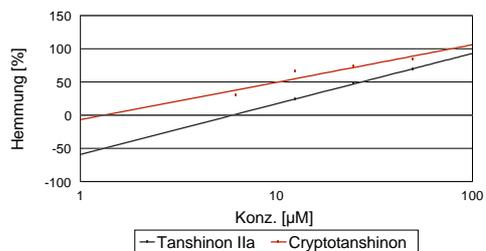


Abbildung 31: Graphische Darstellung der IC_{50} -Werte der PGHS1/2 Hemmung von Tanshinon IIa und Cryptotanshinon

	IC₅₀ PGHS-1	IC₅₀ PGHS-2
Cryptotanshinon	17,3	10,2
Tanshinon IIa	25,7	27,4

Tabelle 23: IC₅₀ Werte von Tanshinon IIa und Cryptotanshinon

Tanshinon IIa und Cryptotanshinon stellen somit potente duale Hemmstoffe der Leukotrien- und Prostaglandinbiosynthese dar. Die von Reiningger (2001) beschriebene Wirkung des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza* auf die Prostaglandinbiosynthese lässt sich somit teilweise durch die Hemmstärke der beiden Hauptinhaltsstoffe erklären.

3 Ergebnisse eigener phytochemischer Untersuchungen

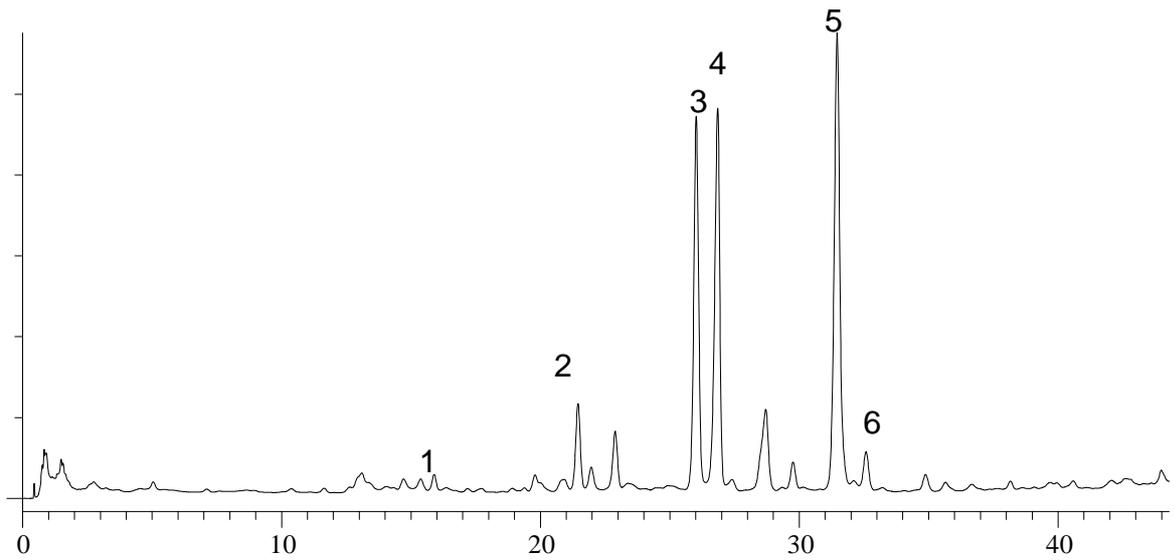
3.1 Analytik

3.1.1 HPLC Fingerprintanalyse

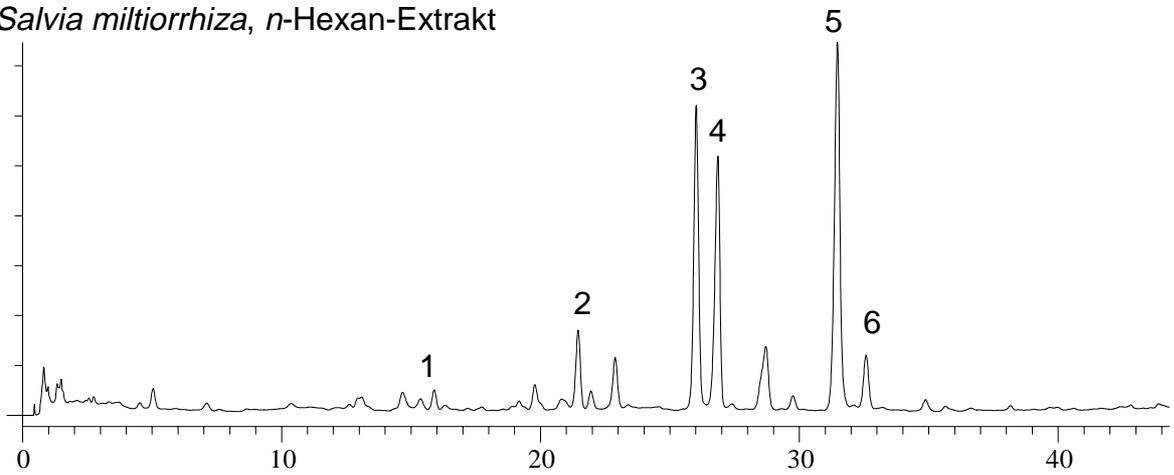
Ziel der HPLC-analytischen Untersuchung von *Salviae miltiorrhizae radix* war es, eine Methode zu entwickeln, die eine sichere Identifizierung und qualitative Beurteilung der Droge und eine optimale Auftrennung der Leitsubstanzen möglich macht. Hierzu wurden verschiedene Extrakte von *Danshen*, die mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität hergestellt worden waren, auf einer RP-18 Säule mit einem Acetonitril/Wasser Gradientensystem untersucht.

Es zeigte sich, dass sich der *n*-Hexan und der Dichlormethanextrakt in ihrer Zusammensetzung nur unwesentlich unterschieden (Abb. 32). Mit einem langsam ansteigenden Acetonitrilgehalt (Methode KHEX) konnte eine gute Auftrennung der Inhaltsstoffe an einer RP18 Umkehrphase erreicht werden. Die Hauptinhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza* zeichnen sich durchgehend durch zahlreiche UV-Maxima bis zu einer Wellenlänge von 460 nm aus. Für den Vergleich verschiedener Extrakte waren Messungen bei einer Wellenlänge von 254 nm optimal.

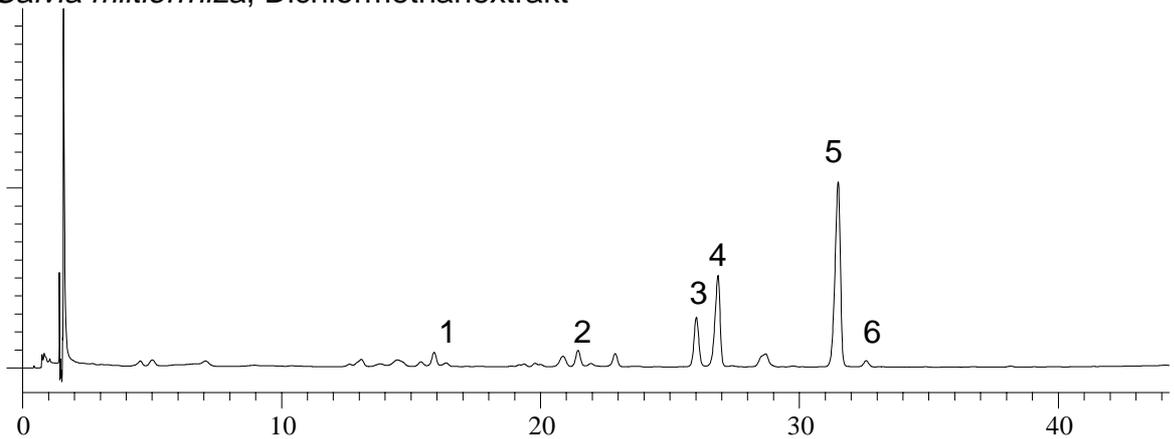
Die HPLC-Analyse des Methanolextraktes brachte auf RP-18 Material kein befriedigendes Ergebnis. Auch bei flachem Gradienten eluierten die hydrophilen Inhaltsstoffe gleich zu Beginn des Laufes zwischen 0,5 und 2,3 min. Die lipophileren Leitsubstanzen waren nur noch in Spuren zu erkennen. Sie waren durch dünnschichtchromatographischen Analyse des Methanolextraktes besser zu detektieren (Abschnitt 3.1.2.).



Salvia miltiorrhiza, n-Hexan-Extrakt



Salvia miltiorrhiza, Dichlormethanextrakt



Salvia miltiorrhiza, Dekokt nach Abtrennung der polaren Inhaltsstoffe

Abbildung 32: HPLC-Fingerprint-Chromatogramme von *Salvia miltiorrhiza*-Extrakten verschiedener Polarität

Da wir uns auf Grund der pharmakologischen Voruntersuchungen dazu entschlossen hatten den sehr lipophilen *n*-Hexanextrakt genauer zu untersuchen, die Droge in China allerdings hauptsächlich als wässriger Auszug verabreicht wird, interessierte uns, welche der lipophilen Inhaltsstoffe im Dekokt enthalten waren (Herstellung s. Kapitel F.4.1.3). Um eine Aufkonzentrierung der lipophilen Bestandteile zu erreichen, wurde der Dekokt vor der HPLC-Untersuchung auf eine Extrelutsäule gegeben und mit Chloroform extrahiert. In Abbildung 35 ist das HPLC-Chromatogramm des Dekoktes abgebildet. Man erkennt, dass die Hauptsubstanzen des *n*-Hexanextraktes, Tanshinon IIa, Cryptotanshinon, Tanshinon I und 15,16-Dihydrotanshinon, trotz ihrer Lipophilie auch im Dekokt zu finden sind. Eine Anwendung der Droge als Teezubereitung ist daher durchaus begründet, da die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Wirkstoffe in der traditionellen Zubereitung auch detektiert werden konnten.

Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand von Inhaltsstoffen aus *Salvia miltiorrhiza*, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Peak	Rt (min)	Verbindung
1	15,9	3-OH Tanshinon IIa
2	21,4	15,16-Dihydrotanshinon
3	26,0	Cryptotanshinon
4	26,8	Tanshinon I
5	31,5	Tanshinon IIa
6	32,6	Miltiron

Tabelle 24: Retentionszeiten der wichtigsten Inhaltsstoffe des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhizae radix* im HPLC-Trennsystem KGUT

Durch die charakteristischen UV-Spektren der einzelnen Substanzen ist eine Identifizierung der Leitsubstanzen durch HPLC Analyse mit Diodenarray-Detektion sehr einfach möglich. In Abbildung 33 ist eine Übersicht der UV-Spektren aufgeführt.

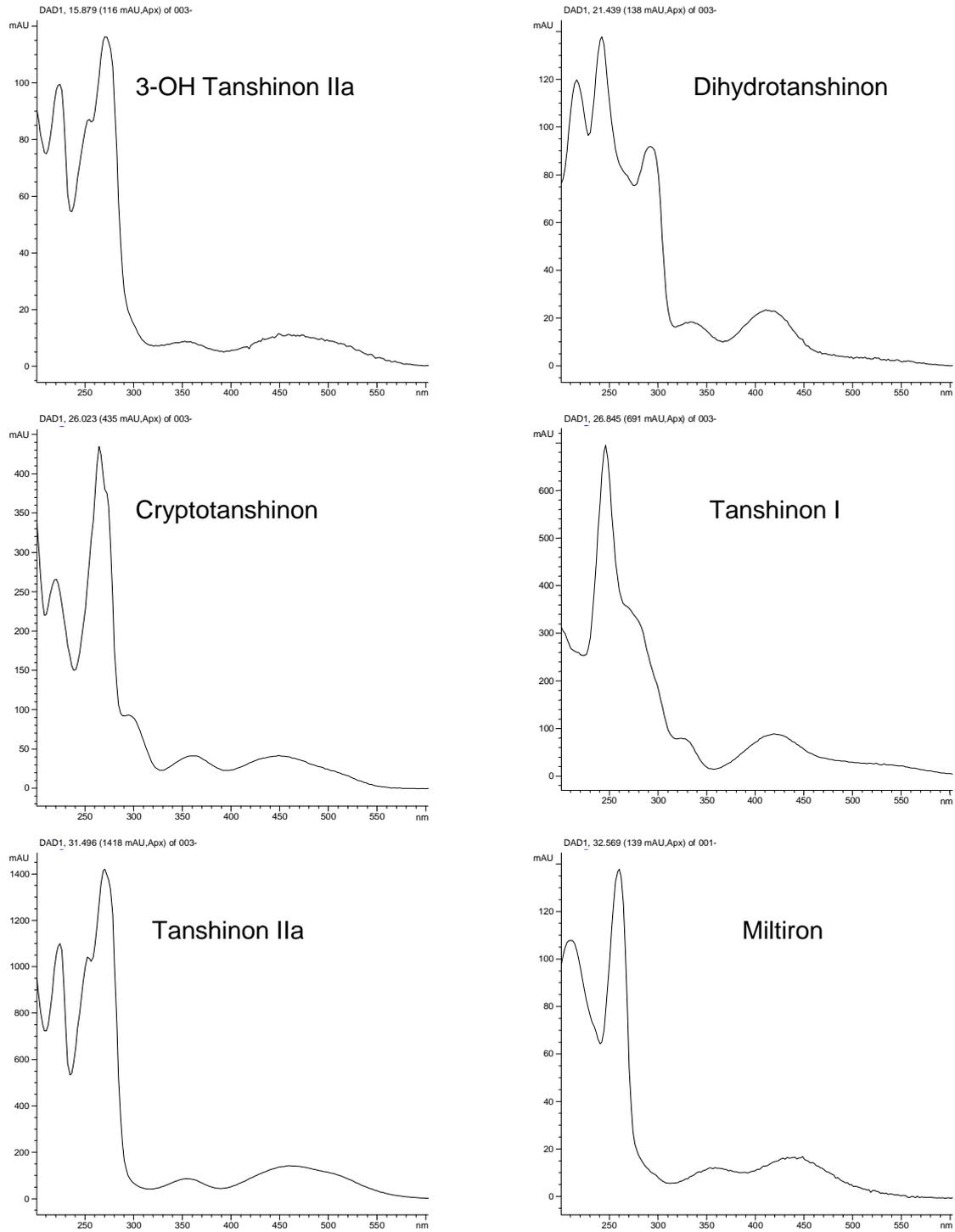


Abbildung 33: Online aufgenommene UV-Spektren der Hauptpeaks

3.1.2 Dünnschichtchromatographische Analyse

Für die dünnschichtchromatographische Trennung des *n*-Hexanextraktes von *S. miltiorrhizae radix* auf Kieselgel erwiesen sich Fließmittelgemische aus *n*-Hexan/Ethylacetat (80 : 20, FM1) und aus Toluol, Ethylacetat und Eisessig (80 : 15 : 5, FM4) am geeignetsten. Die Zuordnung der aufgetrennten Zonen wurde durch Vergleich mit den isolierten Inhaltsstoffen vorgenommen.

Detektion bei Tageslicht:

Durch die zahlreichen roten Farbstoffe, die für *Salvia miltiorrhiza* typisch sind, konnte ein Dünnschichtchromatogramm schon durch Betrachtung im Tageslicht Aufschlüsse über die Zusammensetzung des Extraktes geben. In einem typischen Dünnschichtchromatogramm eines *n*-Hexanextraktes sind Miltiron, Tanshinon IIa, Tanshinon I, Cryptotanshinon und 15,16-Dihydrotanshinon als Hauptzonen sichtbar (Abb. 34).

Die Direktauswertung unter UV 254 nm und UV 365 nm brachte im Vergleich zur Detektion bei Tageslicht keine weiteren Aufschlüsse, da die wichtigsten fluoreszierenden Substanzen des *n*-Hexanextraktes durch ihre charakteristische Färbung bereits bei Tageslicht sichtbar waren.

Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz

Nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und anschließendem Erwärmen wurden weitere violett und blau gefärbte Zonen sichtbar, von denen die dominanteste als Stigmasterol (Rf 0,35) identifiziert werden konnte (Abb. 34).

Vergleich der unterschiedlichen Drogenextrakte

Vergleicht man die durch Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität hergestellten Extrakte, so erkennt man eine große Ähnlichkeit zwischen *n*-Hexan- und Dichlormethanextrakt, der auch schon bei den HPLC-Untersuchungen beobachtet werden konnte. Bis auf das sehr lipophile Miltiron erscheinen alle charakteristischen Inhaltsstoffe in beiden Extrakten. Die lipophilen Leitsubstanzen sind auch im polareren Methanolextrakt und im Dekokt noch detektierbar. Vergleicht man diese Beobachtung mit den HPLC-Untersuchungen, so muss allerdings davon ausgegangen werden, dass der

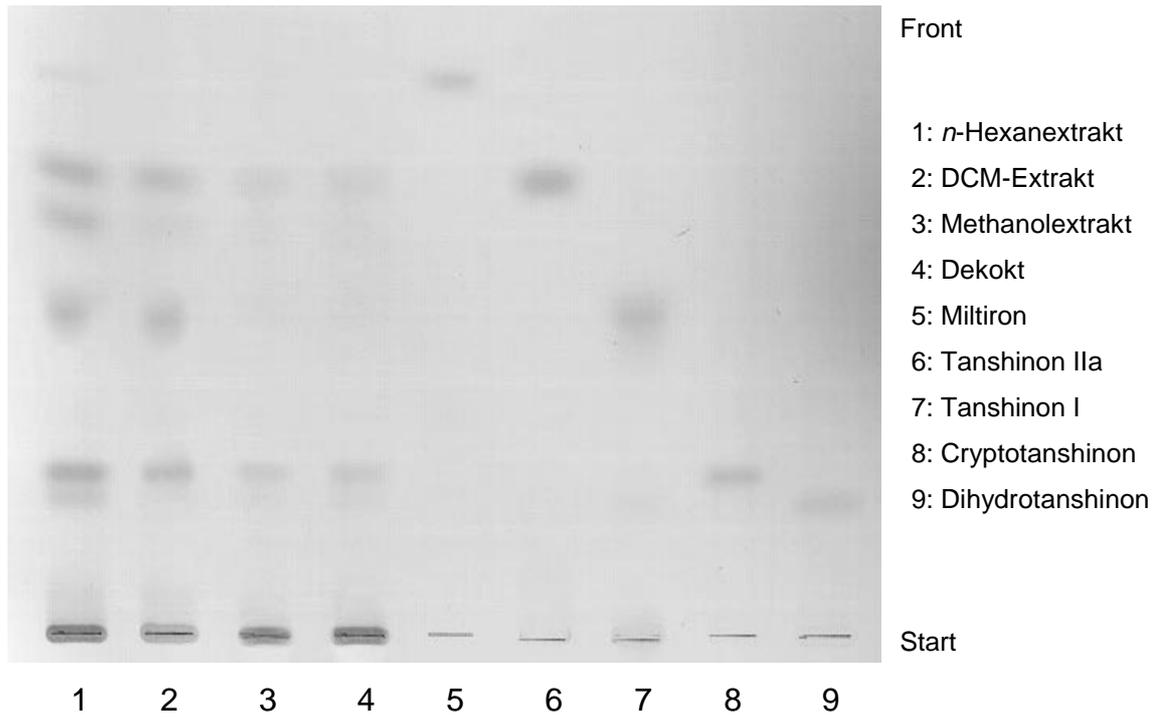
Anteil an polaren Inhaltsstoffen erwartungsgemäß im Methanolextrakt klar dominierend ist (s. Abschnitt 3.1.1).

Verbindung	Rf-Wert (FM1)	Tageslicht	Anisaldehyd- Schwefelsäure-Reagenz
Miltiron	0,83	gelborange	gelbbraun
Tanshinon IIa	0,77	hellrot	rot
Tanshinon I	0,48	braunrot	violett
Stigmasterol	0,35	-	hellbraun
Cryptotanshinon	0,24	orange	braunorange
Dihydrotanshinon	0,19	braunrot	hellbraun

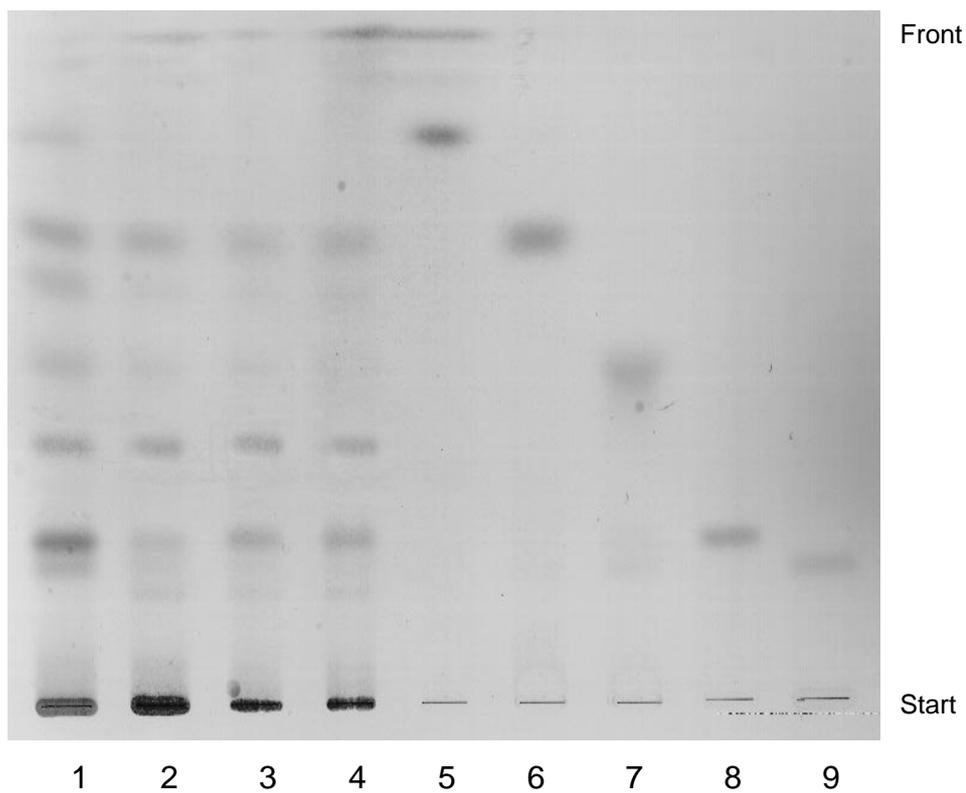
Tabelle 25: Rf-Werte der isolierten Vergleichssubstanzen; Trennsystem FM1

Vergleich verschiedener Drogenmuster

Um Schwankungen innerhalb verschiedener Chargen festzustellen, wurden einige Extrakte der in Kapitel F.1.2 genannten Drogenmuster aufgetragen und im Laufmittelsystem FM4 (Toluol/Ethylacetat/Eisessig) entwickelt (Abb. 35). Bezüglich der Qualität der Chargen ergab sich ein sehr einheitliches Bild. Die oben beschriebenen Inhaltsstoffe konnten in allen Extrakten wiedergefunden werden. Allerdings konnten Unterschiede in der Quantität der einzelnen Inhaltsstoffe beobachtet werden. Ausführliche Untersuchungen zur Quantifizierung sind in Abschnitt 2.3 dieses Kapitels aufgeführt.



Detektion bei Tageslicht



Detektion mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz

Abbildung 34: Dünnschichtchromatogramm verschiedener *n*-Hexanextrakte von *Salvia miltiorrhiza* und isolierter Vergleichssubstanzen im Trennsystem FM1, Detektion bei Tageslicht und nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure

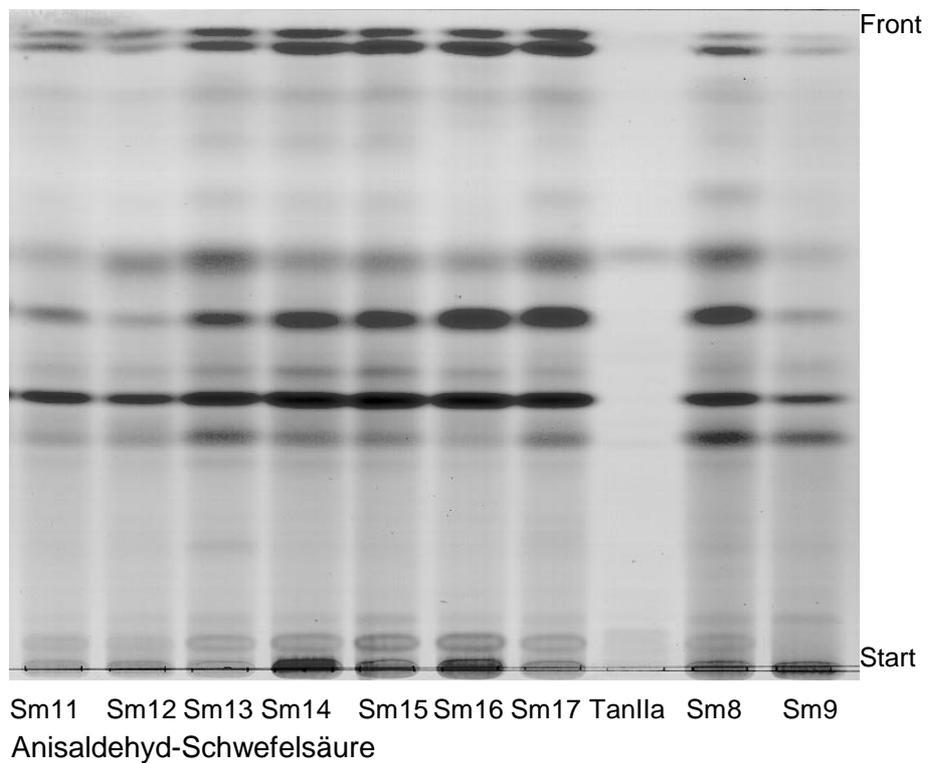
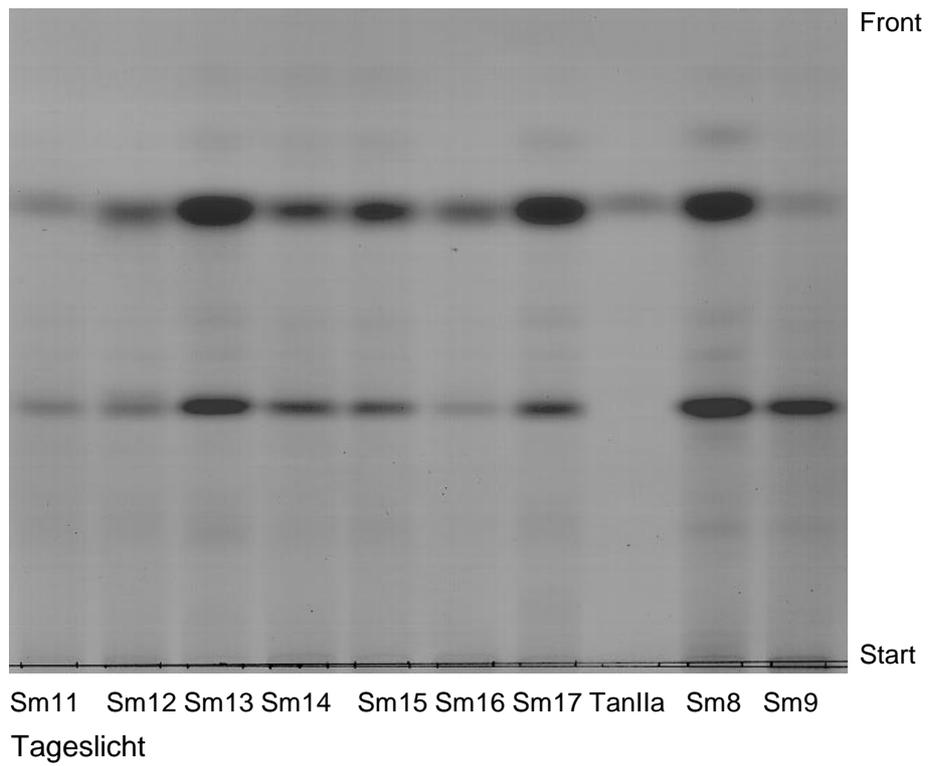


Abbildung 35: Dünnschichtchromatographischer Vergleich von *n*-Hexanextrakten verschiedener Drogenmuster von *Danshen* in Trennsystem FM4; Detektion bei Tageslicht und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz

3.2 Quantitative Bestimmungen der Hauptinhaltsstoffe mittels HPLC

Durch die Isolierung der Hauptverbindungen von *S. miltiorrhiza*, Tanshinon IIa, Tanshinon I, Cryptotanshinon und 15,16-Dihydrotanshinon wurde eine quantitative HPLC-Bestimmung dieser Inhaltsstoffe in Extrakten verschiedener Drogenmuster mittels externer Standardkalibrierung (s. Kapitel G.4.4.) durchgeführt. Zur Erstellung der Eichgraden (s. Abb. 36) wurden mindestens fünf verschiedene Verdünnungen der untersuchten Verbindungen je zweimal in die HPLC eingespritzt. Tabelle 26 führt die jeweils ermittelten Eichfaktoren und die Korrelationskoeffizienten auf. Als Korrelationskoeffizient für die aus Einspritzkonzentration und Peakflächen durch lineare Regression errechneten Eichgraden wurde für alle Verbindungen 0,99 ermittelt. Die Wiederfindung lag jeweils bei $\pm 5\%$. Der prozentuale Gehalt der 4 Hauptverbindungen wurde auf diese Weise für den *n*-Hexanextrakt und für die getrocknete Droge der verschiedenen Drogenmuster ermittelt.

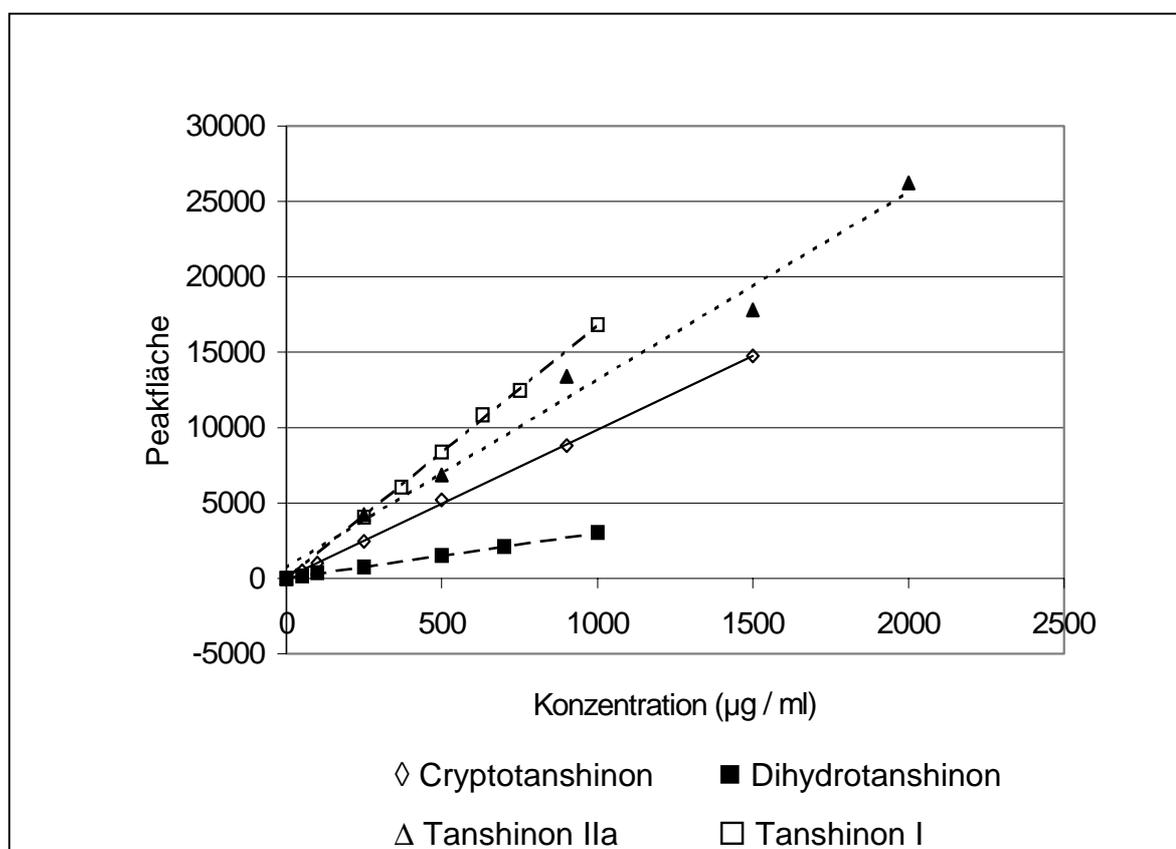


Abbildung 36: Eichgraden zur Ermittlung der Eichkoeffizienten für die quantitative Bestimmung verschiedener Inhaltsstoffe aus *S. miltiorrhiza*

Inhaltsstoff	Eichfaktor	Korrelationskoeffizient
Tanshinon IIa	12,9	0,9991
Tanshinon I	16,8	0,0087
Cryptotanshinon	9,9	0,9997
15,16-Dihydrotanshinon	3,3	0,9995

Tabelle 26: Eichfaktoren und Korrelationskoeffizienten der Inhaltsstoffe aus *Salviae miltiorrhizae radix*

Von den vorliegenden Drogenmustern wurden jeweils zwei *n*-Hexanextrakte hergestellt und diese mit HPLC untersucht. Abbildung 38 zeigt den ermittelten prozentualen Gehalt der verschiedenen Inhaltsstoffe in den jeweiligen Drogenmustern in der getrockneten Droge.

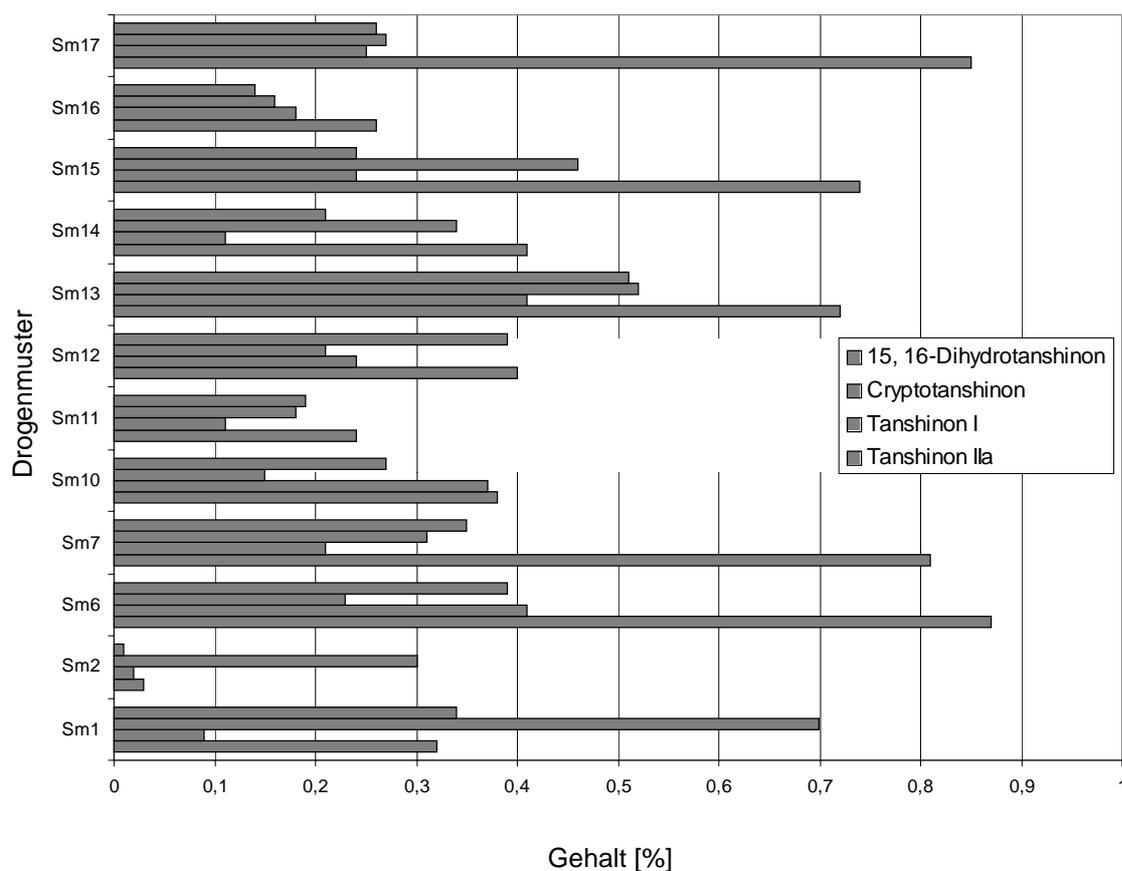


Abbildung 38: Gehalt der Hauptinhaltsstoffe in verschiedenen Drogenmustern von *Danshen* in Gewichtsprozent bezogen auf die getrocknete Droge

	Tanshinon IIa	Tanshinon I	Cryptotanshinon	15,16-Dihydrotanshinon
Sm1	0,32	0,09	0,7	0,34
Sm2	0,03	0,02	0,3	0,01
Sm6	0,87	0,41	0,23	0,39
Sm7	0,81	0,21	0,31	0,35
Sm10	0,38	0,37	0,15	0,27
Sm11	0,24	0,11	0,18	0,19
Sm12	0,4	0,24	0,21	0,39
Sm13	0,72	0,41	0,52	0,51
Sm14	0,41	0,11	0,34	0,21
Sm15	0,74	0,24	0,46	0,24
Sm16	0,26	0,18	0,16	0,14
Sm17	0,85	0,25	0,27	0,26

Tabelle 27: Gehalt der Hauptinhaltsstoffe in verschiedenen Drogenmustern in Gewichtsprozent bezogen auf die getrocknete Droge

Der Gehalt der untersuchten Inhaltsstoffe schwankte innerhalb der untersuchten Drogenmuster relativ stark. Der vom chinesischen Arzneibuch für *Salvia miltiorrhiza* vorgegebene Mindestgehalt von 0,2% Tanshinon IIa wurde nur bei einem der untersuchten Drogenmuster (Sm2) unterschritten. In dieser Charge war Cryptotanshinon der dominierende Inhaltsstoff und lag mit 0,7% relativ hoch. Tanshinon IIa dominierte in allen untersuchten Drogenmustern mit Ausnahme von Sm1 und Sm2. Auch der Gehalt der übrigen untersuchten Inhaltsstoffe schwankte innerhalb der untersuchten Chargen relativ stark.

Bezogen auf den getrockneten *n*-Hexanextrakt wurden für den Gewichtsanteil von Tanshinon IIa Werte zwischen 2,1% (Sm2) und 20,7% (Sm7) ermittelt. Der Anteil an Cryptotanshinon im Gesamtextrakt lag zwischen 5,1% und 18,2%, der Anteil an Tanshinon I lag mit Werten zwischen 2,0% und 10,2% in einem ähnlichen Bereich, ebenso wie 15,16-Dihydrotanshinon mit Werten zwischen 1,9% und 8,9%.

Die Drogenmuster Sm11 bis Sm17 stammen aus einem Anbauprojekt der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau.

3.3 Isolierung und Identifizierung von Inhaltsstoffen aus *Salviae miltiorrhizae radix (Danshen)*

3.3.1 Wirkungsorientierte Isolierung

Die Fraktionierung des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza* erfolgte wirkungsorientiert. Nach jeder säulenchromatographischen Trennung wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Einfluss auf die Leukotrienbiosynthese hin untersucht. *n*-Hexan wurde als Extraktionsmittel gewählt, da bei vorhergegangenen Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Extrakte in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels der *n*-Hexanextrakt durch die größte Aktivität auffiel.

Dieser Extrakt wurde durch Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC) an Kieselgel mit *n*-Hexan / Ethylacetat-Mischungen steigender Polarität zuerst grob fraktioniert. Hierbei erhielten 26 Fraktionen, von denen vor allem die Fraktionen IV-XII im pharmakologischen Screening eine inhibitorische Wirkung auf die 5-Lipoxygenase zeigten. Aus diesen Fraktionen wurden dann schließlich die wirksamen Inhaltsstoffe isoliert. Im ersten Fraktionierungsschritt konnte keine Reinsubstanz gewonnen werden. Die interessanten Fraktionen wurden daher durch Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC) (Fraktionen VI, VIII und X) an Umkehrphasenmaterial oder offene Säulenchromatographie an Kieselgel (Fraktionen V, VII, XI und XII) weiter aufgetrennt. Schließlich war teilweise eine weitere Aufreinigung durch präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an RP 18 Material oder präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel nötig. Eine grobe Übersicht über die Vorgehensweise gibt das Isolierungsschema in Abbildung 39. Ausführliche Beschreibungen zur Isolierung finden sich in Kapitel G.

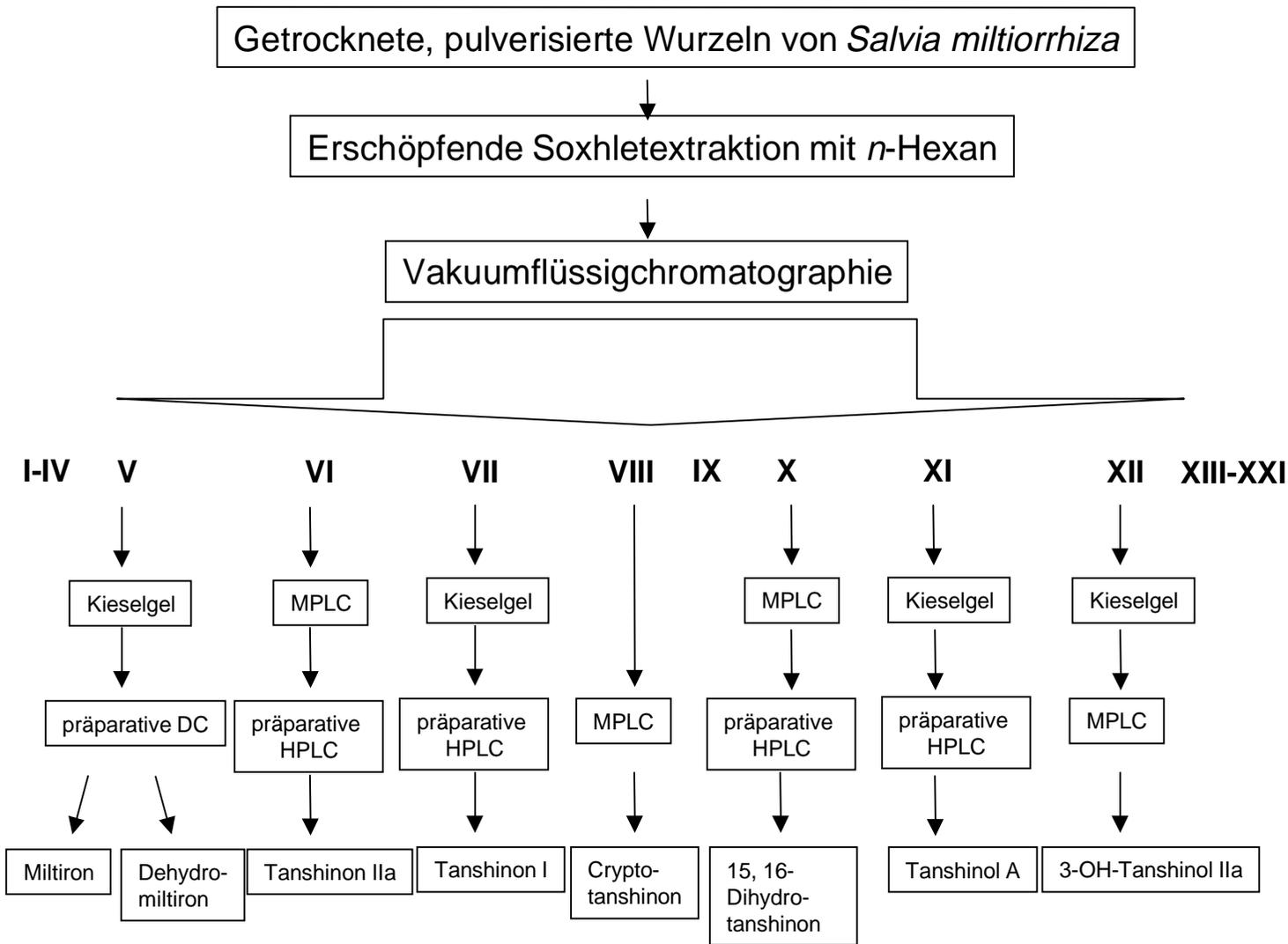
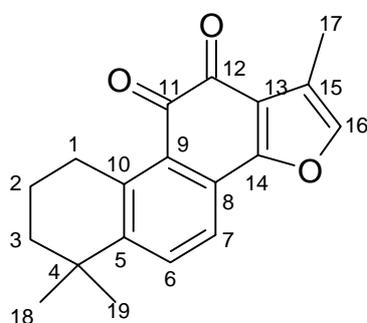


Abbildung 39: Isolierungsschema der aktiven Inhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza*

3.3.2 Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen

Diterpene finden sich in den meisten der über 900 Vertreter der Gattung *Salvia*, dieses Merkmal kann also durchaus zur systematischen Bestimmung dieser Pflanzen herangezogen werden (Rodriguez-Hahn, 1992). Dabei ist für den Subgenus *Salvia*, zu dem auch die hier untersuchte Vertreterin *Salvia miltiorrhiza* gehört (Bentham, 1876), vor allem das Vorhandensein von Diterpenen des Abietantyps typisch.

3.3.2.1 Strukturaufklärung von Tanshinon IIa



Der Hauptpeak im HPLC-Chromatogramm der sehr gut wirksamen Fraktion VI stellte gleichzeitig den auffälligsten Peak im Chromatogramm des *n*-Hexanextraktes dar. Auch vergleichende DC-Untersuchungen von Fraktion VI und dem Gesamtextrakt zeigten, dass es sich hierbei um die Hauptverbindung des Extraktes handelte. Das online aufgenommene UV-Spektrum zeigte einen charakteristischen Verlauf mit zahlreichen UV Maxima (Abb. 41). Auffällig sind dabei die Maxima bei 345 und 460 nm, die in der Literatur als typisch für die meisten Tanshinone, die Hauptinhaltsstoffe von *Salvia miltiorrhiza*, beschrieben sind und auf einen roten Farbstoff hinweisen.

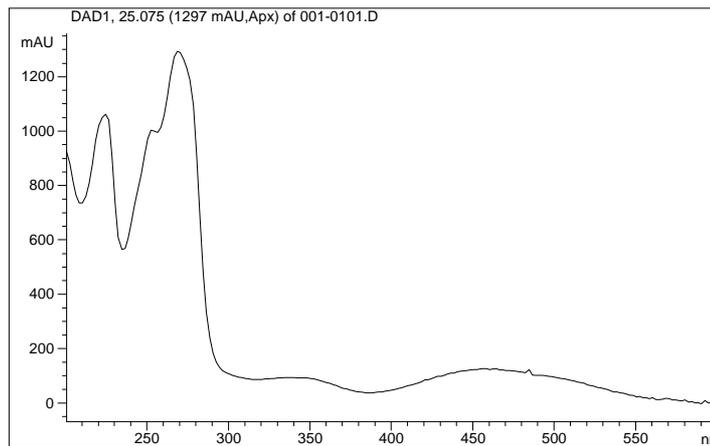


Abbildung 41: Online aufgenommenes UV-Spektrum von Tanshinon IIa

Nach weiterer Auftrennung von Fraktion VI mit Hilfe von MPLC an RP18 Material und anschließender Aufreinigung mit präparativer HPLC (Kapitel G.4.5) wurde die Verbindung in Form von leuchtend orangefarbenen Nadeln isoliert. Laut HPLC-Analyse lag die Substanz in einer Reinheit von 96% vor.

Die massenspektrometrische Untersuchung lieferte für die Verbindung ein Molekulargewicht von 294. Die Substanz wies ein für einen Phenanthrengrundkörper typisches Zerfallsmuster auf (Abb. 42), was wiederum auf das Vorliegen von einem für *Salvia miltiorrhiza* typischen Abietanfarbstoff hinwies.

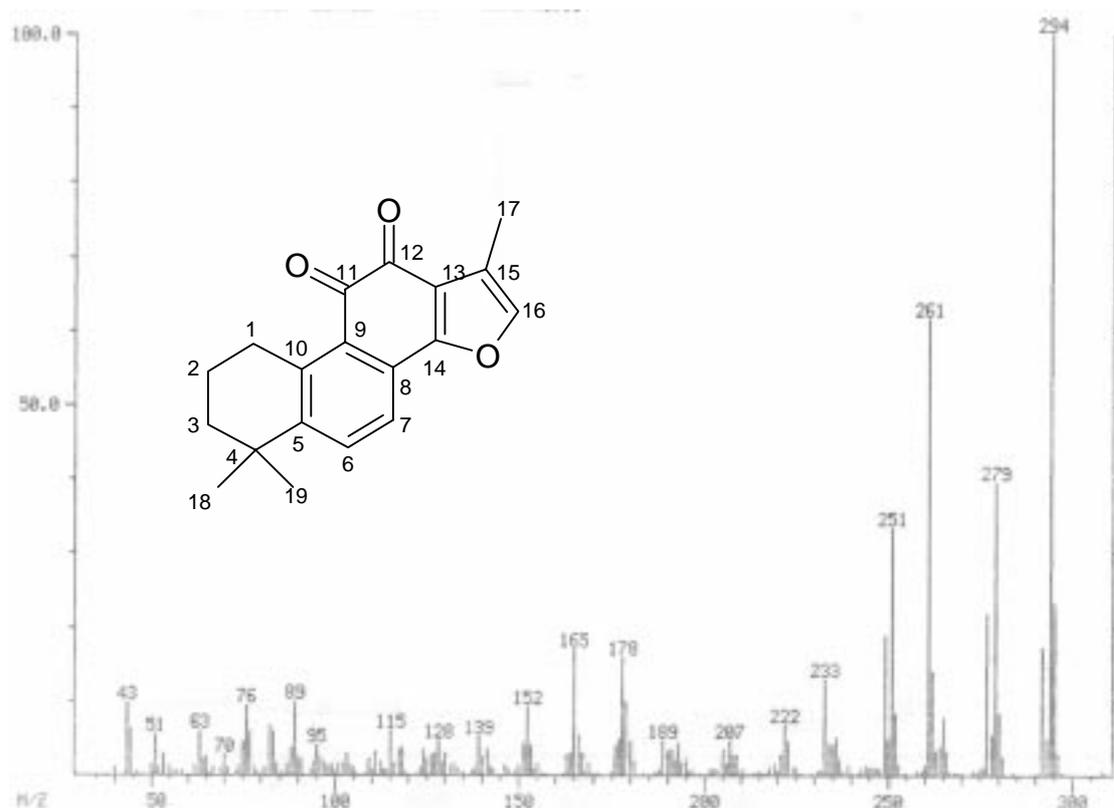


Abbildung 42: EI-MS-Spektrum von Tanshinon IIa

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Hauptsubstanz (s. Abb.43) bestätigte das Vorliegen eines Tanshinons. Im Tieffeldbereich waren die Resonanzen zweier aromatischer Protonen bei δ 7,63 und 7,45 zu finden, die jeweils zu einem Duplett (Kopplungskonstante $J = 8,2$) aufgespalten waren. Es schien sich hierbei also um einen an 4 Positionen substituierten Aromaten zu handeln, was die Vermutung nahe legte, dass es sich dabei um den aromatisierten mittleren Ring des Phenanthrengerüsts handelte. Ein weiteres Signal war im Hochfeld bei δ 7,18 zu sehen. Diese Resonanz eines Protons erschien als Quartett mit der typischen Ausprägung einer Fernkopplung ($J = 1,2$) und wies auf eine Doppelbindung im Furanring hin. Im aliphatischen Bereich waren bei δ 1,7, 1,65 und 3,18 die Resonanzen von drei Protonen in Form von Multipletts zu sehen, die durch Protonen des nichtaromatischen Ringes des Phenanthrengrundgerüsts zustande kamen. Desweiteren erschien bei δ 1,28 ein Singulett und bei δ 2,23 ein Duplett (mit $J=1,2$), die durch drei bzw. sechs Protonen zustande kamen und auf das Vorhandensein von 3 Methylgruppen hinwiesen. Die gemessenen $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmten mit denen in der Literatur

angegebenen Daten für Tanshinon IIa (Ryu *et al.*, 1997) überein (Tab.28). Die Struktur von Tanshinon IIa wurde 1940 erstmals von Wessely *et al.* aufgeklärt.

Tanshinon IIa		
	eigene Daten 500 MHz; CDCl ₃ δ(ppm); M; J (Hz)	Ryu <i>et al.</i> , 1997 500 MHz; CDCl ₃ δ(ppm); M; J (Hz)
H-1	3,18, m	3,18; m;
H-2	1,73, m	1,71; m;
H-3	1,65, m	1,62; m;
H-6	7,63, d; 8,2	7,66; d; 8,2
H-7	7,45, d; 8,2	7,45; d; 8,2
H-16	7,18, d; 1,2	7,16; d; 1,1
H-17	2,23, d; 1,2	2,20; d; 1,1
H-18	1,28,s	1,26; s;
H-19	1,28,s	1,26; s;

Tabelle 28: ¹H-NMR Daten von Tanshinon IIa im Vergleich mit Literaturdaten

Auch der Vergleich der Signale des ¹³C-NMR Spektrums zeigte Übereinstimmung mit denen in der Literatur (Luo *et al.*, 1984) angegebenen Daten (Tabelle 29, Abb. 44). Im Tieffeld findet man die Resonanzen der für Tanshinone charakteristischen Carbonylfunktionen von C-11 und C-12 bei δ 183,9 und 176. Im Hochfeld werden 7 aliphatische C-Atome sichtbar, wobei die Signale der chemische äquivalenten C-18 und C-19 zusammenfallen.

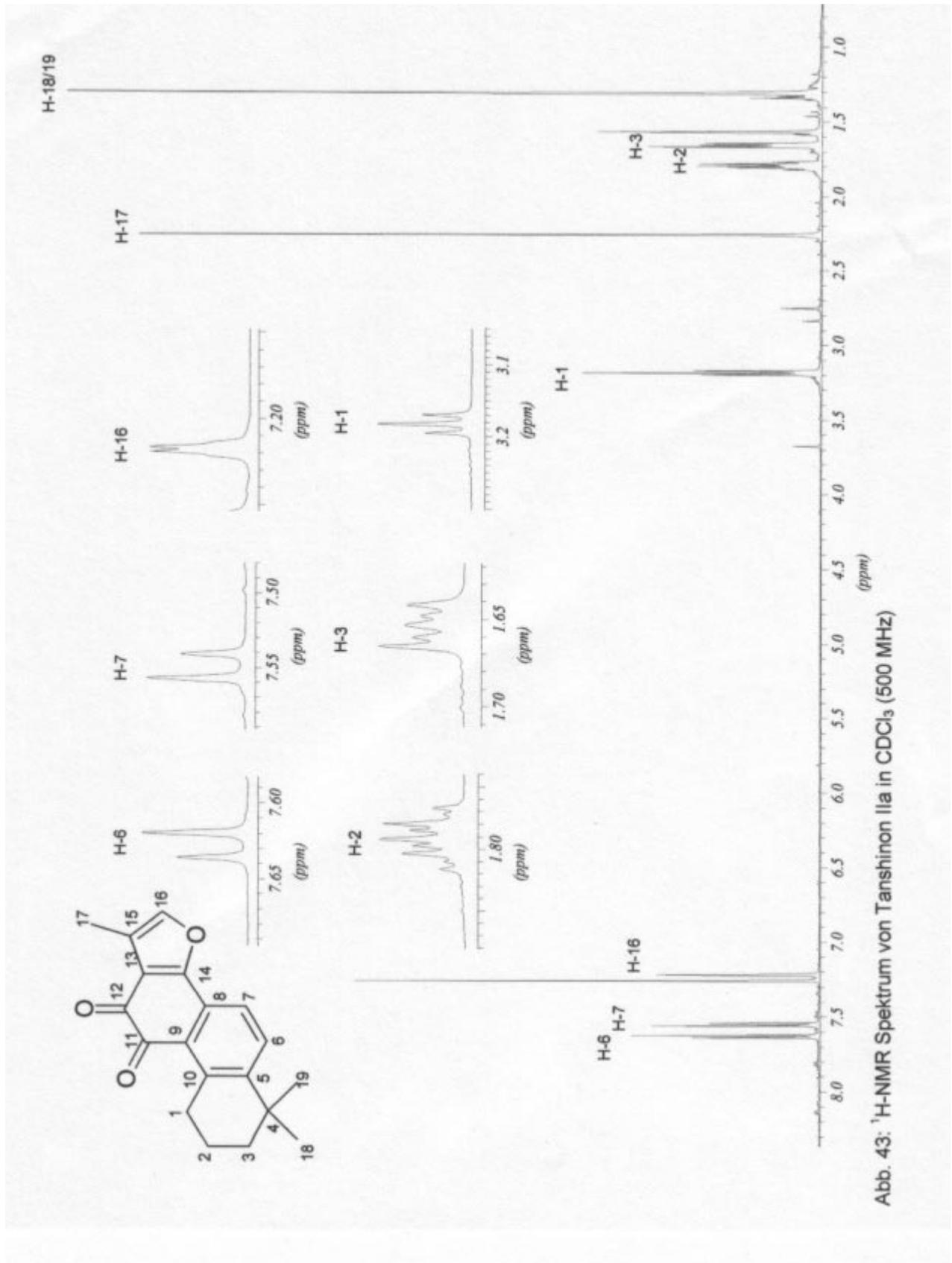


Abb. 43: ¹H-NMR Spektrum von Tanshinon IIa in CDCl₃ (500 MHz)

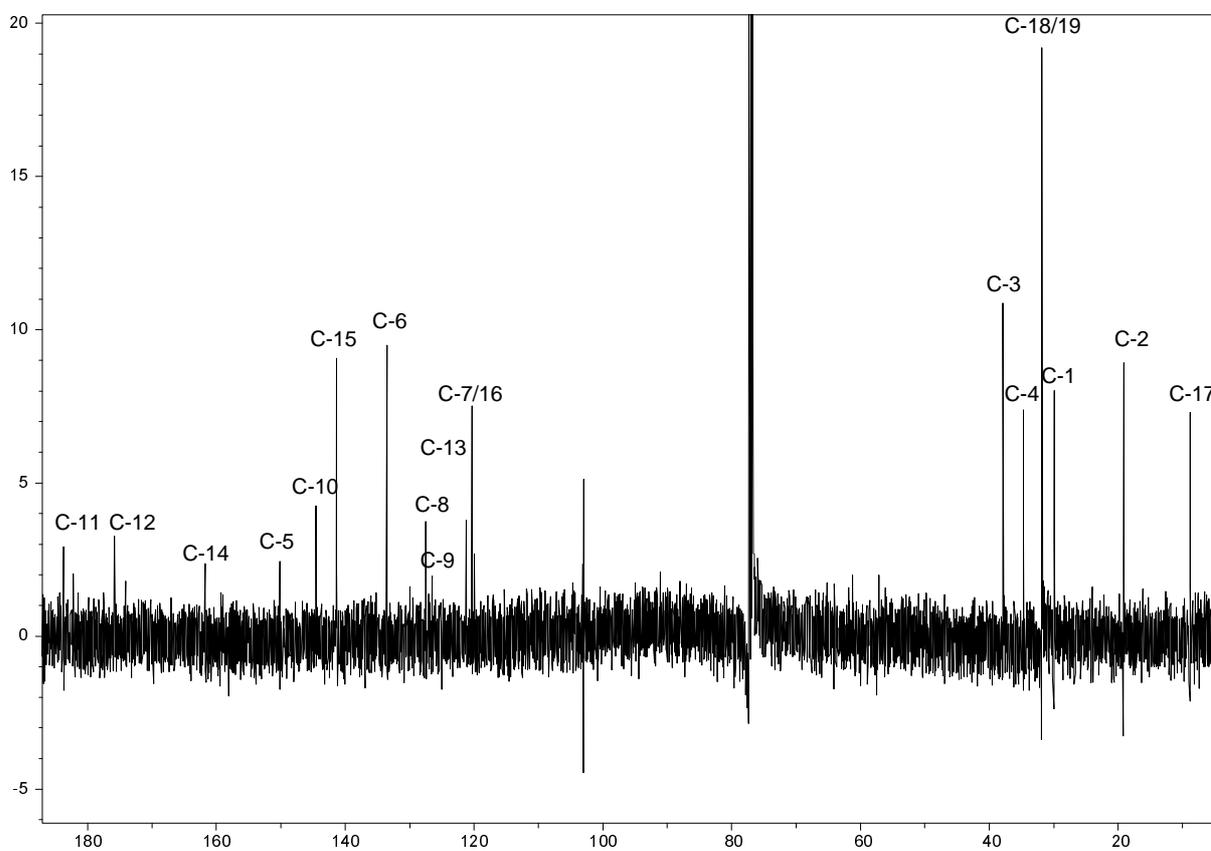


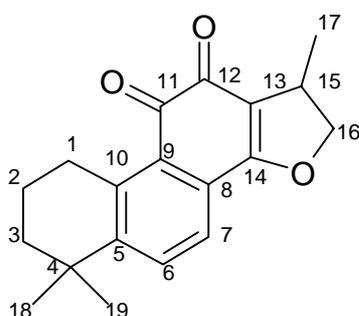
Abbildung 44: ^{13}C -NMR Spektrum von Tanshinon IIa in CDCl_3 , 125 MHz

Tanshinon IIa		
C-Atom	eigene Daten 125 MHz; CDCl_3 δ (ppm)	Ryu <i>et al.</i> , 1997 125 MHz; CDCl_3 δ (ppm)
1	29,9	29,8
2	19,1	19,0
3	37,8	37,7
4	34,6	34,7
5	150,0	150,0
6	133,4	133,4
7	119,9	119,8
8	127,4	127,3
9	126,3	126,3
10	144,4	144,3

11	183,6	183,4
12	175,7	175,6
13	121,1	121,0
14	161,6	161,6
15	141,2	141,2
16	120,2	120,1
17	8,8	8,7
18	31,8	31,8
19	31,8	31,8

Abbildung 45 ^{13}C -NMR Daten von Tanshinon IIa im Vergleich mit Literaturdaten

3.3.2.2 Strukturaufklärung von Cryptotanshinon



Die Hauptsubstanz von Fraktion VIII ließ sich mit Hilfe von MPLC an RP-18 Material weiter aufreinigen. Wir erhielten leuchtend orangerote Kristalle. Laut HPLC-Analyse lag die Verbindung in einer Reinheit von 98% vor.

Das UV-Spektrum zeigte sich wiederum die für viele Tanshinone charakteristischen Maxima bei 360 und 450 nm. Das Spektrum ähnelte auch sonst stark dem für Tanshinon IIa ermitteltem Spektrum (Abb. 46).

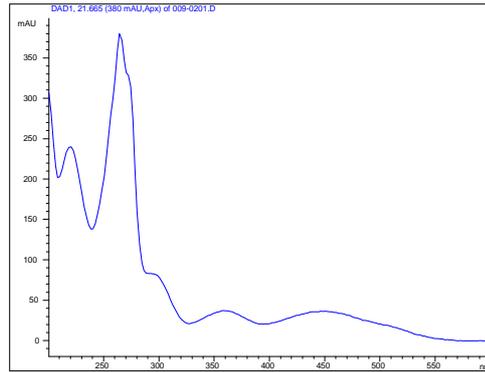


Abbildung 46: UV-Spektrum von Cryptotanshinon

Das Massenspektrum der Verbindung zeigt ein Molekulargewicht von 296. Die Fragmente zeigen das schon im Massenspektrum von Tanshinon IIa auffallenden Muster (Abb.47). Ein Vergleich mit einer MS-Spektrenbibliothek lieferte auch hier die Vermutung, dass die vorliegende Substanz ebenfalls aus einem Phenanthrengrundkörper bestand.

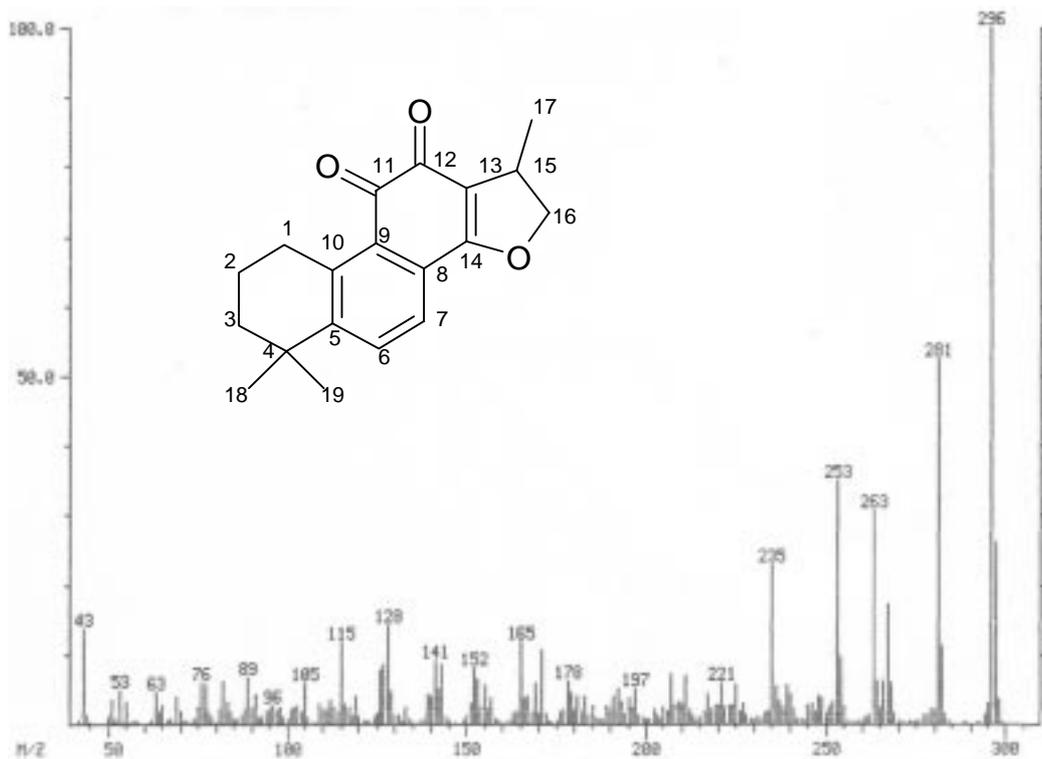


Abbildung 47: EI-MS Spektrum von Cryptotanshinon

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum erhärtete den Verdacht, dass es sich auch bei dieser Substanz um ein Tanshinon handelt. Es zeigten sich ähnliche Signale wie im

¹H-NMR Spektrum von Tanshinon IIa, die sich allerdings in einigen wesentlichen Punkten unterschieden (Abb. 48). Im Hochfeld war nun nur noch die Resonanz von zwei aromatischen Protonen, zu sehen (δ 7,64 und 7,49). Neben den Resonanzen der aliphatischen Protonen die bereits im ¹H-NMR Spektrum von Tanshinon IIa zu sehen waren, fielen drei weitere Signale bei 3,59, 4,36 und 4,89 ppm auf. Dies ließ darauf schließen, dass im Furanring dieser Struktur keine Doppelbindung vorhanden war. Bei δ 3,59 erschien die Resonanz des Protons an C-15 in Form eines Multipletts, die beiden Protonen an C-16 waren bei δ 4,36 und 4,89 zu sehen, wobei der β -ständige Wasserstoff durch Fernkopplung mit der C-17 Methylgruppe in ein Multiplett aufgespalten war. Das ¹H-NMR-Spektrum wies also auf das Vorliegen von Cryptotanshinon hin. Dieser Farbstoff wurde von Baille *et al.* 1968 zum ersten mal für *Salvia miltiorrhiza* beschrieben. Ein Vergleich mit ¹H NMR-Daten aus der Literatur bestätigte diesen Verdacht (Tab. 29).

Cryptotanshinon		
	eigene Daten 500 MHz; CDCl ₃ δ (ppm); M; J (Hz)	Ikeshiro <i>et al.</i> , 1983 200 MHz; CDCl ₃ δ (ppm); M; J (Hz)
H-1	3,22, t ; 6,3	3,22; t; 6,5
H-2	1,79, m	1,80; m
H-3	1,66, t	1,66; t
H-6	7,64, d; 8,2	7,59,m
H-7	7,49, d; 8,2	7,59,m
H-15	3,59, m	3,61; m
H-16 α	4,89, t	4,89; t
H-16 β	4,36, dd; 9,5; 6,3	4,37; dd; 9,5; 6
H-17	1,35, d; 6,4	1,36; d; 6,8
H-18	1,31, s	1,31; s
H-19	1,31, s	1,31; s

Tabelle 29: Vergleich der ¹H-NMR Daten von Cryptotanshinon im Vergleich mit Literaturwerten

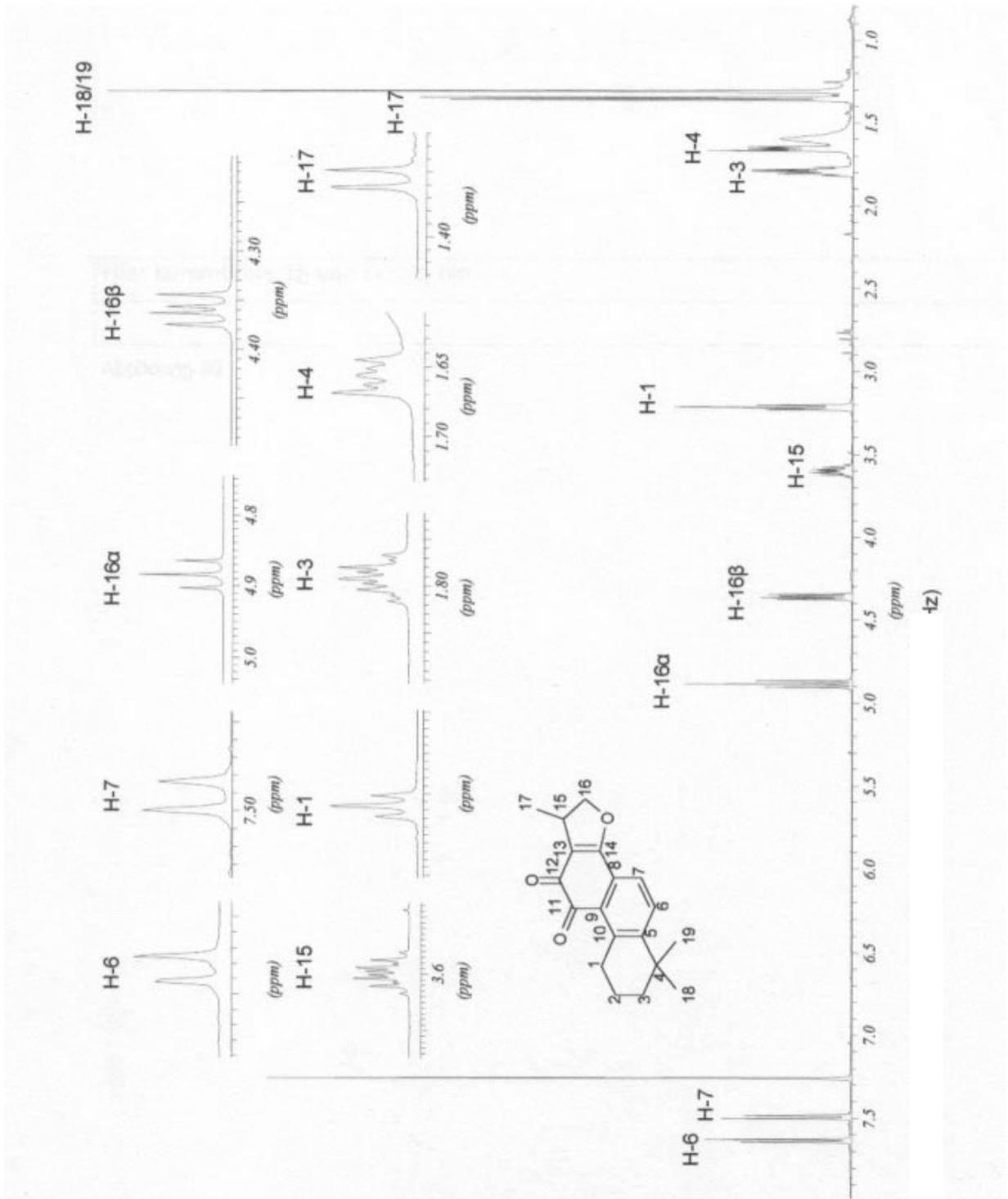
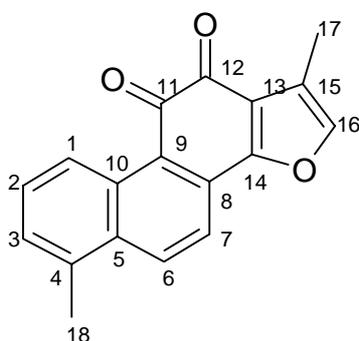


Abbildung 48: ¹H-Spektrum von Cryptotanshinon in CDCl₃ (500 MHz)

3.3.2.3 *Srukuraufklärung von Tanshinon I*

Im HPLC-Chromatogramm der ebenfalls sehr gut wirksamen Fraktion VII war neben dem Peak von Tanshinon IIa ein weiterer Hauptpeak mit einem charakteristischem UV Spektrum zu sehen. Ein Maximum bei 420 nm ließ wiederum auf die Präsenz eines roten Farbpigmentes schließen (Abb.49).

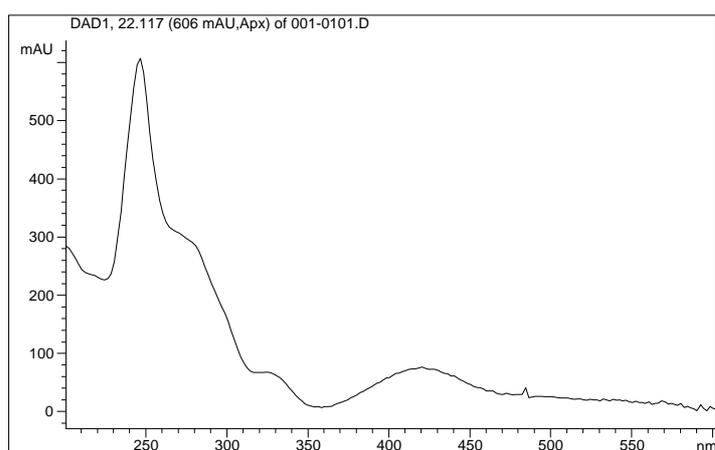


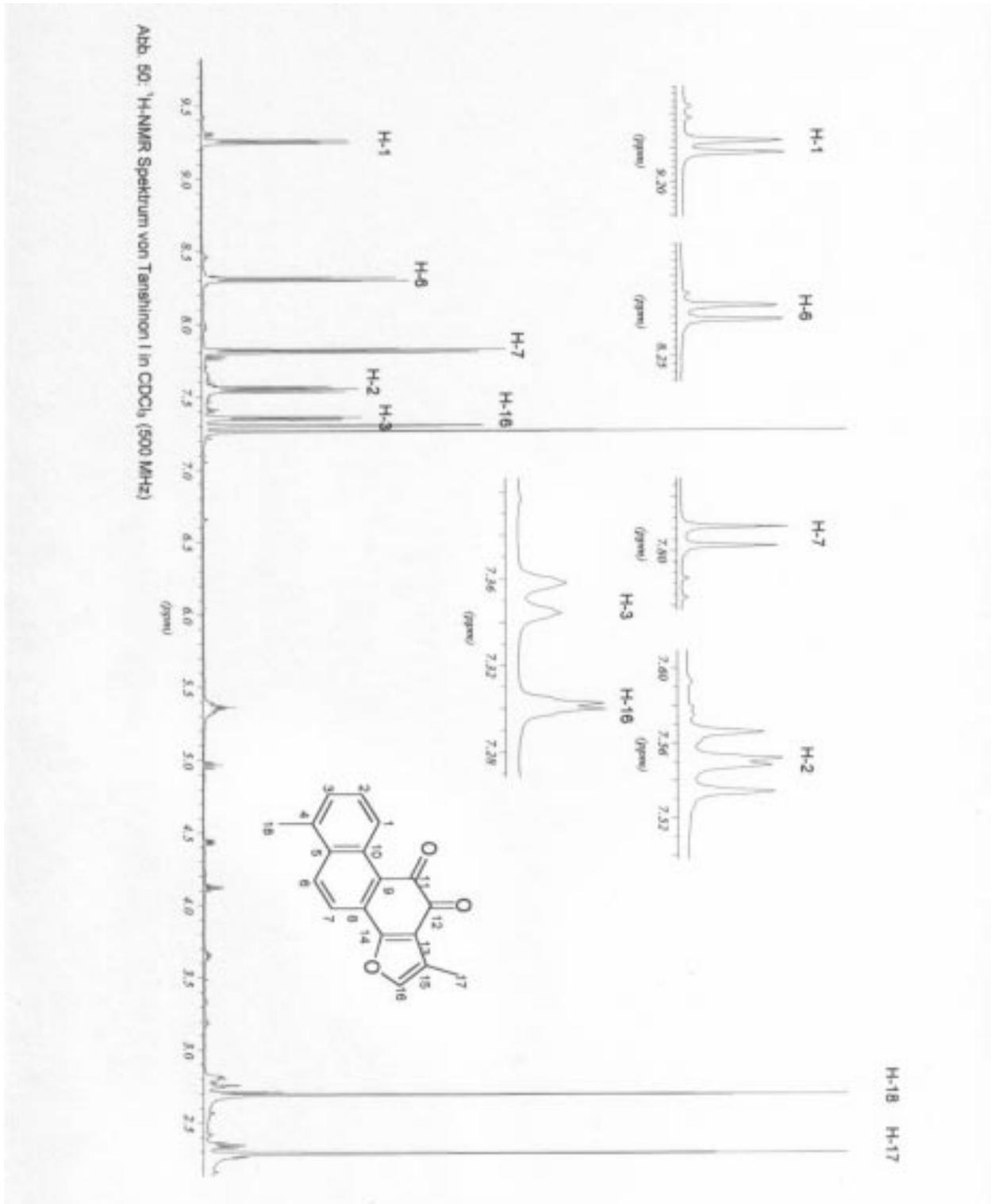
Abbildung 49: UV Spektrum von Tanshinon I

Die Substanz lies sich durch offene Säulenchromatographie an Kieselgel weiter auftrennen und wurde mittels präparativer HPLC an RP-18 Material gereinigt. Wir erhielten dunkelrote Kristalle, die sich sehr gut in Dichlormethan lösen ließen. Die HPLC-Analyse wies für die isolierte Verbindung eine Reinheit von 92,4% nach. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten ein Molekulargewicht von 276 auf. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (Abb. 50) der isolierten Verbindung waren im Tieffeld mehrere Resonanzen aromatischer Protonen sichtbar. Bei δ 8,29 und 7,81 war jeweils ein Duplett mit $J = 8,5$ zu sehen, was auf zwei orthoständige Protonen hinwies.

Desweiteren erschienen im Tieffeldbereich des Spektrums die Resonanzen von drei jeweils miteinander koppelnden Protonen mit einem Duplett bei δ 9,23 ($J = 8,8$), einem Duplett bei δ 7,35 ($J = 6,9$) und einem Duplett vom Duplett bei δ 7,55 ($J = 8,8; 6,9$). Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der isolierten Verbindung um eine Struktur handelt, bei der auch der A-Ring des Phenanthrengrundgerüsts in aromatischer Form vorlag. Bei δ 7,3 erschien die Resonanz eines weiteren aromatischen Protons, das zu einem Duplett ($J = 1,2$) aufgespalten war, was auf das Vorhandensein einer weiteren Doppelbindung hinwies. Im aliphatischen Bereich des Spektrums erkannte man außerdem die Resonanzen zweier Methylgruppen bei δ 2,27 und 2,67. Auf Grund dieser Beobachtungen schien es sich bei der isolierten Verbindung um das von Wessely *et al.* 1940 zum ersten mal beschriebene Tanshinon I zu handeln, was durch den Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten mit Werten aus der Literatur bestätigt werden konnte (Tab.30).

Tanshinon I		
	eigene Daten 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); M; J (\text{Hz})$	Ryu <i>et al.</i> , 1997 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); M; J (\text{Hz})$
H-1	9,23; d; 8,8	9,20; d; 8,9
H-2	7,55; dd; 8,8; 6,9	7,52; dd, 8,9; 7,0
H-3	7,35; d; 6,9	7,34; d; 7,0
H-6	8,29; d; 8,5	8,25; d; 8,2
H-7	7,81; d; 8,5	7,66; d; 8,2
H-16	7,30; d; 1,2	7,29; d; 1,1
H-17	2,27; d; 1,2	2,27; d; 1,1
H-18	2,67; s	2,66; s;

Tabelle 30: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten von Tanshinon I im Vergleich mit Literaturwerten



Auch ein ^1H - ^1H COSY Spektrum bestätigte die Identifizierung von Tanshinon I (Abb. 51).

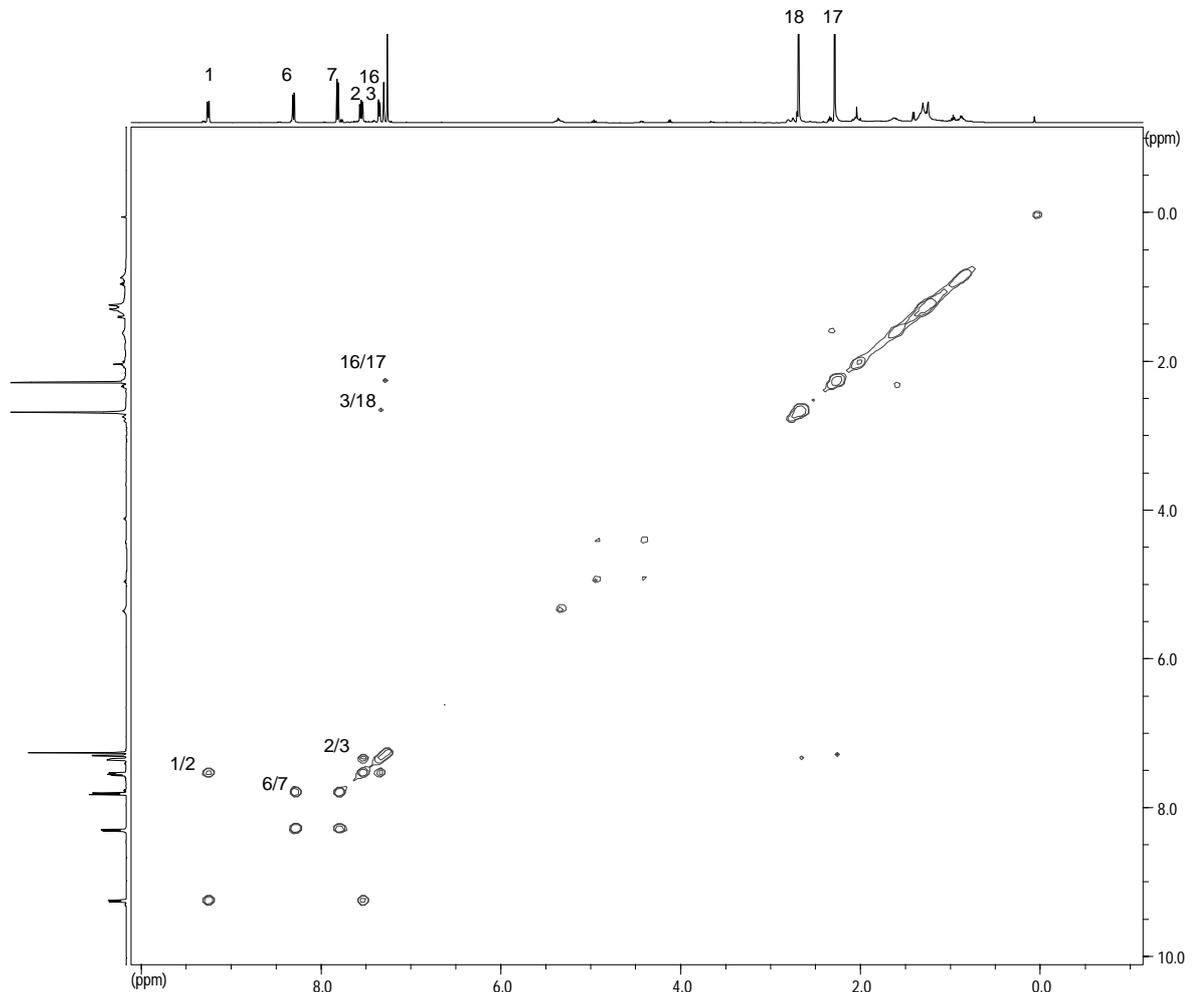
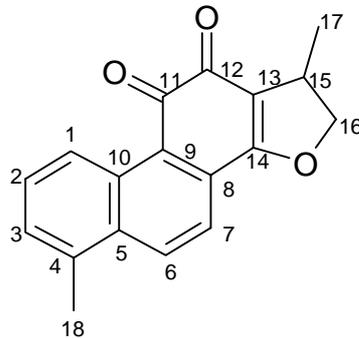


Abbildung 51: ^1H - ^1H COSY Spektrum von Tanshinon I in CDCl_3 (500 MHz)

Neben den Kopplungen zwischen den aromatischen Protonen sind im gezeigten Spektrum auch die jeweiligen Fernkopplungen zwischen den beiden Methylgruppen und H-16 bzw. H-3 zu sehen.

3.3.2.4 Strukturaufklärung von 15,16-Dihydrotanshinon I



Als nächstes interessierte uns die Zusammensetzung der aktiven Fraktion X. Im HPLC-Chromatogramm fiel das charakteristische UV-Spektrum des Hauptpeaks (Abb. 52) auf, dessen Maxima bei 330 und vor allem bei 420 nm wieder auf einen roten Farbstoff hinwiesen. Diese Substanz konnte durch Auftrennung der Fraktion mittels MPLC an RP-18 Material und anschließender präparativer HPLC weiter aufgereinigt werden und wir erhielten ein dunkelrotes Pulver, das laut HPLC-Analyse eine Reinheit von 96,5% aufwies.

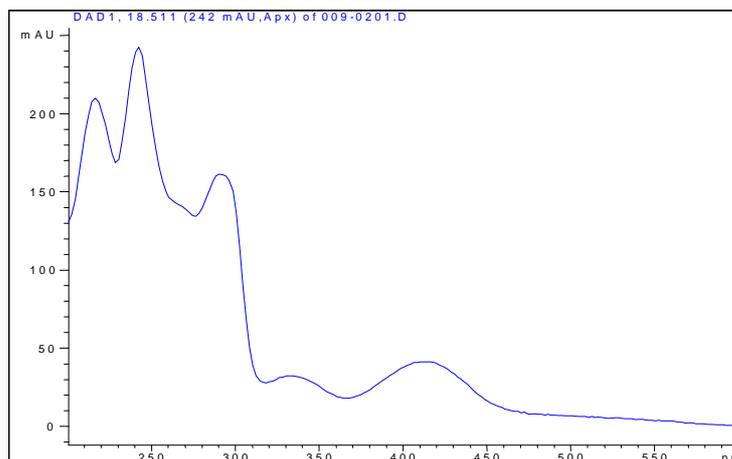
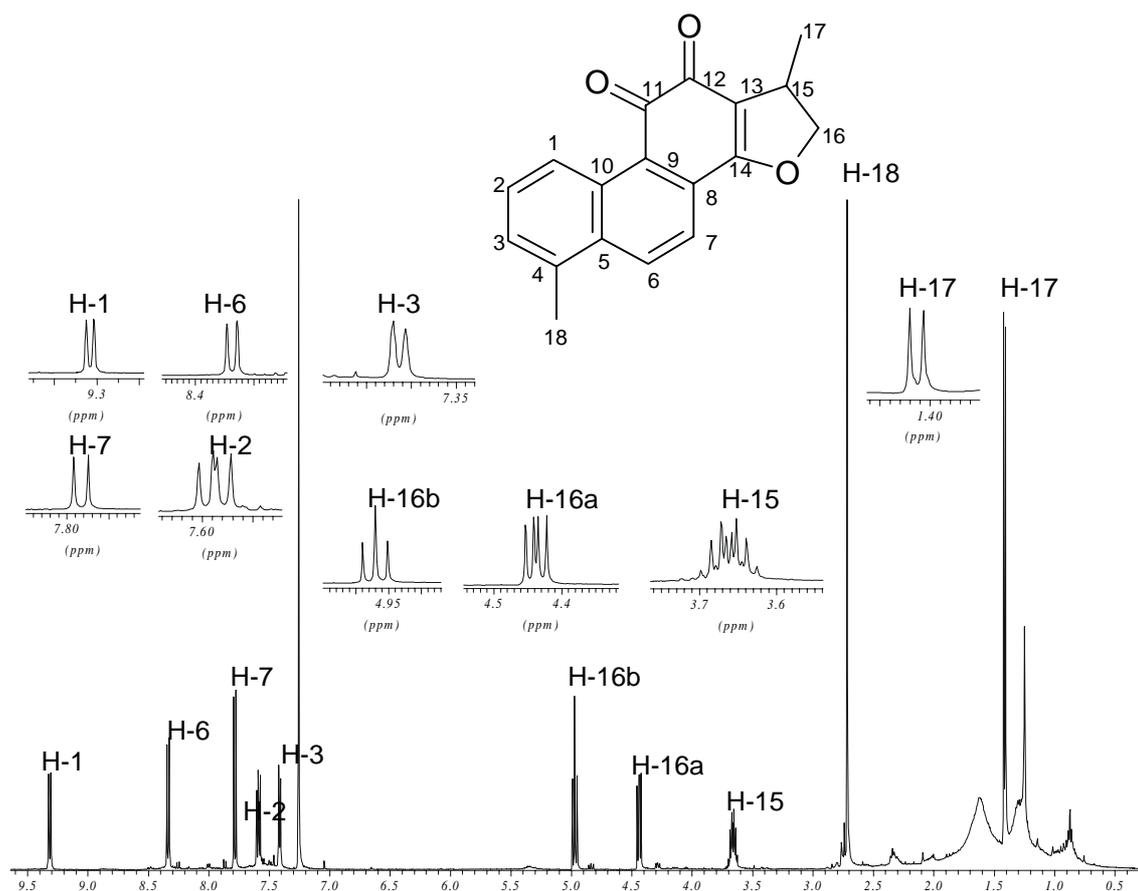


Abbildung 52: Online aufgenommenes UV-Spektrum von Dihydrotanshinon I

Die massenspektrometrische Analyse ergab die Molekülmasse von 278. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigte eine ähnliche Struktur wie das von Tanshinon I. Es unterschied sich allerdings in einigen entscheidenden Punkten. Im aromatischen Bereich sieht man die Resonanz von insgesamt fünf Protonen.

Bei δ 8,33 und 7,76 finden sich jeweils ein Duplett mit der Kopplungskonstante $J = 8,8$ Hz, was darauf hindeutet, dass es sich hier um die Signale der *ortho*-ständigen Wasserstoffatome des B-Rings handelt. Zwei weitere Dupletts erscheinen bei 9,34 und 7,41 ppm. Sie weisen eine Kopplungskonstante von $J = 8,8$ Hz bzw. 6,9 Hz auf. Bei δ 7,58 erkennt man das dazu korrelierende Duplett eines Duplett mit $J = 8,8/6,9$ Hz. Diese Signale legen die Vermutung nahe, dass auch bei dieser Verbindung der A-Ring des Phenanthrengerüsts als Aromat vorliegt. Auch die Signale der beiden Methylgruppen sind in diesem Spektrum zu sehen. Bei 2,7 ppm erkennt man ein Singulett, das die Resonanz von drei Protonen widerspiegelt. Bei 1,41 ppm erscheint das Signal von weiteren drei Wasserstoffen in Form eines Dupletts mit der Kopplungskonstante $J = 6,9$ Hz. Im Gegensatz zum ^1H -NMR Spektrum von Tanshinon I sind in diesem Spektrum allerdings die Resonanzen weiterer aliphatischer Protonen zu sehen. Bei δ 4,97 erscheint die Resonanz eines Protons in Form eines Triplets, bei δ 4,44 das Signal eines weiteren Protons in Form eines Multiplets. Bei 3,66 ppm erkennt man ein Septett mit $J = 6,9$ Hz, das die Resonanz eines Wasserstoffs darstellt. Diese drei olefinischen Protonen legen die Vermutung nahe, dass bei der vorliegenden Struktur an Stelle eines Furanrings ein Dihydrofuran vorliegt. Dies weist auf die Präsenz von 15,16-Dihydrotanshinon I hin, ein Tanshinon, das erstmals 1968 von Kakisawa *et al.* aus *Salvia miltiorrhiza* isoliert worden war. Der Vergleich mit ^1H -NMR Daten aus der Literatur bestätigten diesen Verdacht (Tab.31).


 Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 15, 16-Dihydrotanshinon I

	15,16-Dihydrotanshinon I	
	eigene Daten 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$; M; J (Hz)	Onitsuka <i>et al.</i> , 1983 60 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$; M; J (Hz)
H-1	9,34; d; 8,8	9,30; d; 8,0
H-2	7,57; dd; 8,8; 6,9	7,2-7,8; m
H-3	7,41; d; 6,9	7,2-7,8; m
H-6	8,33; d; 8,8	8,28; d; 8,0
H-7	7,76; d; 8,8	7,2-7,8; m
H-15	3,66; m	3,70; m
H-16a	4,42; dd; 9,4; 6,3	4,37; dd; 9, 5
H-16b	4,97; t; 9,4	5,00; t; 9
H-17	1,41; d; 6,9	2,72; d; 6
H-18	2,7; s	2,72; s;

 Tabelle 31: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten von 15,16-Dihydrotanshinon I im Vergleich mit Literaturwerten

Die Aufnahme eines $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrums bestätigte die Vermutung und legte noch einmal die genaue Zuordnung der aromatischen Signale fest. Man erkennt die Kopplung zwischen den beiden aromatischen Wasserstoffen des B-Rings und die Kopplungen innerhalb des A-Rings. Desweiteren sind die Kopplungen von H-15 am Dihydrofuranring mit den Wasserstoffen der Methylgruppe und dem Proton an Position 16 zu sehen.

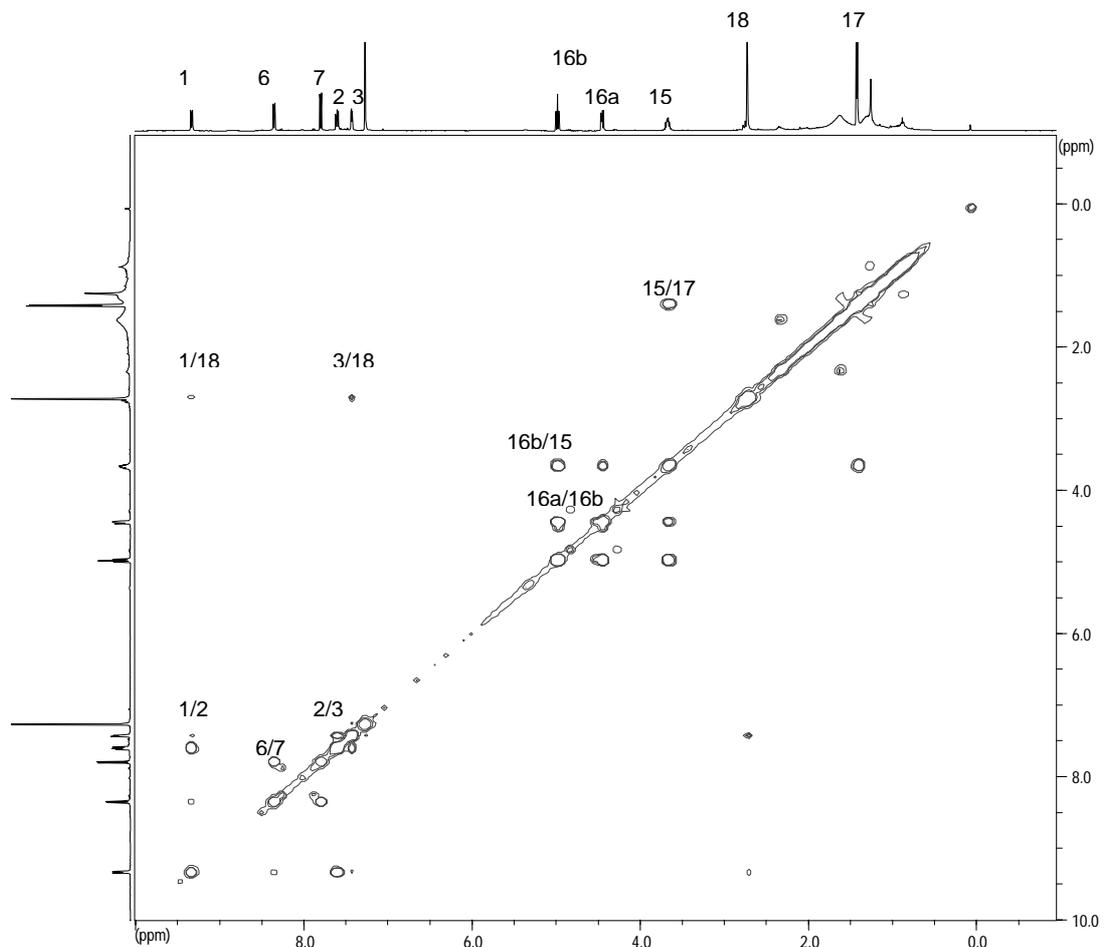
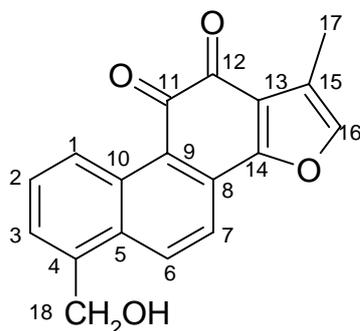


Abbildung 54: $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von 15,16-Dihydrotanshinon I in CDCl_3 (500 MHz)

3.3.2.5 Strukturaufklärung von Tanshinol A



Das HPLC-Chromatogramm von Fraktion XI zeigte neben dem Peak der Hauptsubstanz 15,16-Dihydrotanshinon I einen weiteren Peak, dessen UV Spektrum stark an das von Tanshinon I erinnerte (Abb. 55).

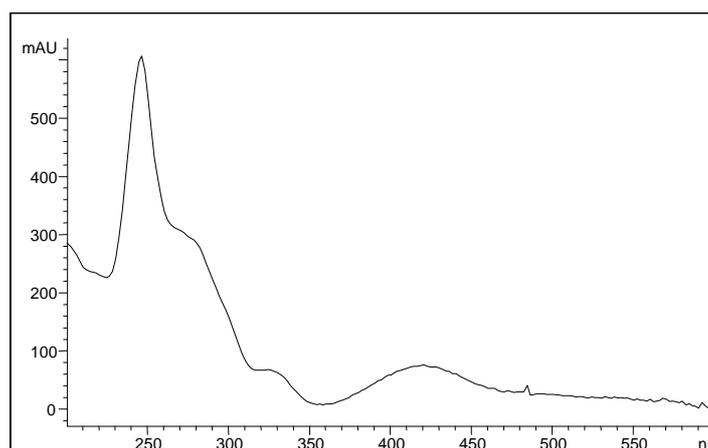


Abbildung 55: UV-Spektrum von Tanshinol A

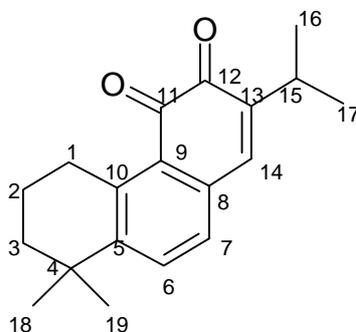
Dieser Peak konnte mittels offener Säulenchromatographie an Kieselgel und anschließender präparativer HPLC an RP-18 Material isoliert werden und wir erhielten dunkelviolette Kristalle. Massenspektrometrische Untersuchungen mittels Direkteinlass zeigten ein Molekulargewicht von 292. Im Gegensatz zu Tanshinon I war die Molekülmasse somit um 16 erhöht, was auf ein zusätzliches Sauerstoffatom, wahrscheinlich in einer Hydroxylgruppe, hindeutete. In dem in DMSO aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigten sich ähnliche Signale wie im Spektrum von Tanshinon I (Tab. 32). Allerdings fehlte in diesem Spektrum das Signal der Methylgruppe von H-18 bei δ 2,66. Statt dessen zeigte sich die Resonanz von zwei Protonen in Form eines Dupletts bei

δ 4,91 und eines weiteren Protons in Form eines Triplets bei δ 5,45 was darauf hindeutete, dass die Methylgruppe an C-4 nun als Hydroxymethylgruppe vorlag. Dies sprach für die Präsenz von Tanshinol A, einer Verbindung die 1997 von Ryu *et al.* zum ersten mal aus *Salvia miltiorrhiza* isoliert wurde. Der Vergleich der erhaltenen Daten mit den Literaturdaten zum $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Tanshinol A bestätigte diesen Verdacht.

Tanshinol A		
	eigene Daten 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$; M; J (Hz)	Ryu <i>et al.</i> , 1997 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$; M; J (Hz)
H-1	9,14; d; 8,5	9,13; d; 8,7
H-2	7,64; dd; 8,7; 6,5	7,62; dd; 8,7; 6,8
H-3	7,56; d; 6,5	7,55; d; 6,8
H-6	8,38; d; 8,6	8,38; d; 8,7
H-7	7,73; d; 8,6	7,72; d; 8,7
H-16	7,72; s	7,71; s
H-17	2,16; s	2,15; s
H-18	4,91; d; 4,4	4,89; d; 4,4
-OH	5,45; t	5,43; t

Tabelle 32: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Tanshinol A mit Werten aus der Literatur

3.3.2.6 Strukturaufklärung von Miltiron



Bei der DC Analyse der gut wirksamen Fraktion V fielen neben dem bereits aus Fraktion VI isolierten Tanshinon IIa zwei weitere im Tageslicht schwach orange

scheinende Flecken auf (R_f 0,5 und 0,45 in FM2). Diese ließen sich nach offener Säulenchromatographie an Kieselgel mit präparativer DC isolieren. Nach Aufreinigung an Sephadex erhielten wir den oberen Fleck in Form einer dunkelroten öligen Flüssigkeit. Die HPLC-Analyse ergab für die Substanz eine Reinheit von 93,3 % und zeigte das in Abbildung 56 aufgeführte online aufgenommene UV-Spektrum.

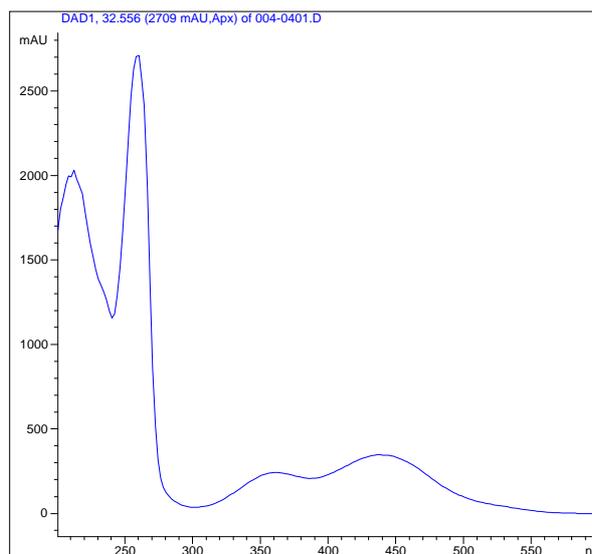


Abbildung 56: UV-Spektrum von Miltiron

Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben für die Substanz ein Molekulargewicht von 282. Die im $^1\text{H-NMR}$ erscheinenden Signale (Abb. 57) erinnerten erneut stark an die Signale der vorhergehenden Spektren. Im Tieffeldbereich sah man die Resonanzen von drei aromatischen Protonen. Zwei davon erschienen als Dupletts (7,58 und 7,09 ppm, $J = 7,8$) und stellten wiederum die Resonanzen der beiden *ortho*-ständigen Wasserstoffatome des B-Rings des Phenanthrengerüsts dar. Desweiteren erschien bei δ 7,06 das Singulett eines weiteren Protons. Im aliphatischen Bereich des Spektrums fielen die Signale von mehreren Methylgruppen auf. Bei δ 1,3 erschien ein Duplett, das die Resonanz von insgesamt sechs Protonen darstellte, was erneut auf die Präsenz zweier chemisch äquivalenter Methylgruppen hinwies. Auch bei δ 1,16 sah man die Resonanz von sechs Wasserstoffatomen, hier aber in Form eines Dupletts mit $J = 6,9$ Hz, einer Kopplungskonstante, die auch im Signal bei

3,01 ppm, einem Septett, wieder zu finden war, was für die Kopplung des Wasserstoffs am C-15 Atom mit den beiden Methylgruppen von C16 und C17 sprach. Weitere Signale im aliphatischen Bereich, hervorgerufen durch jeweils zwei Wasserstoffatome, erschienen bei δ 1,64; 1,79 und 3,17. Diese deuteten auf einen nicht aromatischen A-Ring des Grundgerüsts hin. Das erwähnte Duplett durch die Methylgruppen bei δ 1,16 ppm legte die Vermutung nahe, dass es sich bei der vorliegenden Struktur um ein Derivat ohne den bei den vorhergehenden Substanzen beobachteten Furanring handelte. Hierfür sprach auch das ermittelte Molekulargewicht der Substanz.

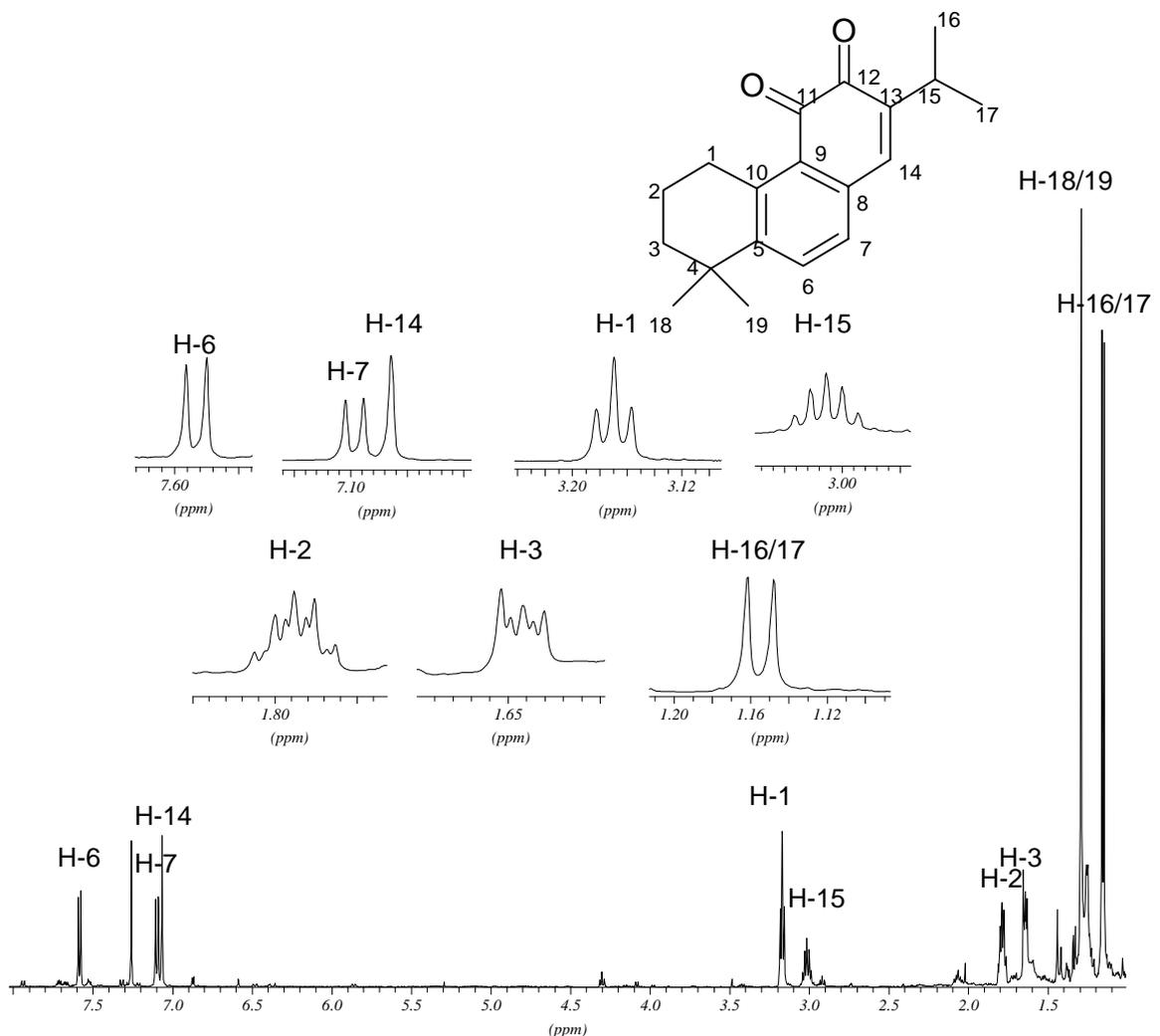


Abbildung 57: ¹H-NMR Spektrum von Miltiron in CDCl₃ (500 MHz)

Dies deutete auf die Präsenz von Miltiron hin, einer Substanz die 1970 von Hayashi *et al.* zum ersten mal aus *Salvia miltiorrhiza* isoliert und beschrieben wurde.

Der Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ Daten aus der Literatur zeigten ebenfalls eine Übereinstimmung (Tab. 33).

Miltiron		
	eigene Daten, 500 MHz; CDCl_3 , δ (ppm); M; J (Hz)	Lee <i>et al.</i> , 1990 400 MHz; CDCl_3 δ (ppm); M; J (Hz)
H-1	3,17; t	3,14; t; 6,6
H-2	1,79; m	1,75; m
H-3	1,64; m	1,61; m
H-6	7,58; d; 7,8	7,56; d; 7,8
H-7	7,09; d; 7,8	7,08; d; 7,8
H-14	7,06; s	7,05; s
H-15	3,01; sep.; 6,9	2,98; sep.; 6,9
H-16	1,16; d; 6,9	1,13; d; 6,9
H-17	1,16; d; 6,9	1,13; d; 6,9
H-18	1,3; s	1,26; s
H-19	1,3; s	1,26s

Tabelle 33: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten von Miltiron im Vergleich mit Literaturwerten

Die vermuteten Kopplungen konnten auch durch die Aufnahme eines $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY Spektrums gezeigt werden (Abb.59).

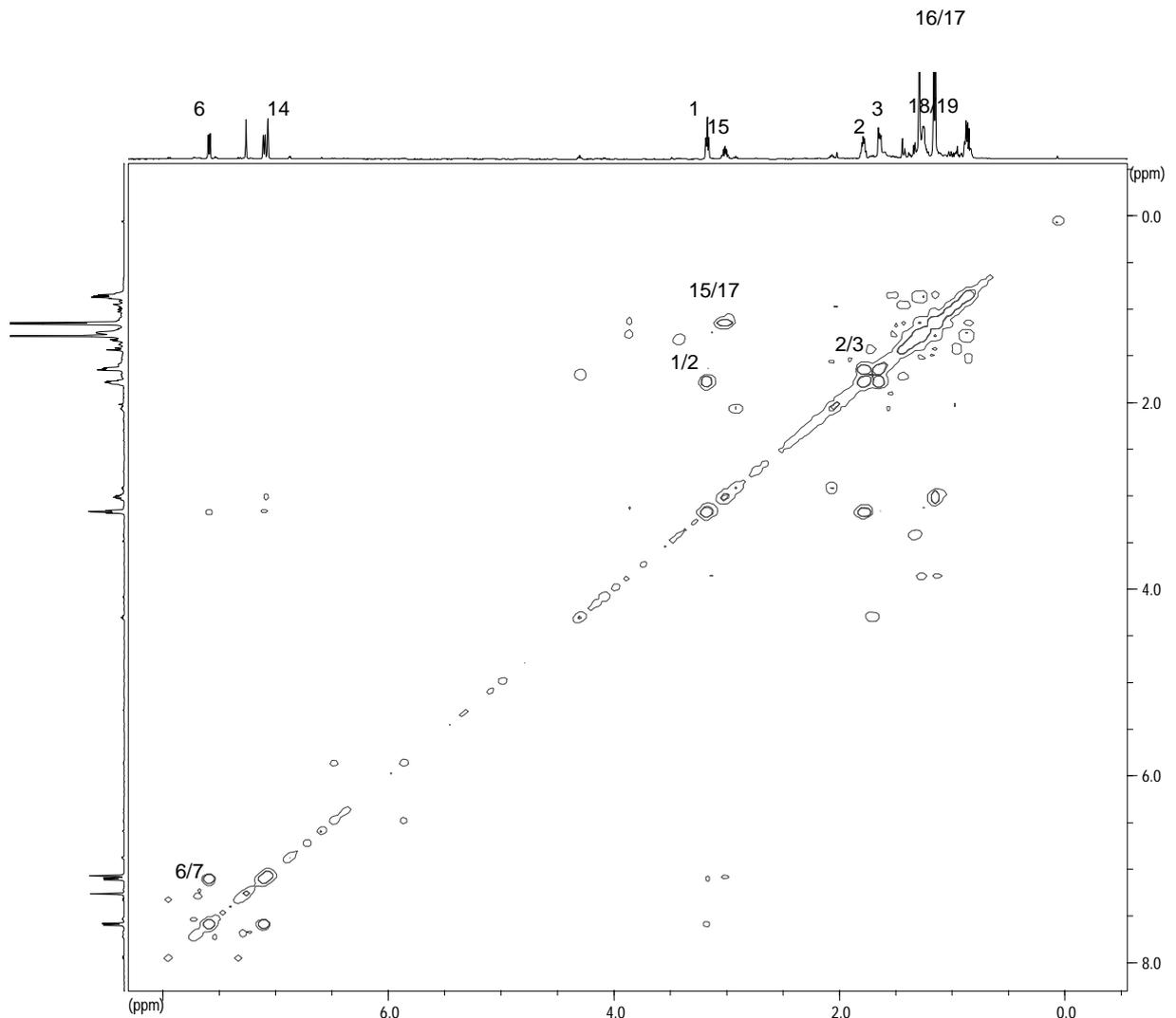


Abbildung 59: $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Miltiron in CDCl_3 (500 MHz)

Auch das ^{13}C -NMR Spektrum bestätigte das Vorliegen von Miltiron. Man erkennt die Resonanzen von insgesamt 19 Kohlenstoffatomen, wobei die Signale bei δ 21,6 und 31,8 ppm jeweils von zwei äquivalenten C-Atomen stammen. Desweiteren erkennt man die bereits erwähnten typischen Resonanzen der beiden CO-Gruppen von C-11 und C-12 bei δ 182,4 und 181,4. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen ^{13}C -NMR-Daten (Lee *et al.* 1990) bestätigte die Annahme, dass es sich bei der isolierten Substanz um Miltiron handelt (Abb. 60, Tab. 34).

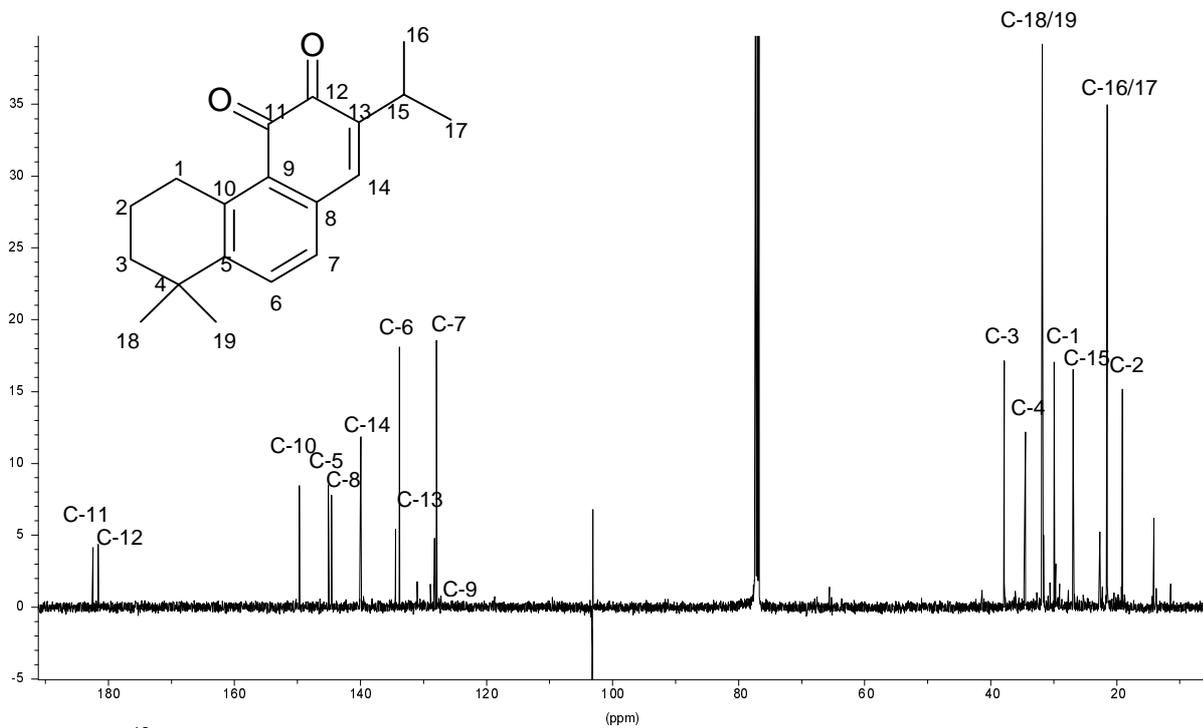


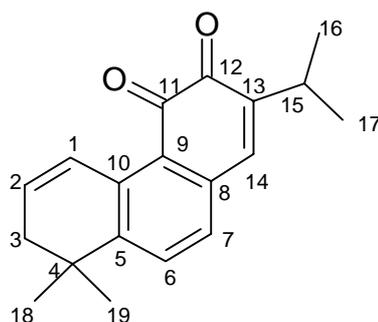
Abbildung 60: ^{13}C -Spektrum von Miltiron in CDCl_3 (125 MHz)

Miltiron		
C-Atom	eigene Daten	Lee <i>et al.</i> , 1990
	125 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$	250 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm})$
1	29,8	29,8
2	19,1	19,1
3	27,8	37,8
4	34,5	34,5
5	145,0	144,9
6	133,8	133,7
7	127,9	127,8
8	144,5	144,4
9	134,4	134,3
10	149,6	149,6

11	182,4	182,4
12	181,5	181,5
13	128,2	128,1
14	140,2	139,9
15	26,8	26,9
16	21,5	21,6
17	21,4	21,6
18	31,7	31,8
19	31,7	31,8

Tabelle 34: Vergleich der ^{13}C -NMR Daten von Miltiron im Vergleich mit Literaturwerten

3.3.2.7 Strukturaufklärung von Dehydromiltiron



Bei der weiteren Aufreinigung von Fraktion V mittels präparativer DC isolierten wir neben Miltiron auch den darunterliegenden rotscheinenden Fleck (R_f 0,45 FM2) und erhielten wiederum ein dunkelrotes Öl, für das die HPLC-Analyse eine Reinheit von 95,6% ergab. Das online aufgenommene UV-Spektrum (Abb.61) erinnerte an das von Miltiron. Das Maximum bei 440 nm ist bathochrom verschoben und erscheint nun bei 460 nm.

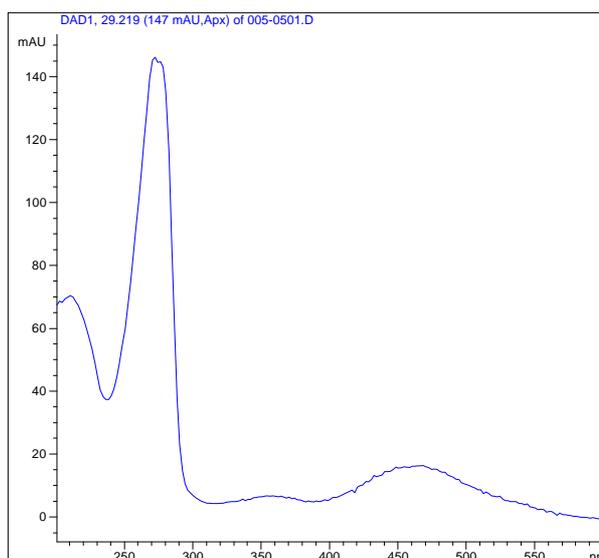


Abbildung 61: UV-Spektrum von Dehydromiltiron

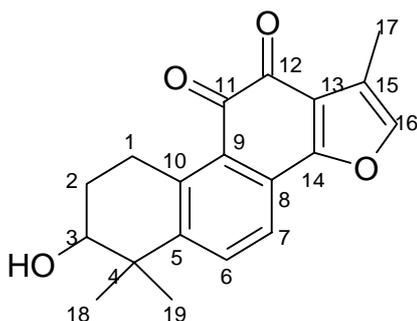
Die im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum erscheinenden Signale unterscheiden sich allerdings in einigen Punkten von den im Spektrum von Miltiron beobachteten Resonanzen. Im aromatischen Bereich sind die Resonanzen von insgesamt fünf Protonen zu sehen. Die bei δ 7,5 und 7,12 auftretenden Dupletts mit der Kopplungskonstante $J = 8,2$ Hz gehören hierbei wiederum zu den beiden Wasserstoffatomen des B-Rings des Phenanthrengrundgerüsts. Ein weiteres Signal erscheint bei δ 7,03 in Form eines Singulets und steht damit wahrscheinlich für das Proton am C-14 Kohlenstoff der Verbindung. Die beiden weiteren sichtbaren Resonanzen, ein Duplett bei δ 7,87 und ein Triplet vom Duplett bei δ 6,3 ppm sind im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Miltiron nicht zu sehen. Im aliphatischen Bereich des Spektrums erscheinen die bekannten Signale von insgesamt vier Methylgruppen bei δ 1,16 und 2,2 ppm und einem Septett bei δ 3,1 mit $J = 7$ Hz, das durch Kopplung des Wasserstoffs an C-15 mit den Wasserstoffen der beiden Methylgruppen zustande kommt. Die beiden auffälligen Signale im Tieffeldbereich und das Fehlen der aliphatischen Signale des A-Rings, die im Spektrum von Miltiron noch zu sehen waren, lassen auf eine zusätzliche Doppelbindung im A-Ring schließen. Einen weiteren Hinweis auf diese Doppelbindung gibt auch die Kopplungskonstante von 10,5 Hz, die sich für die Signale bei δ 7,85 und 6,35 ppm ergibt. Aus *Salvia miltiorrhiza* wurde 1988 von Luo *et al.* eine solche Substanz mit einer zusätzlichen Doppelbindung isoliert, das sogenannte Dehydromiltiron. Der Vergleich der

erhaltenen Werte des ^1H NMR Spektrums mit den in der Literatur angegebenen Werten zeigte eine große Übereinstimmung und bestätigte somit den Verdacht (Tab. 35).

	Dehydromiltiron	
	eigene Daten 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); \text{M}; \text{J} (\text{Hz})$	Chang <i>et al.</i> , 1990 400 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); \text{M}; \text{J} (\text{Hz})$
H-1	7,87; td; 2,3; 10,5	7,86; td; 2; 10
H-2	6,35; td; 4,9; 10,5	6,3; td; 5; 10
H-3	2,28; dd; 2,3; 4,9	2,28; dd; 2; 5
H-6	7,5; d; 8,2	7,49; d; 8
H-7	7,12; d; 8,2	7,11; d; 8
H-14	7,03; d; 1	7,05; d; 1,1
H-15	3,01; sep; 7	3,0; sep; 7
H-16	1,16; d; 7	1,17; d; 7
H-17	1,16; d; 7	1,17; d; 7
H-18	1,28; s	1,28; s
H-19	1,28; s	1,28; s

Tabelle 35: Vergleich der ^1H -NMR Daten von Dehydromiltiron im Vergleich mit Literaturdaten

3.3.2.8 Strukturaufklärung von 3-Hydroxy-Tanshinon IIa



Im HPLC-Chromatogramm der sehr aktiven Fraktion XII befand sich neben dem Signal von 15,16-Dihydrotanshinon ein weiterer auffälliger Peak, der durch sein UV-Spektrum auf sich aufmerksam machte (Abb.62)

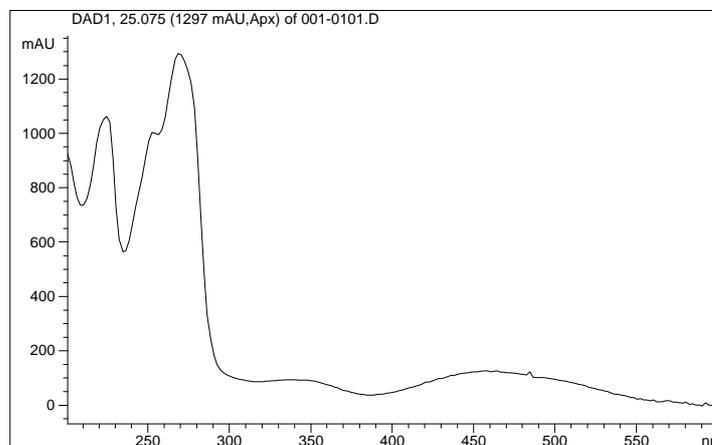


Abbildung 62: UV-Spektrum von 3-OH Tanshinon IIa

Dieses erinnerte sehr stark an das UV-Spektrum von Tanshinon IIa. Die Substanz konnte mit Hilfe von MPLC und anschließender Aufreinigung durch präparative HPLC in einer durch HPLC-Analyse ermittelten Reinheit von 92,2% in Form von dunkelvioletten Nadeln erhalten werden.

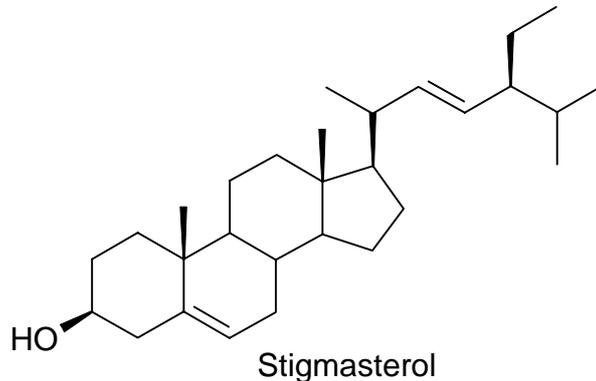
Das Massenspektrum ergab für die isolierte Verbindung ein Molekulargewicht von 310. Im Vergleich zu Tanshinon IIa war die Masse also um 16 erhöht, was auf ein zusätzliches Sauerstoffatom in Form einer OH-Gruppe schließen ließ. Das in CDCl_3 aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt im Tieffeldbereich die gleichen Signale wie Tanshinon IIa. Bei δ 7,58 und 7,70 ppm erscheint jeweils ein Duplett ($J = 8,2$ Hz), das durch die beiden Protonen im B-Ring des Grundgerüsts zustande kommt. Ein weiteres Signal im Tieffeld bei δ 7,25 in Form eines Dupletts ($J = 1,1$ Hz) stellt die Resonanz des Wasserstoffatoms am C-16 Kohlenstoff dar. Das Duplett kommt, wie schon beim Tanshinon IIa, durch die Fernkopplung zwischen H-16 und der Methylgruppe des Furanrings zustande. Im Unterschied zum Tanshinon IIa erscheinen die beiden Methylgruppen von C-18 und C-19 nicht mehr als ein Signal, sondern sind nun in zwei deutlich getrennte Signale aufgespalten (δ 1,33 und 1,35 ppm). Im aliphatischen Bereich erscheinen desweiteren die Resonanzen von zwei Protonen bei δ 1,94 als Multipllett, von weiteren zwei Protonen bei δ 3,31 ebenfalls als Multipllett und die Resonanz eines Wasserstoffs bei δ 3,74 ppm,

die als Duplett vom Duplett erscheint. Diese Beobachtungen sprechen für das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am A-Ring der Verbindung. Da die beiden Methylgruppen von C-18 und C-19 in diesem Spektrum nun als zwei voneinander getrennte Signale erschienen, lag die Vermutung nahe, dass sich bei der vorliegenden Struktur eine Hydroxylgruppe am C-3 befand. Eine entsprechende Verbindung, das 3-Hydroxy-Tanshinon IIa wurde von Luo *et al.* zum ersten mal 1985 aus *Salvia miltiorrhiza* isoliert. Der Vergleich der Daten aus dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum mit denen aus der Literatur bestätigten diesen Verdacht.

3-Hydroxy-Tanshinon IIa		
	eigene Daten 500 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); \text{M}; \text{J} (\text{Hz})$	Luo <i>et al.</i> , 1985 100 MHz; CDCl_3 $\delta(\text{ppm}); \text{M}; \text{J} (\text{Hz})$
H-1	1,94; m	1,94; m
H-2	3,31; m	3,31; m
H-3	3,76; dd; 8; 2,7	3,74; dd; 4,8
H-6	7,70; d; 8,2	7,68; d; 8
H-7	7,58; d; 8,2	7,56; d; 8
H-16	7,25; d; 1,1	7,24; s
H-17	2,26; d; 1,1	2,26; s
H-18	1,33; s	1,33; s
H-19	1,35; s	1,35; s

Tabelle 36: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten von 3-Hydroxy-Tanshinon IIa im Vergleich mit Literaturdaten

3.3.2.9 Isolierung von Phytosterolen



Bei der Isolierung der Inhaltsstoffe aus VLC-Fraktion VI und VII erhielten wir als weiteres Isolierungsprodukt feine weiße Nadeln, die sich nach dünn-schichtchromatographischer Trennung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure Reagenz dunkelviolettfärbten. Diese Substanz war bereits vorher bei der DC-Analyse der Hauptfraktionen als einer der Hauptinhaltsstoffe von Fraktion V-VII aufgefallen. Durch Analyse dieser Verbindung mittels GC-MS und anschließendem Vergleich mit einer Spektrenbibliothek wurde die Substanz als Stigmasterol, ein im Pflanzenreich ubiquitär vorkommendes Phytosterol, identifiziert. Auch Ikeshiro *et al.* beschrieben bereits das Vorkommen von Stigmasterol in *Salvia miltiorrhiza* (1989).

3.3.2.10 Identifizierung von Fettsäuren

Bei der Auftrennung von VLC-Fraktion VII wurden nacheinander auch Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure isoliert. Diese Substanzen wurden mit Hilfe von GC-MS Untersuchungen durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit einer Datenbibliothek identifiziert. Die Anwesenheit dieser Stoffe ist zur Erklärung der pharmakologischen Wirkung des Extraktes nicht unerheblich, da die erwähnten Fettsäuren sich in der Vergangenheit bereits als 5-Lipoxygenasehemmstoffe erwiesen haben (Zschocke, 1998).

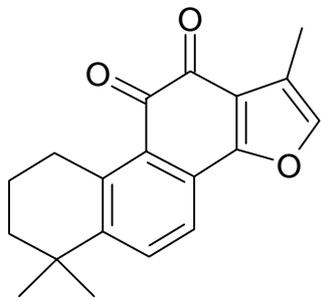
4 Diskussion

Beim pharmakologischen Screening zahlreicher, in der TCM als Antiinflammatorikum verwendeter Drogen war *Salviae miltiorrhizae radix* durch eine besonders gute Hemmwirkung bezüglich der Leukotrienbiosynthese aufgefallen. Für den *n*-Hexanextrakt dieser Droge konnte ein IC₅₀-Wert von 7,6 µg/ml ermittelt werden.

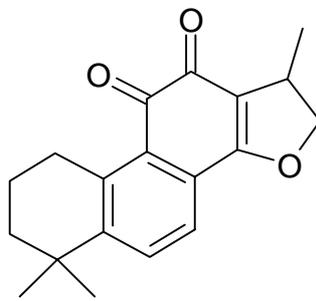
Salviae miltiorrhizae radix wird in der traditionellen chinesischen Medizin bei koronaren Herzkrankheiten, wie Angina pectoris, Schlaflosigkeit und Entzündungen verwendet. Die pharmakologische Wirkung der Droge und ihrer Inhaltsstoffe, insbesondere als Koronartherapeutikum, wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Die Wirksamkeit der Droge als Antiinflammatorikum konnte lediglich in verschiedenen *in vivo* Untersuchungen, unter anderem bei der induzierten Entzündung am Mäuseohr, beobachtet werden (Chen *et al.*, 1979). Daher schien uns eine nähere Prüfung von *Danshen* bezüglich seiner antiinflammatorischen Eigenschaften als interessant, da insbesondere keine Untersuchungen zur Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese durch *Salvia miltiorrhiza* existierten.

Alle durch wirkungsorientierte Fraktionierung isolierten aktiven Inhaltsstoffe gehörten zu der Gruppe der Tanshinone, Diterpene des Abietanstyps, die bereits mehrfach als typische Inhaltsstoffe von *Salvia miltiorrhiza* beschrieben worden waren (Tab. 37). Die ermittelten IC₅₀-Werte der einzelnen Stoffe unterschieden sich nicht wesentlich und lagen zwischen 15 und 30 µM (Tab.38). Entscheidend für die Wirkung der Substanzen scheint die *ortho*-Chinonstruktur zu sein. Chinone sind bereits in der Vergangenheit als wirksame Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese beschrieben worden (Ford Hutchinson, 1994, Müller, 1995, Resch, 1998). Sie gehören zur Klasse der Redoxinhibitoren, wobei sie erst in die wirksame Hydrochinonform umgewandelt werden müssen. Diese Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase reduzieren das Fe³⁺-Ion im Zentrum des Enzyms zur inaktiven Fe²⁺-Form. Eine Wirkung der isolierten Substanzen auf Grund von antioxidativen Eigenschaften war daher denkbar. Wir untersuchten daraufhin die beiden Hauptinhaltsstoffe Tanshinon IIa und Cryptotanshinon in einem Chemilumineszenztest. Die Substanzen zeigten jedoch keine antioxidative Aktivität. Allerdings wurde das

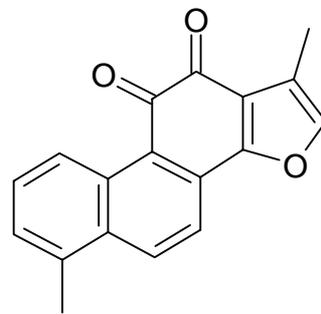
antioxidative Potential von *Salvia miltiorrhiza* in zahlreichen Untersuchungen beschrieben (Xi *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1999).



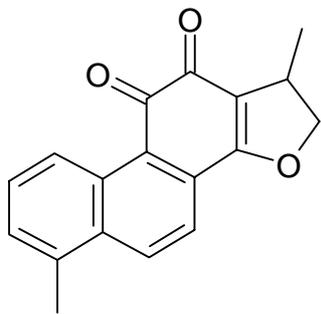
Tanshinon IIa



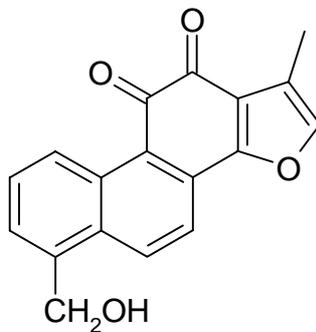
Cryptotanshinon



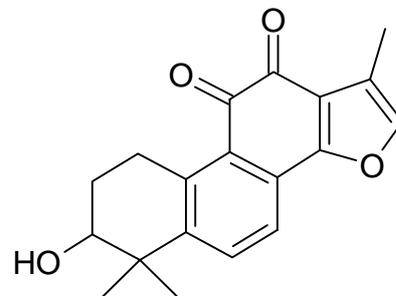
Tanshinon I



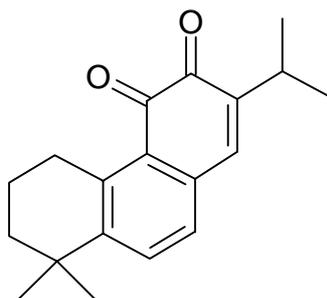
15,16-
Dihydrotanshinon



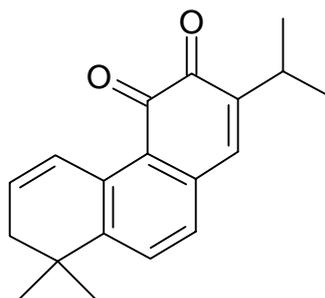
Tanshinol A



3-OH Tanshinon IIa



Miltiron



Dehydromiltiron

Tabelle 37: Strukturformeln der isolierten aktiven Verbindungen aus *Salvia miltiorrhiza*

Auffällig ist hierbei jedoch, dass hauptsächlich der wässrige Extrakt der Droge und polare Inhaltsstoffe untersucht wurden und Radikalfängereigenschaften aufwiesen. Die Untersuchung von Tanshinon IIa in verschiedenen Test-

systemen konnte nur in einem Fall antioxidative Eigenschaften dieser Verbindung nachweisen (Zhao *et al.*, 1997). Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurde auch der polare Methanolextrakt auf seinen Einfluss auf die Leukotrienbiosynthese hin untersucht, es konnten aber keine besonderen Hemmeigenschaften nachgewiesen werden (23% Hemmung bei 10 µg/ml).

Für die Hemmung der Leukotrienbiosynthese durch Tanshinon IIa und Cryptotanshinon ist also durchaus ein anderer Wirkmechanismus denkbar. Um eine abschließende Beurteilung des Zusammenhangs zwischen Beeinflussung des Leukotrienstoffwechsels und Radikalfängereigenschaften zu geben, müssten der *n*-Hexanextrakt und weitere lipophile Inhaltsstoffe in entsprechenden Testsystemen untersucht werden.

Verbindung	IC ₅₀ Wert [µM]	IC ₅₀ Wert [µg/ml]
Tanshinon IIa	17	4,8
Tanshinon I	12	3,3
15,16 Dihydrötanshinon I	25	6
Cryptotanshinon	22	7,1
Miltiron	30	8,5
Dehydromiltiron	27	7,6
3-OH Tanshinon IIa	15	5,6
Tanshinol A	18	5,3

Tabelle 38: Vergleich der IC₅₀-Werte der aktivsten Verbindungen

Quantitative Bestimmungen der Hauptinhaltsstoffe zeigten, dass diese im Durchschnitt ca. 45% des Gesamtextraktes ausmachen (Abb. 63). Am Beispiel von Drogenmuster SM12, für das ein IC₅₀ Wert von 7,7 µg/ml berechnet werden konnte, ließ sich zeigen, dass die ermittelte Hemmstärke des Gesamtextraktes bereits zum großen Teil mit der Wirkung der vier Hauptsubstanzen zu erklären ist. Bei einem Anteil von Tanshinon IIa am Extrakt von 23% würde bereits die Hemmstärke dieser Substanz einen theoretischen IC₅₀ von 20,8 µg/ml für den Gesamtextrakt ergeben, ginge man davon aus, dass darüber hinaus keine wirksamen Substanzen anwesend wären. In einem Stoffgemisch, in dem nur die vier Hauptinhaltsstoffe zu gleichen Anteilen wie im Extrakt enthalten wären

und in dem synergistische Effekte keine Rolle spielten, könnte man einen theoretischen IC_{50} -Wert von 5,1 $\mu\text{g/ml}$ erwarten. Bezogen auf den Gesamtextrakt ergäbe sich somit ein theoretischer IC_{50} von 11,3 $\mu\text{g/ml}$. Die Wirkung des Gesamtextraktes, der einen IC_{50} von 7,7 $\mu\text{g/ml}$ aufwies, lässt sich somit allein mit den inhibitorischen Eigenschaften der vier Inhaltsstoffe zu ca. 70% erklären. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Hemmeigenschaften von *Salvia miltiorrhiza* auf die Leukotrienbiosynthese weitgehend auf die für die Droge charakteristischen Tanshinone zurückzuführen ist. Das chinesische Arzneibuch schreibt für die Qualitätsprüfung von *Danshen* allerdings lediglich einen Mindestgehalt an Tanshinon IIa von 0,2% vor.

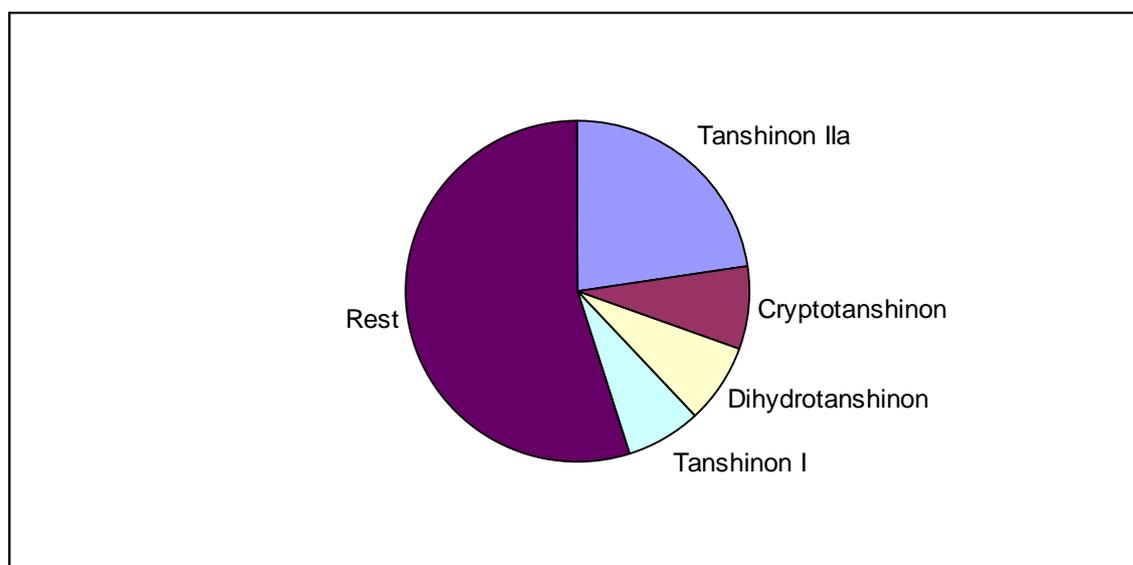


Abbildung 63: Anteil der vier Hauptsubstanzen am *n*-Hexan-Extrakt

Für eine Reihe von *Salvia miltiorrhiza* Drogenmustern wurde der ermittelte Gehalt von Tanshinon IIa mit der erzielten Hemmstärke im 5-LOX-Assay verglichen. Für den Zusammenhang zwischen Tanshinon IIa-Gehalt und Wirkstärke wurde lediglich ein Korrelationsfaktor von 0,41 ermittelt, was statistisch gesehen für einen merklichen Zusammenhang der Parameter spricht (Puhani, 2001). Dass dieser Bezug nicht deutlicher ausfällt, hängt sicher mit dem Einfluss der anderen Inhaltsstoffe zusammen. Für eine vollständige Beurteilung der Qualität von *Salviae miltiorrhizae radix* sollte daher auch der Gehalt der anderen Hauptkomponenten hinzugezogen werden.

In einem von Reiningger (2001) vorgenommenen Screening verschiedener chinesischer Arzneidroge hinsichtlich einer Beeinflussung der Prostaglandin-synthese zeigte der *n*-Hexanextrakt von *Salvia miltiorrhiza* bei einer Testkonzentration von 50 µg/ml eine deutliche Hemmung von 72,7% auf die PGHS1 und 74,7% auf die PGHS2. Wir untersuchten daher die Wirkung der isolierten Verbindungen auch auf diese Enzyme. Hierbei zeigten bei einer Testkonzentration von 50 µM Tanshinon IIa und Cryptotanshinon die größte Aktivität (Tab.39). Im Gegensatz zur Wirkung der Verbindungen auf die Leukotrienbiosynthese, zeigten diese im PGHS1/2-Assay unterschiedliche Wirkstärken (Tab. 38). Tanshinon IIa zeigte für die PGHS1 einen IC₅₀ von 25,7 µM, für PGHS2 von 27,4 µM. Cryptotanshinon zeigte sich als etwas potenter mit einem IC₅₀ von 17,3 µM gegenüber der PGHS1 und 10,2 gegenüber der PGHS2.

	PGHS1 Hemmung [%]	PGHS2 Hemmung [%]
Tanshinon IIa	85,2	69,7
Tanshinon I	65,6	5,3
Cryptotanshinon	90,1	81,9
Dihydrotanshinon	20,1	2,3
Miltiron	46,2	52,6

Tabelle 39: Hemmung der PGHS1/2 durch Verbindungen aus *Salvia miltiorrhiza* bei einer Konzentration von 50 µM

Diese beiden Inhaltsstoffe stellen somit potente duale Hemmstoffe der Leukotrien- und Prostaglandinbiosynthese dar.

Die Anwendung der Droge in der traditionellen chinesischen Medizin bei entzündlichen Erkrankungen ist auf Grund der vorgestellten Ergebnisse durchaus gerechtfertigt. Auch in einer traditionellen Zubereitung in Form eines wässrigen Auszugs konnten die Wirkstoffe noch nachgewiesen werden.

Die 5-LOX-Hemmwirkung von Cryptotanshinon und Tanshinon IIa konnte nicht mit antioxidativen Eigenschaften erklärt werden. Da Antioxidantien relativ unspezifisch wirken und daher nicht selten starke Nebenwirkungen bedingen,

stellen zumindest diese beiden Stoffe vielversprechende Verbindungen bei der Suche nach neuen Leitstrukturen von Leukotrienbiosynthese-Inhibitoren dar.

F Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 5-Lipoxygenase Screening-Assay im Mikrotitermaßstab entwickelt, mit dem es möglich war, in kurzer Zeit für eine hohe Anzahl von Proben die Wirkung von pflanzlichen Extrakten und Reinsubstanzen hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese zu untersuchen. Auf der Grundlage eines bereits existierenden Testsystems konnte beim weiterentwickelten Assay der Testansatz verkleinert und auf Mikrotitermaßstab gebracht werden. Als Enzymquelle dienten aus Schweineblut isolierte Leukozyten. Substratkonzentration, Zellkonzentration und Reaktionszeit wurden den optimalen Umsetzungsbedingungen im Assay angepasst. Durch eine entsprechende Belegung der Mikrotiterplatte und ein einheitliches Pipettierschema konnte eine Automatisierung von Versuchsdurchführung und Auswertung ermöglicht werden. Die Detektion des gebildeten LTB₄ wurde von der Messung radioaktiv markierter Arachidonsäuremetaboliten mittels HPLC auf einen LTB₄ Enzymimmunoassay (EIA) umgestellt. Dadurch wurde ein Arbeiten ohne Radioaktivität ermöglicht. Durch die nun vereinfachte Testdurchführung und Probenaufbereitung konnte die maximale Probenzahl pro Versuchsdurchführung von 24 auf 66 erhöht werden. Gleichzeitig wurde die Arbeitszeit für einen Assay von 8 h auf 2,5 h verringert.

Für die als Positivkontrolle eingesetzte Nordihydroguaiarsäure, ein bekannter *in vitro* Hemmstoff der Leukotrienbiosynthese, wurde im vorgestellten Testsystem ein IC₅₀ Wert von 0,52 µM ermittelt, was mit dem IC₅₀ Wert im ursprünglichen Assay (0,5 µM) vergleichbar ist.

Mit dem neu entwickelten Assay wurden 52 Drogen, die in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) bei entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Leukotrienbiosynthese untersucht. Von den untersuchten Drogen wurden sukzessiv *n*-Hexan-, Dichlormethan-, und Methanolextrakte hergestellt und getestet. Dabei zeigten vor allem die lipophilen Extrakte gute Hemmeigenschaften, die hydrophilen Methanolextrakte waren dagegen wenig aktiv. Bei einer sehr niedrig gewählten Screeningkonzentration von 5 bzw. 10 µg/ml wurden nur sehr potente

Pflanzenextrakte erfaßt. Für zehn *n*-Hexan- und sieben Dichlormethanextrakte konnten IC₅₀ Werte von unter 10 µg / ml ermittelt werden. Dabei waren bei manchen Pflanzen sowohl der *n*-Hexan-Extrakt als auch der sukzessiv hergestellte Dichlormethan-Extrakt sehr aktiv. Von den 52 untersuchten Drogen zeigten dreizehn Pflanzen eine sehr hohe Hemmwirkung. Von diesen Drogen wurden zunächst *Platycodi radix* und *Salviae miltiorrhizae radix* einer Fraktionierung unterzogen.

Salviae miltiorrhizae radix (*Salvia miltiorrhiza* BUNGE, Lamiaceae), das in der traditionellen chinesischen Medizin bei koronaren Herzkrankheiten, Entzündungen und Schlaflosigkeit angewendet wird, wurde schließlich für intensivere Untersuchungen ausgewählt.

Im vorausgegangenen Screening konnte für den *n*-Hexanextrakt ein IC₅₀-Wert von 7,6 µg/ml, für den sukzessiv hergestellten Dichlormethanextrakt ein IC₅₀-Wert von 9,4 µg/ml ermittelt werden.

Die wirkungsorientierte Isolierung von Inhaltsstoffen aus dem *n*-Hexanextrakt führt zur Identifizierung der für *Salvia miltiorrhiza* typischen Tanshinone, Diterpenen vom Abietantyp, die durch eine *ortho*-Chinonstruktur charakterisiert sind. Die isolierten Verbindungen zeigten durchweg sehr gute Hemmeigenschaften. Der Hauptinhaltsstoff Tanshinon IIa hemmte die Leukotrienbiosynthese mit einem IC₅₀-Wert von 17 µM, und auch die weiteren Hauptinhaltsstoffe Tanshinon I (IC₅₀=2 µM), Cryptotanshinon (IC₅₀=2 µM), und 15,16-Dihydrotanshinon I (IC₅₀=5 µM) zeigten eine sehr gute Hemmwirkung. Als ebenfalls gut wirksame Nebenkomponenten wurden Miltiron (IC₅₀=30 µM), Dehydromiltiron (IC₅₀=7 µM), Tanshinol A (IC₅₀=8 µM) und 3-Hydroxy-Tanshinon IIa (IC₅₀=15µM) isoliert. Die Quantifizierung der vier Hauptinhaltsstoffe in neun verschiedenen Drogenmustern ergab, dass Tanshinon IIa, Tanshinon I, Cryptotanshinon und 15,16- Dihydrotanshinon zusammen im Durchschnitt ca. 45 % des Gesamtextraktes ausmachten. Die Wirkstärke des Gesamtextraktes konnte daher nahezu vollständig auf die isolierten Tanshinone zurückgeführt werden. Zur Wirkung von Tanshinonen auf die Leukotrienbiosynthese lagen bisher noch keine Untersuchungen vor. Die Chinonstruktur deutete auf eine Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese auf

Grund antioxidativer Eigenschaften hin. Tanshinon IIa und Cryptotanshinon zeigten in einem Chemilumineszenztest jedoch keine entsprechende Aktivität. Es muss daher ein anderer Wirkmechanismus vermutet werden.

Die isolierten Verbindungen wurden in einem PGHS1/2-Assay auch hinsichtlich einer Beeinflussung der Prostaglandinsynthese untersucht. Hierbei zeigten lediglich Tanshinon IIa und Cryptotanshinon sehr gute Hemmeigenschaften. Tanshinon IIa hemmte die PGHS1 mit einem IC_{50} Wert von 25,7 μ M, die PGHS2 mit einem IC_{50} Wert von 27,4 μ M. Cryptotanshinon war mit einem IC_{50} Wert von 17,3 μ M (PGHS1) und 10,2 μ M (PGHS2) noch potenter.

Die untersuchten Tanshinone erwiesen sich sowohl im 5-LOX- als auch im PGHS1/2-Assay als sehr aktive Substanzen und sind damit für die Wirkung des Gesamtextraktes von *Salvia miltiorrhiza* auf die Leukotrien- und die Prostaglandinsynthese verantwortlich. Desweiteren stellen sie interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe dar.

G Experimenteller Teil

1 Herkunft des Drogenmaterials und der Referenzsubstanzen

1.1 Drogenmaterial zum pharmakologischen Screening

Die Drogenmuster, die zur Durchführung des pharmakologischen Screenings verwendet wurden, sind von der TCM Klinik in Kötzing zur Verfügung gestellt worden (Lieferung August 1997). Ihre Identität wurde mit Hilfe des chinesischen Arzneibuchs, Drogenatlanten, durch DC- und HPLC Analysen überprüft und bestätigt. Rückstellmuster befinden sich am Institut für Pharmakognosie der Karl-Franzens-Universität in Graz.

1.2 Drogenmaterial zur Untersuchung von *Salvia miltiorrhiza*

Zur Isolierung

Die getrockneten Wurzeln von *Salvia miltiorrhiza* (Bunge) wurden ebenfalls von der TCM Klinik in Kötzing zur Verfügung gestellt. Die Identität wurde, wie oben beschrieben, festgestellt und bestätigt.

Qualitative und quantitative Untersuchungen

Eine Übersicht über die Herkunft der verschiedenen Drogenmuster gibt Tabelle 40

Bezeichnung	Herkunft
SM 1	TCM Klinik Kötzing Ch.B. 07.01.94
SM 2	Fa. Sino Res Ch. B. III/97
SM 3	Fa. Uchida Japan
SM 4	TCM Klinik Kötzing Ch.B. 26.01.95N
SM 5	TCM Klinik Kötzing Ch.B. 24.09.96
SM 6	Fa. China Medica, Bayr. Zell, Ch.B.106
SM 7	Fa. Herbasin, Ch.B., 961210
SM 8	Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP); Sm1, 1999

SM 9	LBP	Sm2, 1998
SM 10	"	LBP1, 2001
SM 11	"	LBP2, 2001
SM 12	"	LBP3, 2001
SM 13	"	LBP4, 2001
SM 14	"	LBP5, 2001
SM 15	"	LBP6, 2001
SM 16	"	LBP7, 2001
SM 17	"	LBP8, 2001

Tabelle 40: Übersicht über die qualitativ und quantitativ untersuchten Drogenmuster

2 Verwendete Reagenzien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acetonitril für die HPLC	Fa. J.T. Baker
Adrenalin-D-hydrogentartrat	Fa. Fluka BioChemika
Ammoniumchlorid p.a.	Fa. Jansen
Aqua ad injectabilia	Apotheke der Universitätskliniken, Düsseldorf
¹⁴ C-Arachidonsäure	Fa. Amersham
Arachidonsäure („kalt“)	Fa. Chayman
Calcium Ionophor (Ionophor A 23187)	Fa. Boehringer-Mannheim
Calciumchlorid Dihydrat	Fa. Janssen-Cilag
Choroform-d 99,8 atom%D	Fa. Merck
D(+)-Glucose wasserfrei	Fa. Merck
Dextran T500	Fa. Pharmacia Biotech
Dichlormethan	technisch, 1x destilliert
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Fa. Grüssing Diagnostica
Eicosatetrainsäure	Fa. Sigma
Ethanol	technisch, 1x destilliert
Ethanol p.a.	Fa. J.T. Baker
Ethylacetat	technisch, 1x destilliert

Ethylacetat p.a.	Fa. J.T. Baker
Heparin	Fa. Novo Nordisc
Indomethacin	Fa. Sigma
Kaliumchlorid	Fa. Merck
Kaliumhydrogenphosphat p.a.	Fa. Grüssing Diagnostica
Kieselgel 60, Korngröße 0,040-0,063mm, 230-400 mesh ASTM	Fa. Merck
Anisaldehyd	Fa. Sigma
Vanillin	Fa. Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fa. Merck
Methanol	technisch, 1x destilliert
<i>n</i> -Hexan	technisch, 1x destilliert
<i>n</i> -Hexan p.a.	Fa. J.T. Baker
Na ₂ SO ₄ p.a.	Fa. Aldrich
NaOH	Fa. Merck
Natriumchlorid p.a.	Fa. Merck
1N-Natronlauge	Bernd Kraft GmbH
Nordihydroguaiaretsäure (NDGA)	Fa. Sigma
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	Fa. Fluka
1N-Salzsäure	Bernd Kraft GmbH
Sephadex LH-20, 35 mesh	Fa. Pharmacia
Trinatriumcitrat Dihydrat	Fa. Merck
Tryptanblau	Fa. Merck
Türks Lösung	Fa. Merck
Pufferlösung pH 5	Bernd Kraft GmbH
Pufferlösung pH 7	Bernd Kraft GmbH
TRIS Ultrapure	Fa. USB

Tabelle 41: Übersicht über die benötigten Reagenzien

3 Pharmakologische Untersuchungen

3.1 5-Lipoxygenase-Test (5-LOX-Test)

3.1.1 Gewinnung der Leukozyten aus Schweineblut

Die Isolierung der weißen Blutkörperchen wurde nach abgewandelter Methode von Wagner und Fessler (1986) durchgeführt.

3.1.2 Benötigte Pufferlösungen:

Lösung 1: Dichtesedimentation:

NaCl 0,95 g, Dextran T-500 6,0 g, H₂O ad 100 ml

Lösung 2: Waschlösung:

D-Glucose 0,1 g, CaCl₂*2 H₂O 0,74 g, MgCl₂*6 H₂O 0,02 g, KCl 0,04 g,

Tris 1,75 g, H₂O ad 100 ml, mit 1N-HCl eingestellt auf pH 7-6

Lösung 3: Lösung zum Lysieren der Leukozyten:

NH₄Cl 0,17 g, Tris 0,2 g, H₂O ad 100 ml, mit 1N-HCl eingestellt auf pH 7,2

Lösung 4: Pufferlösung für den Testansatz:

Tris 1,75 g, NaCl 0,9 g, H₂O ad 300 ml, mit 1N-HCl eingestellt auf pH 7,4

Lösung 5: Citratlösung zur Stabilisierung des Schweinebluts:

NaCl 1,8 g, Na-Citrat 8,0 g, Liquemin[®] 20 µl, H₂O ad 200 ml

Lösung 6: Aufbewahrungslösung:

NaCl 2,0 g, KCl 0,05 g, Na₂HPO₄ 0,287 g, Glucose 0,25 g, H₂O ad 200 g, mit 1N-HCl eingestellt auf pH 7,4, mit H₂O auffüllen auf 250g

Für die Leukozytenisolierung wurde entweder am Testtag oder am Tag vor dem Test vom Schlachthof frisches Schweineblut geholt. Dabei wurden 70 ml Lösung 5 vorgelegt und mit frisch entnommenem Schweineblut auf 500 ml aufgefüllt. Es wurden immer 2 x 500 ml Schweineblut geholt, wobei darauf zu achten war, dass Blut unterschiedlicher Tiere nicht miteinander gemischt wurde.

In einem 500 ml Glasmesszylinder wurden 100 ml Lösung 1 vorgelegt, das Gemisch aus Lösung 5 und Schweineblut langsam dazu gegossen und eine Stunde zur Sedimentation stehengelassen. Danach wurde der Überstand auf sechs 50 ml Falconröhrchen verteilt und diese 10 min bei 1400 RPM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt und verworfen, der Rückstand in 4 Falconröhrchen vereinigt und mit je 10 ml Lösung 2 zum Waschen der Leukozyten resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde der Rückstand in jeweils 10 ml Lösung 3 suspendiert und mit vorsichtigem Schütteln der Röhrchen 5 min lysiert. Die Falconröhrchen wurden dann 5 min bei 1400 RPM zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt und verworfen. Der Rückstand wurde noch einmal in 20 ml Lösung 2 aufgenommen und unter 15 min zentrifugieren bei 1200 RPM gewaschen. Die isolierten Leukozyten wurden für die sofortige Verwendung im Test in 40 ml Lösung 4 suspendiert oder zur Aufbewahrung im Kühlschrank in 100 ml Lösung 6 gelöst. Auf diese Art konnten mit den Leukozyten bis zu 24 h nach der Isolierung 5-LOX-Tests durchgeführt werden.

3.1.3 Vitalitätsprüfung:

Um die Vitalität der isolierten Zellen zu überprüfen wurden 10 µl Trypanblaulösung und 50 µl Zellsuspension auf einem Objektträger gemischt und unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet. Bei abgestorbenen Zellen kann der Farbstoff durch die nicht mehr intakte Zellwand einströmen, das Innere der Zelle wird blau. Noch lebende Zellen nehmen dagegen den Farbstoff nicht auf und erscheinen weiterhin als weiße Zellen. Die Vitalität der Zellen lag meist zwischen 95 und 99%. Bei einer Vitalität unter 90% konnte die Zellsuspension nicht verwendet werden.

3.1.4 Zellzahl:

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer ermittelt und mit Lösung 4 auf 25000 Zellen/µl eingestellt. Dabei wurden 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Türkslösung gemischt und davon 10 µl in eine Neugebauerkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden bei 400-facher Vergrößerung 2 x 4 Quadrate der Kammer ausgezählt. Die Abweichung auf beiden Seiten durfte dabei nicht mehr als 10 % betragen.

Bei der nach Fessler/Zschocke durchgeführten Methode lag die benötigte Zellkonzentration bei 15000 Zellen / μ l.

3.2 Durchführung des 5-LOX Assay nach Zschocke (1998)

3.2.1 Probenvorbereitung:

Die Proben wurden mittels Ethanol p.a. auf die benötigte Konzentration verdünnt.

Gesamtvolumen im Testansatz: 2,6 ml

Pipettiervolumen der Proben: 50 μ l

Berechnung der Konzentration im Testansatz für Proben mit unbekanntem Molekulargewicht und Pflanzenextrakten in μ g/ml:

$$2,63 \text{ mg Probe/ml Ethanol} = 50 \text{ } \mu\text{g Probe/ml Testansatz}$$

Berechnung der Konzentration im Testansatz für Proben mit bekanntem Molekulargewicht: Für 1 μ M/l Endkonzentration im Testansatz gilt:

$$\text{MG der Probe} * 0,0526 = \mu\text{g Probe / ml Ethanol}$$

3.2.2 Inkubation:

Die Inkubation erfolgte in 10-ml-Zentrifugenschliffgläsern aus Glas (zwei Reihen mit je zwölf Gläsern) Der Inkubationsansatz enthielt 2,5 ml Leukozyten-suspension der Konzentration 15.000 Zellen/ μ l, 17,6 μ M Ionophor A 23187, 2 mM CaCl_2 , 10 μ M Eicosatetraensäure, 50 μ l Probenlösung bzw. 50 μ l Ethanol p.a. als Negativkontrollen und 10 μ l einer 9 μ M ^{14}C Arachidonsäurelösung (0,1 μ Ci/ml abs.) Der Ansatz wurde 8 min im Schüttelwasserbad bei 37°C und 185 RPM inkubiert. Anschließend wurde mit 10 μ l 25%iger NaOH und 520 μ l 1%iger Ameisensäure abgestoppt. Als Positivkontrolle wurde Nordihydroguaiaretsäure eingestetzt die in diesem Testsystem einen IC_{50} von 0,5 μ M hat.

3.2.3 Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse:

Arachidonsäure und ihre Metabolite wurden aus dem Testansatz durch Ausschütteln mit 4 ml Ethylacetat (75 s Whirleymix) extrahiert und nach dem Einengen der Probe am Rotationsverdampfer in 100 µl Ethanol wieder aufgenommen.

3.2.4 Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von HPLC und Radioaktivitätsdetektion (Methode LIPO). Bei den ermittelten Hemmwerten handelt es sich um Relativwerte, welche sich aus dem Flächenverhältnis für 5-HETE, LTB₄ und Arachidonsäure errechnen. Das für die Probe bestimmte Flächenverhältnis für LTB₄ wurde auf das entsprechende Flächenverhältnis in gleichbehandelten Negativkontrollen (=100%) bezogen. Die durch die Probe bewirkte Hemmung der Leukotrienbiosynthese wird in Hemmung [%] angegeben.

Berechnung:

$$100 - (\text{LTB}_4\text{-Konz. Probe} \times 100 / \text{LTB}_4\text{-Konz. Kontrolle}) = \text{Hemmung} [\%]$$

Entsprechend wurden die Hemmwerte für 5-HETE ermittelt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den mit diesem Test ermittelten und im Ergebnisteil aufgeführten Werten um die für LTB₄ ermittelten Werte.

3.3 Durchführung des neu entwickelten Testassays

3.3.1 Herstellung der Reagenzien

Pufferlösung für Zellverdünnung und Testansatz

TRIS	1,75 g
NaCl	0,9 g
Aqua ad injectabilia	ad 300 ml

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und auf ca. 250 ml aufgefüllt. Mit einer geeichten Glaselektrode wurde der pH Wert mit 1N-Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt und der Puffer mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde für jede Testdurchführung neu hergestellt.

Calciumchlorid

58,8 mg CaCl₂ (Fa. Merck) wurden in 10,0 ml Ethanol p.a. gelöst. Die Lösung wurde bei –20 °C gelagert und konnte so mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Eicosatetrainsäure

1,4 mg Eicosatetrainsäure (Fa. Sigma) wurden in 5,0 ml Ethanol p.a. gelöst. Diese Stammlösung konnte mehrere Wochen bei –20°C aufbewahrt werden. Vor jedem Test wurden 100 µl dieser Lösung mit 900 µl TRIS-Puffer frisch verdünnt.

Calcium Ionophor A 123187

10 mg Ca-Ionophor (Fa. Boehringer Mannheim) wurden in 4,166 ml Ethanol p.a. gelöst. Diese Stammlösung konnte mehrere Wochen bei –20°C aufbewahrt werden. Vor jedem Test wurden 100 µl dieser Lösung mit 900 µl TRIS-Puffer frisch verdünnt.

Arachidonsäure

Nicht radioaktiv markierte Arachidonsäure wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in Ethanol vom Hersteller bezogen und bei –80° gelagert . Daraus wurde eine Stammlösung der Konzentration 1 mM hergestellt, die bei –20° gelagert wurde. Für den 5-LOX Assay wurden 120 µl dieser Lösung mit 880 µl Ethanol p.a. verdünnt.

3.3.2 Probenvorbereitung

Alle Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, in Ethanol p.a. gelöst. Die Einwaage erfolgte auf 0,01 mg genau. Das Gesamtvolumen des Testansatzes belief sich auf insgesamt 265 µl von jeder Probe wurden 5 µl einpipettiert.

3.3.3 Testdurchführung

Die Lösungen wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Vor Beginn des Test wurde der EIA-Kit zum Auftauen aus dem Gefrierschrank genommen.

Leukozytensuspension, Cofaktoren und Probelösungen wurden in den entsprechenden Mengen in die Mikrotiterwells vorgelegt (Tabelle 44). Als Negativkontrolle diente Ethanol p.a., als Positivkontrolle NDGA (0,5 µM). Die

Reaktion wurde dann durch Zupipettieren der Arachidonsäure gestartet und der Testansatz 10 min bei 37°C am Schüttelwasserbad inkubiert. Die Umsetzung wurde anschließend durch Zugabe von 20 µl 10% Ameisensäure abgestoppt und die Zellbestandteile der Leukozyten 15 min bei 1200 RPM in einer Ultrazentrifuge von der Prüflösung abgetrennt.

Lösung	Konzentration	Volumen
Leukozytensuspension	20000/µl	225 µl
CaCl ₂	0,2 mM	10 µl
Eicosatetraensäure (ETYA)	1 µM	10 µl
Probe/Ethanol		5 ml
Ca Ionophor 23187	1,5 µM	10 µl
Arachidonsäure	120 µM	5 µl
Ameisensäure	10 %	20 µl

Tabelle 42: Testbedingungen für den 5-LOX Screening Assay

Während der Inkubation und dem Zentrifugieren wurden die entsprechenden EIA-Kit Puffer und LTB₄ Standards vorbereitet. Nach Abtrennung der Zellbestandteile wurde der Testüberstand mit einer Mehrkanalpipette entsprechend mit TRIS-Puffer verdünnt, um anschließend mit Hilfe des EIAs detektiert werden zu können.

Gerät/Einmalartikel	Bezugsquelle
Schüttelwasserbad Julabo.SW-21 C	Fa. Julabo
Ultrazentrifuge J6	Fa. Beckman
Zentrifugeneinsätze für Microtiterplatten	Fa. Beckman
Zentrifugeneinsätze für Falconröhrchen (50 ml)	Fa. Beckman
50 ml Falconröhrchen	Fa. Greiner Labortechnik
Dispenser Multipette 4780	Fa. Eppendorf
Varietipetten 4810 0,5-10 µl; 10-100µl; 200-1000µl	Fa. Eppendorf
Micro-Platten, F-Form; steril mit Abdeckplatten	Fa. Greiner Labortechnik
Mehrkanalpipetten	Fa. Brand
Combitips 0,5 ml; 2,5 ml; 5 ml	Fa. Eppendorf
Kulturflaschen	Fa. Greiner Labortechnik

Tabelle 43: Für den 5-LOX Test benötigte Geräte

3.3.4 Detektion von LTB₄ mit EIA (Enzym Immuno Assay)

Verwendete Assays

LTB₄ Immunoassay, Fa. R&D Systems; Katalognummer DE 0200

LTB₄ Immunoassay, Fa. Cayman Chemicals; Katalognummer 520111

Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß den Anweisungen der Hersteller. Für die Probenvermessung mit Hilfe des EIA Kits der Firma R&D (Nachweisgrenze 30 pg/ml) mussten die Proben mit TRIS-Puffer 1:10 verdünnt werden. Beim empfindlicheren Assay der Firma Cayman Chemicals (Nachweisgrenze 4 pg/ml) musste der Überstand 1:300 verdünnt werden. Die EIA-Platte wurde mit einem ELISA Reader der Firma TECAN vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms EASYWIN-Fitting Version 4.0a (Fa. TECAN). Als Vorgabe wurde das Plattendesign eingegeben. Die in Gleichung 1 angegebenen Formeln dienen der Berechnung der Konzentration.

$$X - BI = Y$$

$$(Y - NSB) / (Bo - NSB) = Z$$

$$Z * 100 = Z [\%]$$

X: Messwert

Y, Z: Zwischenergebnisse

BI: Blindwert

NSB: unspezifische Bindungen

Bo: maximale Bindung

Gleichung 1: Berechnung zur computergestützten Auswertung der LTB₄ Konzentration im EIA

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zudem wurde jede Probe in mindestens drei verschiedenen Tests eingesetzt und erst bei Reproduzierbarkeit der Mittelwert errechnet. Um die prozentuale Hemmung zu errechnen, wurde analog Abschnitt 3.2.4 dieses Kapitels (S. 145) vorgegangen. Um den IC₅₀ Wert (Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Hemmung) einer Substanz oder eines Pflanzenextraktes zu ermitteln, wurde die Probe in mindestens drei Tests mit mindestens drei Konzentrationen eingesetzt. Aus den erhaltenen Mittelwerten für jede Konzentration wurde der IC₅₀ Wert nach graphischer Darstellung mit logarithmischer Regression berechnet (Gleichung 2, 3).

$$y = A + B \cdot \ln x \quad A = \frac{\sum y - B \cdot \sum x}{n} \quad B = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - \sum x^2}$$

Gleichung 2: Berechnung der IC₅₀ Werte über logarithmische Regression (I)

$$IC_{50} = e^{\frac{50-A}{B}}$$

Gleichung 3: Berechnung der IC₅₀ Werte über logarithmische Regression (II)

3.4 Cyclooxygenase-Test (COX-1 und -2 Test)

Gereinigte Prostaglandin H Synthase 1 und 2 wurde von der Firma Cayman Chemicals bezogen. PGHS1 war aus Schafsamenblasen isoliert, PGHS2 aus Schafcotyledonen.

3.4.1 Probenvorbereitung:

Alle Proben wurden in Ethanol p.a. gelöst. Die Einwaage erfolgte auf 0,01 mg genau.

Gesamtvolumen des Testansatzes: 200 µl

Darin enthaltenes Probenvolumen: 10 µl

Zur Berechnung der Probenkonzentration für Substanzen mit bekanntem Molekulargewicht gilt daher:

$$\text{MG Probe} \cdot 2 / 1000 = \text{mg Probe} / \text{ml Ethanol}$$

3.4.2 Durchführung der Inkubation

Die Inkubation wurde nach der von Reiningger (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Für den COX1 Test enthielt die Testmischung 20 µl Tris/HCl Puffer pH 8,0; 18 µM Adrenalin und 10 µl Probelösung. Aufgetautes Enzym wurde in 100 µl Assaypuffer (Tris pH 8,0) verdünnt und dazupipettiert (Aktivität des Enzyms: 0,2 U). Danach wurden 5 µM Haematin dazugegeben. Nach 5 minütiger Vorinkubation bei Raumtemperatur wurden 5 µM Arachidonsäure dazugegeben. Anschließend wurde 20 min bei 145 RPM auf dem

Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Ameisensäure (10 %) abgestoppt. Beim COX-2 Test wurde ebenso verfahren. Allerdings enthielt die Testlösung zusätzlich 50 µM NaEDTA; statt 20 µl wurden 10 µl TRIS/HCl Puffer pH 8,0 zupipettiert. Beide Tests konnten zusammen auf einer Platte durchgeführt werden.

3.4.3 Auswertung

Die Detektion von PGE₂ erfolgte mittels EIA (Enzym Immuno Assay). Dazu wurde ein industriell gefertigter Kit der Firma R&D gemäß der Anweisung des Herstellers angewendet. Die Auswertung des Kits erfolgte analog des in Abschnitt G.3.3.4 (S.143) beschriebenen Methode.

3.5 Chemilumineszenztest mit polymorphkernigen Granulozyten*

Isolierung der menschlichen Granulozyten

5 ml menschliches Blut wurden in einem Gewebekulturröhrchen auf 3 ml PolymorphprepTM geschichtet. Nach 25 minütigem Zentrifugieren mit 1740 U/min bei 24 C° und Abpipettieren der Thrombozyten und Monozyten wurden die polymorphkernigen Granulozyten gewonnen. Diese wurden zweimal mit HBSS-Puffer 10 min in der Zentrifuge gewaschen und anschließend in 1 ml HBSS-Puffer aufgenommen.

Vitalität und Zellzahl

Zur Überprüfung von Reinheit, Lebensfähigkeit und Zellzahl / ml wurden 10 µl der Suspension mit 10 µl Trypanblau angefärbt und in einer Neubauerkammer untersucht. Mit HBSS-Puffer wurde jeder Ansatz auf eine Konzentration von 5 x 10⁶/ml eingestellt.

* Die Chemilumineszenztestung wurde von Herrn Dr. J. Heilmann am Institut für Klinische Anästhesiologie der Universitätskliniken Düsseldorf vorgenommen. Ihm sei an dieser Stelle sehr herzlich gedankt.

Probenvorbereitung

Von den zu untersuchenden Substanzen wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml Ethanol hergestellt. Diese wurde durch Verdünnen auf die entsprechenden Konzentrationen gebracht.

Durchführung des Tests

Der Test wurde nach der von Weiss *et al.* (1993) beschriebenen Methode durchgeführt. 50 µl Granulozytensuspension wurden mit 50 µl einer 2×10^{-4} molaren Lösung von Luminol (Fa. Sigma), 50 µl HBSS-Puffer und 50 µl der Testlösung gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 µl FMLP (5×10^{-7} mol) (Fa. Sigma) gestartet. Die Verwendung eines 6-Kanal Biolumat LB 9505 (Fa. Berthold) erlaubte die gleichzeitige Messung von 5 verschiedenen Konzentrationen gegen einen Kontrollwert, bei dem die 50 µl Substanzlösung durch den HBSS-Puffer ersetzt wurden. Die entstehende Chemilumineszenz wurde bei 37°C kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min nach Zugabe von FMLP gemessen.

Auswertung

Um die Verringerung der Chemilumineszenz zu quantifizieren, wurden die Flächen unter den Aktivitäts-Zeit-Kurven berechnet und auf die mittleren Flächen der Kontrollwerte bezogen. Die Reduktion der Chemilumineszenz wurde in % vom Kontrollwert angegeben:

$$\text{Reduktion in \%} = 100 - \frac{\text{Fläche (Substanz)} \times 100}{\text{Fläche (Kontrolle)}}$$

Jede Testkonzentration wurde siebenmal getestet und aus den Ergebnissen die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

4 Phytochemische Untersuchungen

4.1 Herstellung der Pflanzenextrakte

4.1.1 Soxhletextrakte für Analytik und Screening

Zum pharmakologischen Screening und für erste analytische Untersuchungen wurden kleinere Mengen pulverisierte Droge in einer Drogenmühle Typ A 10 (IKA-Werke) fein pulverisiert und 5 g in eine Extraktionshülse (Firma Machery und Nagel) genau eingewogen.

Das Pulver wurde dann mit 60 ml *n*-Hexan in einer Soxhletapparatur jeweils 2 h (Heizpilz Stufe 2) extrahiert. Die Hülsen wurden danach getrocknet und erneut mit 60 ml Dichlormethan extrahiert. Nach erneutem Trocknen wurde anschliessend noch mit 60 ml Methanol extrahiert.

4.1.2 Soxhletextrakte zur Isolierung

960 g getrocknete Wurzel von *Salvia miltiorrhiza* wurden in einer Drogenmühle (Commercial Blender, Waring) fein gemahlen und in insgesamt 4 Extraktionshülsen überführt. Diese wurden in Soxhletapparaturen unter Verwendung von *n*-Hexan als Lösungsmittel erschöpfend extrahiert (Gesamtdauer der Extraktion 40 Stunden, alle 10 Stunden wurde das Extraktionsmittel gegen frisches *n*-Hexan ausgetauscht). Nach Entfernung des *n*-Hexans wurden 38,4 g zähflüssiger rotbrauner Extrakt erhalten.

4.1.3 Dekokt

Zur Herstellung des Dekoktes wurde 3 g geschnittene Droge in einem 100 ml Erlenmeyerkolben zunächst 30 min in 30 ml Wasser eingeweicht und dann unter Rühren einmal kurz aufgekocht. Bei ca 50°C Temperatur wurde der Ansatz dann weitere 30 min ziehen gelassen. Nach dem Abkühlen wurde der wässrige Extrakt in einen Messzylinder dekantiert und auf 25 ml aufgefüllt.

4.2 Chromatographische Arbeitsmethoden

4.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Probenvorbereitung (analytische DC)

Pflanzenextrakte:

Die *n*-Hexan-, Dichlormethan- und Methanolextrakte der verschiedenen Drogenextrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und in Ethanol p.a. wieder aufgenommen, so dass eine Lösung der Konzentration 10 mg/ml entstand. Von dieser Lösung wurden 10 µl in 1 cm breiten Banden auf DC Platten aufgetragen.

Referenzsubstanzen:

Von den Referenzsubstanzen wurde eine Prüflösung der Konzentration 1 mg/ml Ethanol p.a. hergestellt.
Von dieser Lösung wurden 5 µl in 1 cm breiten Banden aufgetragen.

Stationäre Phase:

DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0,2 mm (Fa. Merck)

Mobile Phase:

- FM 1:** *n*-Hexan-Ethylacetat (80+20)
- FM 2:** *n*-Hexan-Ethylacetat (90+10)
- FM 3:** Dichlormethan-Methanol (40+10)
- FM 4:** Toluol-Ethylacetat-Essigsäure (80+15+5)

Detektion:

Direktauswertung: Tageslicht (vis)

Fluoreszenzminderung bei UV 254 nm

Eigenfluoreszenz bei 365 nm

Detektionsmittel:

Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz:

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung in der angegebenen Reihenfolge gemischt. Nach kräftigem Besprühen wird die DC Platte 5-10 min bei 100°C erhitzt und im vis ausgewertet.

Vanilin-Schwefelsäure Reagenz:

85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure wurden gemischt und nach dem Abkühlen 1,0 g Vanillin zugegeben. Die trockene DC Platte wurde mit der Lösung kräftig besprüht und anschließend auf 100-105°C erhitzt.

Präparative Dünnschichtchromatographie:

Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die gleichen DC Alufolien benutzt wie zu analytischen Zwecken. Diese wurden vor ihrer Verwendung in Methanol vorentwickelt und 1 h im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Dadurch wurden Klebstoff- und Weichmacherreste aus dem Herstellungsprozess entfernt. Die zu trennenden Substanzen wurden in Form konzentrierter Lösungen strichförmig über die gesamte Breite der Startzone aufgetragen.

Um die getrennten Substanzen vom Kieselgel zu eluieren, wurden die entsprechenden Zonen zuerst unter UV-Licht markiert und dann vorsichtig mit einem Spatel ausgekratzt. Das Kieselgel wurde dann in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit dem Magnetrührer erschöpfend extrahiert. Als Lösungsmittel diente hierbei *n*-Hexan-Ethylacetat (80+20). Um Kieselgelreste vollständig zu entfernen wurden die Lösungen anschließend über Blaubandfilter der Firma Schleicher & Schuell filtriert.

4.2.2 Offene Säulenchromatographie

Säulen

Bei den verwendeten Säulen handelte es sich ausschließlich um Glassäulen mit Fritte und fein regulierbarem Auslaufhahn.

Stationäre Phasen:

- Kieselgel 60, Korngröße 0,040-0,63 mm, 230-400 mesh ASTM, Fa. Merck. Das Kieselgel wurde vor dem Befüllen mit entsprechendem Eluens aufgeschwämmt und die Säule rasch und luftblasenfrei bei geöffnetem Auslaufhahn gegossen. Mit Kieselgel befüllte Säulen wurden nur jeweils einmal verwendet, das Material anschließend verworfen.
- Sephadex LH-20 (Pharmacia)
Vor dem Befüllen wurde das Sephadex-Material mehrere Stunden mit Methanol vorgequollen. Diese Suspension wurde dann bei geöffnetem Säulenhahn langsam in die Säule eingegossen und mit Methanol solange nachgespült, bis die Füllhöhe konstant blieb. Eine Sephadexsäule konnte mehrmals verwendet werden.

Probenaufgabe:

Vor der Probenaufgabe wurde das Fließmittel bis knapp über das Säulenbett abgelassen. Die aufzutrennende Fraktion wurde in wenig Fließmittel gelöst und mit einer Pasteurpipette gleichmäßig auf das Säulenbett gegeben, ohne dieses aufzuwirbeln. Nachdem die Probe in die oberste Säulenschicht eingedrungen war, wurde noch einmal mit wenig Fließmittel nachgespült. Danach wurde die stationäre Phase mit dem Eluenten überschichtet und mit der Trennung begonnen. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler (Fa. Büchi) aufgefangen.

4.2.3 Vakuumflüssigchromatographie (VLC)

Die von *Pelletier et al.* (1986) beschriebene Vakuumflüssigchromatographie ist eine Abwandlung der offenen Säulenchromatographie. Durch Anlegen eines Vakuums wird eine gut reproduzierbare und vor allem schnelle Grobfractionierung von Rohextrakten und auch Fraktionen erreicht. Für die VLC

werden spezielle, vom Glasbläser angefertigte Säulen mit Fritte verwendet, die unten einen Stutzen zum Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe und einen Kolbenschliff besitzen. Die Säule wurde trocken mit Kieselgel gepackt. Dazu wurde unten eine Lage Glaswolle und eine Schicht Seesand (~1cm) geschichtet. Die Probe wurde als Verreibung mit etwas Kieselgel aufgebracht und mit einer weiteren Schicht Seesand abgedeckt, um ein Aufwirbeln der Probe durch das Fließmittel zu vermeiden. Das Verhältnis zwischen Probenmenge und stationärer Phase lag etwa bei 1:10. Nach Anhängen eines Schliffkolbens wurde dann das Vakuum angelegt und das aufgebraute Eluens durch die Säule gesaugt. Das Eluat wurde in einem Schliffkolben aufgefangen. Als Fließmittel wurden konstante Mengen eines n-Hexan-Ethylacetat Gemisches mit steigender Hydrophilie verwendet. Die Säule wurde vor jeder neuen Fließmittelzusammensetzung trockengesaugt.

4.2.4 Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Geräte

- HPLC-Pumpe 64 mit Gradientensteuerung, HPLC Programmer 50 und Mischkammer (Knauer), Multiwellendetektor 860 (DuPont), 2-Kanal-Schreiber 7130A (Hewlett Packard)

MPLC-Pumpe B 688 mit Gradientensteuerung B 687 und Fraktionssammler B 687 (alle Geräte von Büchi)

Säulen:

- Glassäulen aus dickwandigem Borosilikatglas vom Glasbläser der Größe 0,8 cm x 42 cm (Säule 1), bzw. 1,1 cm x 55 cm (Säule 2)
- Borosilikatsäulen von Büchi

Stationäre Phasen:

- LiChroprep RP-18, 15-25 µm (Fa. Merck)
- LiChroprep RP-18, 25-40 µm (Fa. Merck)

Mobile Phase:

Deionisiertes Wasser/Acetonitril für die HPLC (J.T. Baxter)

Probenaufgabe:

Die Probe wurde beim Gerät der Firma Knauer je nach Probenmenge über eine 1 bzw. 5 ml Probenschleife auf die Säule gepumpt.

Bei der MPLC-Anlage der Firma Büchi wurde die Probe in wenig Lösungsmittel gelöst, direkt auf das Säulenbett gegeben und mit Druckluft in das RP-18 Material eingebracht.

Durchführung:

Bei einer Flussrate von 2 ml/min bzw. 5 ml/min wurde eine Gradientenelution über 2 bis 4 Stunden durchgeführt. Bei der MPLC-Anlage von Knauer erfolgte die Fraktionierung manuell unter Zuhilfenahme der vom UV-Detektor/Schreiber ausgeworfenen Signale. Bei Benutzung des Gerätes von Büchi wurde die Fraktionierung durch den Fraktionssammler durchgeführt, die Möglichkeit der Detektion mittels UV bestand hierbei nicht.

4.2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Probenvorbereitung:

Die einzelnen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und anschließend mit Ethanol p.a. wieder aufgenommen und auf eine bestimmte Konzentration eingestellt.

Um die lipophilen Inhaltsstoffe des Dekoktes zu lösen wurden 25 ml Dekokt auf eine Extrelut 20 Fertigsäule (Merck) gegeben. Nach 30 min wurde mit 40 ml Chloroform je zwei mal mit 40 ml Chloroform eluiert, das Eluat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und anschließend in 1 ml Ethanol aufgenommen.

Gerät:

Liquid Chromatograph HP 1050 mit Autosampler 1050 und HP Chemstation (Hewlett-Packard)

Detektoren:

- Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M (Hewlett-Packard).
- Radioaktivitätsmonitor LB 507 B, EG & G Berthold (ursprünglicher 5-LOX-Test)

Säulen:

- LiChroCART[®] 125-4 mit LiChroSpher[®] 100 RP-18 (5 µm) mit Vorsäule, LiChroCART[®] 4-4 mit LiChroSpher[®] 100 RP-18 (5 µm), beide von Merck (Standardsäulen für die Analytik und pharmakologische Testungen)
- Hibar[®] Fertigsäule RT, 250 mm x 10 mm, mit LiChrosorb[®] RP 18 (7 µm) von Merck (für semipräparative HPLC)

Mobile Phasen:

- Aqua ad injectabilia (Braun)
- Acetonitril für HPLC (J.T.Baxter)
- Aqua ad injectabilia (Braun) mit 0,1% (V/V) 10N *ortho*-Phosphorsäure p.a. (Fluka)
- Acetonitril für HPLC (J.T.Baxter) mit 0,1% (V/V) 10N *ortho*-Phosphorsäure p.a. (Fluka)

Trennsysteme:

KHEX	Mobile Phase:	A: Wasser B: Acetonitril
	Gradient:	30% B 5 min (isokratisch); 30-70% B linear in 20 min, 70-95% B linear in 15 min, stop time 45 min
	Fluss:	1,0 ml/min
	Detektion:	Radioaktivitätsdetektor
	Einspritzvolumen:	40 µl

Experimenteller Teil

KVS	Mobile Phase:	A: Wasser B: Acetonitril
	Gradient:	40-55% B linear in 15 min; in 18 min linear auf 95% B; stop time 35 min
	Fluss:	1,0 ml/min
	Detektion:	220, 254, 330, 450 nm
	Einspritzvolumen:	10 µl
KPRÄP1	Mobile Phase:	A: Wasser B: Acetonitril
	Gradient:	60-90% B linear in 15 min; stop time 25 min
	Fluss:	2,0 ml/min
	Detektion:	254 nm
KPRÄP2	Mobile Phase:	A: Wasser B: Acetonitril
	Gradient:	30-60% B in 20 min; stop time 30 min
	Fluss:	2,0 ml/min
	Detektion:	254 nm
KPRÄP3	Mobile Phase:	A: Wasser B: Acetonitril
	Gradient:	30-50% B in 25 min; stop time 30 min
	Fluss:	2,0 ml/min
	Detektion:	254 nm
LIPO	Mobile Phase:	A: Wasser + 1% 0,1N-Phosphorsäure B: Acetonitril + 0,1N-Phosphorsäure
	Gradient:	50-90% B in 20 min; stop time 26 min
	Fluss:	1,0 ml/min
	Detektion:	Radioaktivitätsdetektor
	Einspritzvolumen:	40 µl

4.2.6 Gaschromatographie

Verwendete Geräte:

GC-EI-MS gekoppelte Untersuchungen (I)

Gaschromatograph Typ 1700 (Varian) mit Spliteinlasssystem, massenselektiver Detektor Finnigan 1020, (Ionisierungsenergie 70 eV) der Firma Finnigan MAT, Bremen, Säule: Quarzkapillarsäule OPTIMA 1 DF (25 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm Machery & Nagel); Trägergas Helium (5.0)

GC-EI-MS gekoppelte Untersuchungen (II)

Gaschromatograph HP 5890 Series II Plus mit Spliteinlasssystem, massenselektiver Detektor Finnigan 1020 (Ionisierungsenergie 70 eV) und HP Chemstation (alles Hewlett Packard); Säule wie (I), Trägergas Helium (5.0), Säulenvordruck $1,19 \times 10^5$ Pa, Trägergasstrom (total): 70 ml/min; Säulendurchflussrate 1,5 ml/min (Split 1:47).

Temperaturgradient:

Standardmethode: 120°C, 1 min; 120-270°C linear in 15 min; 20 min 270°C isotherm

4.3 Spektroskopische und physikalische Arbeitsmethoden

4.3.1 UV-Spektroskopie

Sämtliche UV-Spektren wurden online während der HPLC-Analysen mit dem Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M (Hewlett-Packard; HPLC-Anlage siehe Kapitel G 2.2.5) in Acetonitril–Wasser-Gemischen bei Raumtemperatur aufgenommen.

4.3.2 Massenspektrometrie (MS)

GC-EI-MS

EI-Massenspektren wurden unter Kopplung des jeweiligen Massenspektrometers mit einem Gaschromatographen (Kapitel G.4.2.6) aufgenommen.

DIE-MS

Direkteinlassuntersuchungen wurden mit dem Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT) gemessen.

Chemische Ionisation

Die Messung von CI-Spektren erfolgte am Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT). Als Reaktandgas für die chemische Ionisation wurde NH₃ verwendet.

4.3.3 NMR-Spektrometrie

Gerät:

Kernresonanzspektrometer DRX 500, Fa. Bruker

Messfrequenz:

500 MHz für ¹H-NMR; 125 MHz für ¹³C-NMR

Probenköpfe:

TBI-Probenkopf für ¹H-NMR und 2D-NMR Experimente

QNP-Probenkopf für ¹³C und DEPT Experimente

Lösungsmittel:

d-Chloroform (98,8%, Fa. Merck)

Dimethylsulfoxid D₆ (99,8%, Fa. Merck)

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden unter Stickstoff getrocknet oder über Nacht im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt. Vor der Messung wurden sie in d-Chloroform bzw. DMSO D₆ gelöst und über Glaswolle filtriert.

4.4 Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe aus *Salvia miltiorrhiza*

Der Gehalt von Tanshinon IIa, Cryptotanshinon, Tanshinon I und 15,16-Dihydrotanshinon wurde mittels HPLC und externer Standardkalibrierung in neun *n*-Hexanextrakten von *Salvia miltiorrhiza* bestimmt.

Eichgerade:

Zur Erstellung der Eichgeraden wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der einzelnen Substanzen hergestellt. Diese wurden dann je zweimal in die HPLC eingespritzt (Methode **KGUT**, Einspritzvolumen 10 µl). Aus den erhaltenen Peakflächen wurde je ein Mittelwert berechnet. Aus den Mittelwerten und der Menge an eingespritzter Substanz wurde mittels linearer Regression der Eichfaktor als Steigung der Eichgeraden erhalten.

Gleichung der Eichgeraden:

$$y = mx + b$$

m= Eichfaktor

x = Menge [µg]

y = Peakfläche

b = y-Achsenabschnitt

	1. Verd. (µg/ml)	2. Verd. (µg/ml)	3. Verd. (µg/ml)	4. Verd. (µg/ml)	5. Verd. (µg/ml)	Faktor
Tanshinon IIa	2000	1500	900	500	250	12,98
Cryptotanshinon	1500	900	500	250	100	9,86
Tanshinon I	750	630	500	370	250	16,79
Dihydrotanshinon	700	500	250	100	50	3,03

Tabelle 44: Zur Ermittlung der Eichgeraden hergestellten Verdünnungen

Eine definierte Menge an Reinsubstanz wurde danach mittels eines HPLC Laufes mit Hilfe der erstellten Eichgerade quantitativ bestimmt. So wurde die Wiederfindung und damit die Eignung der Eichgrade überprüft. Die Einzelergebnisse lagen für alle isolierten Reinstoffe innerhalb ±5% von 100% der Einwaage.

Extrakte:

Für die Drogenmuster Sm1, Sm2, Sm6, Sm7 und Sm10-17 wurde jeweils der Gehalt der verschiedenen Reinstoffe quantifiziert. Von jeder der genannten Chargen wurden 3 x 5 g 2 h lang mit 60 ml *n*-Hexan in einer Soxhletapparatur extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne

eingeeengt, gewogen und mit Ethanol p.a. auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in die HPLC eingespritzt (Methode KGUT). Mit Hilfe der ermittelten Faktoren konnte für jede Substanz deren absoluter Gehalt ermittelt werden. Daraus konnte der relative Gehalt [%] des jeweiligen Reinstoffes im Extrakt und in der getrockneten Droge berechnet werden.

4.5 Isolierung der Inhaltsstoffe aus *Salviae miltiorrhizae radix*

Der *n*-Hexanextrakt wurde in vier Portionen von jeweils bis zu 10 g mittels Vakuumflüssigchromatographie an 250 g Kieselgel (Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 6,5 cm) in 25 Fraktionen vorgetrennt. Die Fraktionen wurden durch Elution mit je 250 ml *n*-Hexan, Ethylacetat, Methanol und deren Mischungen in steigender Polarität gewonnen. In Tabelle 45 sind die Fraktionen, die Zusammensetzung des Lösungsmittels, mit denen sie eluiert wurden und die Ausbeute aufgeführt.

Fraktion	<i>n</i> -Hexan [ml]	Ethylacetat [ml]	Methanol [ml]	Gewicht [mg]
I	250			204
II	238	25		63
III	225	25		404
IV	213	38		1435
V	200	50		3241
VI	200	50		257
VII	188	63		488
VIII	175	75		917
XI	163	88		1220
X	150	100		720
XI	138	113		570
XII	125	125		370
XIII	113	138		510
XIV	100	150		282
XV	75	175		145
XVI	50	200		198
XVII	25	225		212
XVIII		250		156
XIX		225	25	478
XX		200	50	212
XXI		175	75	317
XXII		150	100	246
XXIII		100	150	*
XXIV		50	200	*
XXV			250	*

* wegen hohem Kieselgelanteil Ausbeute nicht feststellbar

Tabelle 45: Grobfraktionierung des *n*-Hexanextraktes von *Salvia miltiorrhiza* mittels VLC

Tanshinon Ila

Die Fraktionen V und VI wurde mit Hilfe von MPLC weiter aufgetrennt (große MPLC-Säule, Auftragsmenge 320 bzw. 420 mg, mobile Phase Acetonitril/Wasser; 70% Wasser auf 60% Acetonitril mit 1% Zumischung pro

min, 30 min isokratisch, auf 100% Acetonitril mit 3% Zumischung pro min; Fluss 5 ml/min). Ausbeute: 25 mg.

Miltiron

Die Miltiron-haltige MPLC Fraktion aus der Auftrennung von Fraktion V wurde mittels präparativer DC in Fließmittel LM2 weiter aufgereinigt. Ausbeute: 12 mg

Dehydromiltiron

Aus derselben Fraktion wie Miltiron wurde auch Dehydromiltiron mit Hilfe von präparativer DC isoliert. Ausbeute: 8mg.

Tanshinon I

Tanshinon I wurde nach Auftrennung von Fraktion VII an Kieselgel mittels offener Säulenchromatographie (Säulendurchmesser = 3 cm, Füllhöhe 40 cm (- > 95 g Kieselgel, Fließmittel Hexan/Ethylacetat 80:20), Auftragsmenge 870 mg. Aufgefangen wurden je 10 ml Eluat. Nach DC-Kontrolle in LM2 wurden die Tanshinon I reichen Eluate vereinigt und diese mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt (Methode KPRÄP1). Auf diese Weise erhielten wir 10 mg Tanshinon I.

Cryptotanshinon

Nach der Grobfractionierung durch VLC lag Cryptotanshinon in Fraktion VIII bereits in hochangereicherter Form vor. Zur endgültigen Aufreinigung wurden 430 mg Fraktion VIII auf eine große MPLC-Säule gegeben und an RP 18 Material getrennt (70% Wasser, 1% Zumischung pro min bis 65% Acetonitril, dann isokratisch). Ausbeute: 24 mg.

15,16-Dihydrotanshinon

Fraktion X wurde mittels MPLC an RP18 Material (mittlere Säule) weiter aufgetrennt (70% Wasser, 1% Zumischung pro min bis 80% Acetonitril, Auftragsmenge: 230 mg). Ausbeute: 10 mg

Tanshinol A

Fraktion XI wurde durch offene Säulenchromatographie an Kieselgel weiter aufgetrennt (Säulendurchmesser: 2,5 cm, Füllhöhe 30 cm -> entspricht 60 g Kieselgel). Als Fließmittel diente Dichlormethan. Die Tanshinol A-haltige Fraktion wurde anschließend mittels präparativer HPLC (Methode KPRÄP2) weiter aufgetrennt. Ausbeute: 1 mg.

3-Hydroxy-Tanshinon IIa

Fraktion XII wurde mittels MPLC an RP18 Material (mittlere Säule) weiter aufgetrennt. (70 % Wasser, 1% Zumischung pro min bis 80% Acetonitril, Auftragemenge: 300 mg). Nach DC-Kontrolle in LM3 wurden die 3-OH Tanshinon IIa reichen Eluate vereinigt und diese mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt (Methode KPRÄP3). Auf diese Weise erhielten wir 5 mg 3-OH Tanshinon IIa.

4.6 Physikalische und spektroskopische Daten der isolierten Verbindungen

Tanshinon IIa

Summenformel: $C_{19}H_{18}O_3$

Aussehen: orangefarbene Nadeln

UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 226, 254, 275, 355, 460

EI-MS: m/z (rel. Int.): 296 [M]⁺ (100), 281 (53); 263 (28), 253 (35), 235 (24), 221 (6), 195 (5), 178 (6), 165 (12), 128 (15), 115 (13), 105 (7), 89 (8), 76 (7), 63 (5), 53 (5), 43 (15)

¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Cryptotanshinon

Summenformel: $C_{19}H_{20}O_3$

Aussehen: orangefarbene Nadeln

UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 220, 264, 273, 295, 360, 455

EI-MS: m/z (rel. Int.): 294 [M]⁺(100) 279 (37); 261 (63), 251 (34), 233 (13), 222 (7), 207 (5), 189 (5), 178 (26), 165 (27), 152 (10), 139 (6), 128 (5), 115 (7), 95 (4), 89 (10), 76 (9), 63 (7), 51 (6), 43 (10)

¹³C und ¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Tanshinon I

Summenformel: $C_{18}H_{12}O_3$

Aussehen: dunkelrote Nadeln

UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 243, 280, 320 (sh), 415

EI-MS: m/z (rel. Int.): 294 [M]⁺(100) 279 (37); 261 (63), 251 (34), 233 (13), 222 (7), 207 (5), 189 (5), 178 (26), 165 (27), 152 (10), 139 (6), 128 (5), 115 (7), 95 (4), 89 (10), 76 (9), 63 (7), 51 (6), 43 (10)

¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

15, 16-Dihydrotanshinon I

Summenformel: $C_{18}H_{14}O_3$

Aussehen: rotbraune Nadeln

UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 219, 240, 290, 340, 420

EI-MS: m/z (rel. Int.): 294 [M]⁺(100) 279 (37); 261 (63), 251 (34), 233 (13), 222 (7), 207 (5), 189 (5), 178 (26), 165 (27), 152 (10), 139 (6), 128 (5), 115 (7), 95 (4), 89 (10), 76 (9), 63 (7), 51 (6), 43 (10)

¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Tanshinol A

Summenformel: $C_{18}H_{12}O_4$
 Aussehen: orange Nadeln
 UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 240, 280, 320 (sh), 405
¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

3-Hydroxy-Tanshinon IIa

Summenformel: $C_{19}H_{18}O_4$
 Aussehen: rote Nadeln
 UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 220, 250, 271, 355, 460
¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Miltiron

Summenformel: $C_{19}H_{22}O_2$
 Aussehen: rotes Öl
 UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 220, 264, 273, 295, 360, 455
 EI-MS: m/z (rel. Int.): 282 [M]⁺(15) 227 (9); 213 (13), 202 (3), 185 (31), 165 (23), 152 (18) 128 (17) 115 (17), 91 (7), 69 (11) 56 (43), 41 (100)
¹³C und ¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Dehydromiltiron

Summenformel: $C_{19}H_{20}O_2$
 Aussehen: rotes Öl
 UV (CH₃CN/H₂O): λ_{max} (nm) 220, 264, 273, 295, 360, 455
¹H-NMR: s. Kap. E.3.3.2.

Stigmasterol

Summenformel: $C_{29}H_{48}O_2$
 Aussehen: weiße Nadeln
 EI-MS: m/z (rel. Int.): 412 [M]⁺(5) 351 (3); 314 (2), 301 (2), 300 (6), 282 (4), 271 (9), 255 (11), 231 (3), 229 (3), 213 (7), 159 (19), 145 (23), 133 (25), 105 (29), 83 (54), 55 (100), 41 (45)

H Literaturverzeichnis

- AI, C.B.; LI, L.N.: Salvianolic Acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **58**, 197-199 (1992)
- AI, C.B.; LI, L.N.: Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Nat. Prod.* **51**, 145-149 (1988)
- AMMON, H.P.T.; SAFAYHI, H.; MACK, T.; SABI ERAJ, J.; Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acid. *J. Ethnopharmacol.* **38**, 113-119 (1993)
- BAILLIE, A.C.; THOMSON R.H.: Naturally occurring Quinones. Part IV. The Tanshinones. *J Chem Soc [C]*, 48-52 (1968)
- BAOSHU, F.; SHURONG, L.: Studies on the chemical components of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Acta Pharmaceutica Sinica*, **15**, 489-494 (1980)
- BOKOCH, G.; REED, P.: Evidence for inhibition of leukotriene A₄ synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **256**, 4156-4159 (1981)
- BRIESKORN; C.H., FUCHS; A., BREDENBERG, J.B., McCHESNEY, J.D.; WENKERT, E.; The structure of Carnesol, *J. Org. Chem.*, **29**, 2293-2298 (1964)
- CHAN, T.Y.K.: Interaction between warfarin and danshen (*Salvia miltiorrhiza*). *Annals of Pharmacotherapy* **35**, 501-514 (2001)

- CHANG, H.M.; BUTT, P.P.H. (Hrsg.): Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica, Vol. 2, World Scientific Publishing, Singapore (1987)
- CHANG, H.M.; CHENG, K.P.; CHOANG, T.F.; CHOW, H.F.; CHUI, K.Y.; HON, P.M.; TAN, F.W.L.; ZHONG, Z.P.: Structure elucidation and total synthesis of new Tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge (Danshen). J. Org. Chem. **55**, 3537-3543 (1990)
- CHEN, M.K.; YOUNG, P.T.; KU, W.H.; CHEN, Z.X.; CHEN, H.T.; YEH, H.C.: Studies on the active principles of Dan-Shen.I. The structure of sodium tanshinone II A sulfonate and methylene tanshinquinone. Acta Chim Sin **36**, 199-206 (1978)
- CHEN, W.; LIU, H.C.: Isolation and identification of catechualdehyde from danshen (*Salvia miltiorrhiza*). Chin. Trad. Herb Drugs **11**, 442 (1980)
- CHEN, W.Z.; DONG, D.L.; WANG, C.G., TING, G.S.: Pharmacological studies of sodium tanshinone IIa sulfonate. Acta Pharm Sin **14**, 277-283 (1979)
- CHEN, Y.-L.; YANG, S.-P.; SHIAO, M.-S.; CHEN, J.-W.; LIN, S.-J.: *Salvia miltiorrhiza* inhibits intimal hyperplasia and monocyte chemotactic protein-1 expression after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. Journal of Cellular Biochemistry **83**, 484-493 (2001)
- CHEN, Z.G.; GU, W.H.; HUANG, H.Z., YANG, C.H.; CHANG, P.T.: Studies on the water-soluble phenolic acid constituents of *Salvia miltiorrhiza*. Chin. Pharm. Bull. **16**, 24-25 (1981)
- CHENG, Y.X.; GAN, S.X.; SHU, S.F.; WANG, Q.Q.; Treatment for acute toxipathic hepatitis in rabbits with variously processed Danshen. Bull. Chin. Mater. Med. **10**, 161-162 (1985)
- CHOI, J.S.; KANG, H.S.; JUNG, H.A.; JUNG, J.H.; KANG, S.S.: A new cyclic phenyllactamide from *Salvia miltiorrhiza*. Fitoterapia **72**, 30-34 (2001)

- COLEMAN, R.A.; EGLIN, R.M.; JONES, R.L.: Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**, 283-285 (1997)
- CRACKER, 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)
- COREY, E.J.; LANSBURY, P.T.; CASHMAN, J.R.; KANTNER, S.S.: Mechanism of the irreversible deactivation of arachidonate-5-lipoxygenase by 5,6 dehydroarachidonate, *J.Am. Chem.Soc.* **106**, 1501-1503 (1984)
- DANNHARDT, G.; BAUER A.; NOWE U.; Non-steroidal anti-inflammatory agents, Part 24. Pyrrolidino enaminones as models to mimic arachidonic acid. *Arch. Pharm. Weinheim* **330**, 74-82 (1997)
- DIERS, K.: 5-Lipoxygenase-Inhibitoren und Leukotrienantagonisten. *PZ Prisma* **5**, 217-232 (1998)
- DITTMANN, K.; HAMBURGER, M.; Monoamine oxidase inhibitory diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Abstract No. P122, International Symposium of the Phytochemical Society of Europe, Lausanne (2001)
- DONG, Z.T.; JIANG, W.D.: Effects of Danshen Su on isolated swine coronary artery perfusion preparation. *Acta Pharm Sin* **17**, 226-228 (1982)
- DRAZEN, J.M.; ISRAEL, E.; O'BRYNE P.M.: Treatment of Asthma with drugs modifying the Leukotriene pathway. *The New England Journal of Medicine* **340**, 197-206 (1999)
- FANG, C.N.; CHANG, P.L.; HSU, T.P.; CHEN, Y.P.: The antibacterial components on Dan-Shen. *Acta Chim Sin* **34**, 197-209 (1976)
- FENG, B.S.; LI, S.R.: Studies of chemical components of Danshen – discovery of two new isomers. *Acta Pharm Sin* **15**, 489-494 (1980)

- FESSLER, B.; Biologische in-vitro- Untersuchungen über 5-Lipoxygenase Inhibitoren aus Arzneipflanzen und biologisch chemische Untersuchungen von *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh. Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München (1988)
- FORD HUTCHINSON, A.W.; GRESSER, M.; YOUNG, R.N.: 5_Lipoxygenase. Annu. Rev. Biochem. **63**, 384-417 (1994)
- FORD-HUTCHINSON, A.W.: Leukotriene B₄ in inflammation. Immunology 10, 1-12 (1990)
- FROHNE, D.; JENSEN, U.: Systematik des Pflanzenreichs. 5. Aufl., Wiss. Verl., Ges. Stuttgart (1998)
- GAO, Y.G.; SANG, Y.M.; YANG, Y.Y.; LIU, W.F., TANG, J.X.; Pharmacology of Tanshinone, Acta. Pharm. Sin. **14**, 75-82, (1979)
- GINDA, H.; KUSUMI, T.; ISHITSUKA, M.O.; KAKISAWA, H.; ZHAO, W.J.; CHEN, J.; GUO, Y.T.: Salviolone, a cytotoxic bisnorditerpene with a benztropolone chromophore from a Chinese drug Dan-Shen (*Salvia miltiorrhiza*). Tetrahedron Lett **29**, 4603-4606 (1988)
- HAIZA, M.; LEE, J.; Snyder, J.K.: Asymmetric syntheses of *Salvia miltiorrhiza* abientanoid o-Quinones: Methyl Tanshinonate, Tanshinone IIB, Tanshindol B, and 3-Hydroxytanshinone. J. Org, Chem. **55**, 5008-5013 (1990)
- HAYASHI, T.; KAKISAWA, H.: The structure of Miltirone, a new diterpenoid Quinone. Chemical Communications, 299 (1970)
- HAYASHI, T.; KAKISAWA, H.; HSU, H.Y.; CHEN, Y.P.: Structure of Miltirone, a new diterpenoid Quinone. J Chem Soc, 299 (1970)
- HERSCHMANN; H.R.: Prostaglandin synthase 2, Biochim. Biophys. Acta. **1299**, 125-140, (1996)

- HONDA, G.; KOEZUKA, Y; TABATA, M.: Isolation of an antidermatophytic substance from the root of *Salvia miltiorrhiza*. Chem. Pharm. Bull. **36**, 408-411 (1988)
- HUANG, K.C.: The pharmacology of chinese herbs. CRC Press, Boca Raton Ann Arbour London Tokyo (1993)
- HUANG, X.L.; YANG, B.J., HU, Z.B.: Studies on the active principle of *Salvia miltiorrhiza* Searching for plant resources containing tanshinon Ila. Acta Bot. Sin. **23**, 70-71 (1981)
- HUANG, Y.-T.; LIN, H.-C.; LEE, T.-Y.: Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* administration on cirrhotic rats. Hepatology **32**, 551A (2000)
- IKESHIRO, Y.; MASE, I.; TOMITA, Y.: Abietane type diterpenoids *Salvia miltiorrhiza*. Phytochemistry **28**, 3139-3141 (1989)
- JI, X.-Y.; TAN, B.; ZHU, Y.-Z.: *Salvia miltiorrhiza* and ischemic diseases. Acta Pharmacologica Sinica **21**, 1089-1094 (2000)
- JIANG, W.D.; YU, Y.Z.; LIU, W.W.; CHEN, Y.H.; WANG, Y.P.; HUANG, T.C; Effects of sodium Tanshinone IIA sulfonate and propranolol on coronary collaterals in infarcted dogs. Acta Pharmacol Sin **2**, 29-33 (1981)
- KAKISAWA, H.; HAYASHI, T.; HANDA, T.; OHASHI, M.; HSU, H.Y.; CHEN, Y.P.: Structure of salviol, a new phenolic diterpene. J Chem Soc [D], 542-542 (1971)
- KAKISAWA, H.; HAYASHI, T.; OKAZAKI, I.; OHASHI, M.: Isolation and structure of new Tanshinones. Tetrahedron Lett, 3231-3234 (1968)
- KAKISAWA, H.; HAYASHI, T.; YAMAZAKI, T.: Structures of Isotanshinones. Tetrahedron Lett, 301-304 (1969)
- KAKISAWA, H.; INOUE, Y.: Total synthesis of Tanshinone I Tanshinon II and cryptotanshinon. Chem. Commun. 1327 (1968)

- KAKISAWA, H.; TATEISHI, M.; KUSUMI, T.: Synthesis of tanshinone Ila and cryptotanshinone. *Tetrahedron Lett.* 3783-3786 (1986)
- KIUCHI, S.; IWAKAMI, S.; MASAOKI, S.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U.: Inhibition of prostaglandin and leukotrien biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 387-391 (1992)
- KNAPP, S.; SHARMA, S.: Synthesis of the naturally occurring antioxidant Rosmariquinone. *J. Org. Chem.* **50**, 4996-4998 (1985)
- KONG, D.Y.; LIU, X.J.: Structure of Dihydroisotanshinone I from Dan Shen. *Acta Acad Med Primae Shanghai* **10**, 313-315
- KONG, D.Y.; LIU, X.J.: Studies on chemical components of „Dan Shen“. *Acta Pharm Sin* **19**, 755-759 (1984)
- KONG, D.Y.; LIU, X.J.; TENG, M.K.; RAO, Z.H.: The structure of Dan Shen spiroketallactone of Dan Shen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Acta Pharm Sin* **20**, 747-751 (1985)
- KUHL, P.; SHILOH, R.; IHA, H.; MURAWSKI, U.; ZILLIKEN, F.: 6,7,4'-Trihydroxyisoflavan: A potent and selective inhibitor of 5-lipoxygenase in human and porcine blood leukocytes, *Prostaglandins* **28**, 783-804 (1984)
- KUSUMI, T.; OOI, T.; HAYASHI, T.; KAKISAWA, H.: A diterpenoid phenalenone from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* **24**, 2118-2120 (1985)
- LEE, A.R.; WU, W.L.; LIN, H.C.; KING, M.L.: Isolation and bioactivity of new Tanshinones. *J Nat Prod* **50**, 157-160 (1987)
- LEE, J.; LI, J.-H.; OYA, S.; SNYDER, J.K.: Asymmetric synthesis of Tanshindiol A. *J. Org. Chem.* **57**, 5301-5312 (1992)
- LEE, J.; SHAN, H.M.; SNYDER, J.K.: Synthesis of Miltirone by an ultrasound-promoted Cycloaddition. *J. Org. Chem* **55**, 5013-5016 (1990)

- LEE, J.; SNYDER, J.K.: Ultrasound-promoted Diels-Alder Reactions: Syntheses of Tanshinone IIA, Nortanshinone, and (\pm)-Tanshindiol B. J. Am. Chem. Soc. **111**, 1522-1524 (1989)
- LI, F.; GU, D.-X.; CAO, Z.-Z.; SHI, J.-M.: Nicergoline and *Salvia miltiorrhiza* in treating acute cerebral infarction. Zhongguo Xinyao yu Linchuang Zazhi **19**, 261-263 (2000)
- LI, H.-B.; CHEN, F.: Preparative isolation and purification of six diterpenoids from the Chinese medical plant *Salvia miltiorrhiza* by high speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography **925**, 109-114 (2001)
- LI, L.N.: Water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* and related plants. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences **6**, 57-64 (1997)
- LI, L.N.; TAN, R.; CHEN, W.M.: Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza*. Planta Med **50**, 227-228 (1984)
- LIN, H.-C.; CHANG, W.-L.: Diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. Phytochemistry **53**, 951-953 (2000)
- LIN, H.-C.; DING, H.-Y.; CHANG, W.-L.: Two new fatty diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. J. Nat. Prod. **64**, 648-650 (2001)
- LIN, L.Z.; WANG, X.M.; HUANG, Y.; YANG, B.J.: A new diterpenoid Quinone dehydromiltirone. Acta Pharm Sin **23**, 273-275
- LIN, X.; YE, R.; WANG, Y.-X.: Carnitine in treatment of acute cerebral infarction. Zhongguo Xinyao yu Linchuang Zazhi **20**, 121-122 (2001)
- LIU, G.-T.; Zhang T.-M.; WANG, B.-E.; WANG, Y.-W.: Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. Biochemical Pharmacology **43**, 147-152 (1992)
- LIU, J.; SHEN, H.M.; ONG, C.N.: Role of intracellular thiol depletion, mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in *Salvia*. Life Sciences **69**, 1833-1850 (2001)

- LIU, J.; SHEN, H.M.; ONG, C.N.: *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG₂ cells. *Cancer Letters* **153**, 85-93 (2000)
- LIU, J.; YANG, C.F.; WASSER, S.; SHEN, H.M.; TAN, C.E.L.; ONG, C.N.: Protection of *Salvia miltiorrhiza* against aflatoxin-B1-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats: Dual mechanisms involved. *Life Sciences* **69**, 309-326 (1999)
- LIU, J.; ZAPP, J.; BECKER, H.: Comparative phytochemical investigation of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia triloba*. *Planta Medica* **61**, 453-455 (1995)
- LO, A.C.T.; CHAN K.; YEUNG J.H.K.; WOO K.S.: The effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **17**, 257-262 (1992)
- LUO, H.W.; CHEN, S.X.; LEE, J.N.; SNYDER, J.K.: Epi-danshenspiroketal from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* **27**, 290-292 (1988)
- LUO, H.W.; HU, X.; WANG, N.; JI, J: Platelet aggregation inhibitors from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Acta Pharmaceutica Sinica* **23**, 830-834 (1988)
- LUO, H.W.; SHENG, L.S.; ZHANG, S.Q.; XU, L.F.; WIE, P.: Tanshinones: antimicrobial agents-bile excretion and biotransformation in rat liver. *Acta Pharm Sin* **18**, 1-6 (1983)
- LUO, H.-W.; WU B.-J.; WU M.-Y.; YONG, Z.-G.; NIWA, M.; HIRATA, Y.: Pigments from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* **24**, 815-817 (1985)
- LUO, H.W.; WU B.-J.; WU M.-Y.; YONG, Z.-G.; NIWA, M.; HIRATA, Y.; Isolation and structures of danshenxinkun D. *Acta Pharm Sin* **20**, 542-544 (1985)
- LUO, H.W.; WU B.-J; YONG, Z.G.; JIN, Y.: Tanshinlactone, a novel secoabietanoid from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3166-3168 (1986)

- MACLOUF, J.; GRASSI, J.; PRADELLES, P.; Development of enzyme-immunoassay techniques for the measurement of eicosanoids, Prostagl. Lipid. Met. Rad. Inj., 355-364 (1987)
- MAYATEPEK, E.; HOFFMANN, G.F.; Leukotrienes: biosynthesis, metabolism and pathophysiologic significance, *Pediatr. Res.* **37**, 1-9, (1995)
- MÜLLER, M.J.; Der Leukotriensignalweg-ein vielversprechender Ansatzpunkt für Inhibitoren in der Therapie entzündlicher Erkrankungen, *Pharmazie in unserer Zeit* **24**, 264-272 (1995)
- MURAKAMI, S.; KIJIMA, H.; ISOBE, Y.; MURAMATSU, M.; AIHARA, H.; OTOMO, S.; LIAN-NIANG, L.; CHUN-BO, A.: Effects of Salvianolic Acid A, a despide from roots of *Salvia miltiorrhiza*, on Gastric H⁺, K⁺-ATPase. *Planta Medica* **56**, 360-363 (1990)
- NAKANISHI, T; MIYASAKA, H.; NASU, M; HASHIMOTO, H; YONEDA, K.: Production of Cryptotanshinone and Ferruginol in cultured cells of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* **22**, 721-722 (1983)
- NAKAO, H.; FUKUSHIMA, T.: Chemical composition of *Salvia miltiorrhiza*. *Yakugaku Zasshi* **54**, 844-858 (1934)
- NAN, J.-X.; PARK, E.-J.; KANG, H.-C.; PARK, P.-H.; KIM, J.-Y.; SOHN, D.H.: Anti-fibrotic effects of a hot water extract from *Salvia miltiorrhiza* roots on liver fibrosis induced by biliary obstruction in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**, 197-204 (2001)
- OKUMURA, Y.; KAKISAWA, H.; KATO, M.; HIRATA, Y.: Structure of Tanshinone II. *Bull Cem Soc Jpn* **34**, 895-897 (1961)
- ONITSUKA, M.; FUJIU, M.; SHINMA, N.; MARUYAMA, H.B.: New platelet aggregation inhibitors from Tan-Shen; Radix of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1670-1675 (1983)

- PETERS-GOLDEN, M.: Molecular mechanisms of leukotriene synthesis: the changing paradigm. *Clinical and Experimental Allergy* **28**, 1059-1065 (1998)
- REININGER, E.; Vergleichende phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme mit Arzenidrogen der chinesischen Medizin, insbesondere *Platycodi radix* und *chaenomelis fructuts*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2001)
- RENYU, S.; AIKUN, W.; YIZHAO Y.; HONG, Z.: The role of activated neutrophils and free radical in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Chinese Medical Sciences Journal* **8**, 15-19 (1993)
- RESCH, M.: Zur Inhaltsstoffführung und antiphlogistischen Wirkung der Rhizome von *Atractylodes lancea* und verwandter Arten, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1998)
- RIMPLER, H. (Hrsg.); Biogene Arzneistoffe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart (1999)
- RODRIQUEZ-HAHN, L.; ESQUIVEL, B.; CARDENAS, J.; RAMAMOORTHY, T.P.: The distribution of Diterpenoids in *Salvia*. *Advances in labiate Science*, 335-339, (Hrsg.: Harley R.M, Reynolds T.), The Royal Botanic Gardens Kew, Richmond, Surrey, UK (1992)
- ROSEN, H.; GORDON, S.: Surface events in polymorphonuclear leucocyte activation: insight from a hydrophobic membrane antigen that triggers the respiratory burst. *Journal of Cell Science* **88**, 591-601 (1987)
- RYU, S.J.; NO, Z.; KIM, S.H.; AHN, J.W.: Two novel abietane diterpene from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **63**, 44-46 (1997)
- RYU, S.J.; OAK, M.H.; KIM, K.M.: Inhibition of mast cell degranulation by Tanshinones from the roots of *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **65**, 654-655 (1999)

- RYU, S.Y.; LEE, C.O.; CHOI, S.U.: In vitro cytotoxicity of Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **63**, 339-342 (1997)
- SAMUELSSON, B.: Leukotrienes: Mesiators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568-575 (1983)
- SERHAN, C.N.; HAEGGSTROM, J.Z.; LESLIE C.C.: Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of Cytokines. *FASEB* **10**, 1147-1158 (1996)
- SHARMA; J.N., SRIVASTAVA, K.C., GAN, E.K.: Supressive effects og eugenol and oil on arthritic rats. *Pharmacology* **49**, 314-318 (1994)
- SKÖLDSTAM, L.; BÖRJESSEN, O.; KJÄLLMAN, A.; SEIVING, B.; ÅKESON, B.: Effect of six month og fish oil supplementation in stable rheumatoid arthritis. A double blind, controlles study. *Scand. J. Rheumatol.* **21**, 178-185 (1992)
- SPAETHE, S.M.; SCAIFE, C.L.; PECHOUS, P.A.; VAN ALSTYNE, E.L.: Effects of age on Leukotriene B₄ production in guinea pig whole blood. *Biochemical Pharmacology* **43**, 837-843 (1992)
- STEINHILBER D.: 5-Lipoxygenase: A target for antiinflammtory drugs revisited. *Current Medicinal Chemistry* **6**, 71-85 (1999)
- 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)
- SUN, F.F.; McGUIRE, J.C.; MORTON, J.J.; SPRECHER, H.; KUNAU, W.-H.: Inhibition of platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase by acetylenic compounds. *Prostaglandins* **21**, 333-343 (1981)

- TAKEO, S.; TANONAKA, K.; HIRAI, K.; KAWAGUCHI, K.; OGAWA M.; YAGI, A.; FUJIMOTO, K.: Beneficial effect of Tan-Shen, an extract from the root of *Salvia*, on post-hypoxic recovery of cardiac contractile force. *Biochemical Pharmacology* **40**, 1137-1143 (1990)
- TAKIURA, K.; KOIZUMI, K.: Components of the Chinese drug Tanshin. IV. The structure of Tanshinone IIA. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **10**, 112-116 (1962)
- TENG, M.K.; RAO, Z.H.; KONG, D.Y.; LIU, X.J.: Crystal and molecular structure of Danshen spiroketal lactone (crystal IX). *Zhong-guo Kexue Jishu Daxue Xuebao* **15**, 92-99 (1985)
- TIAN, G.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; YANG, F.; ITO, Y.: Separation of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Journal of Chromatography A* **904**, 107-111 (2000)
- TOMITA, Y.; ANNAKA, M.; IKESHIRO, Y.: Biosynthesis of the abietane type diterpene ferruginol in cell cultures of *Salvia miltiorrhiza*: synthesis of (15S)-and (15R)-(¹⁶⁻²H₁)-12-O-methylferruginol by enzym resolution of 12-O-methyl-16-hydroxyferruginol and stereochemistry of 1,2-methyl migration in the formation of the isopropyl group. *J Chem Soc Chem Commun*, 108-110 (1983)
- UEDA, N.; KANEKO, S.; YOSHIMOTO, T.: Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J. Biol. Chem.* **261**, 7982-7988 (1986)
- VASAGNE-TUOMINEN, M.; PERERA-IVARSON, P.; SHEN, J.; BOHLIN, L.; ROLFSEN, W.: The fern *Polypodium decumanum* used in the treatment of psoriasis, and its fatty acids constituents as inhibitors of leukotrien B₄ formation, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids* **50**, 279-284 (1994)
- VON WESSELY, F.; WANG, S.: Über einen neuartigen natürlichen Chinonfarbstoff aus der Klasse eines Phenanthrofurans. *Chem Ber* **73**, 19-24 (1940)

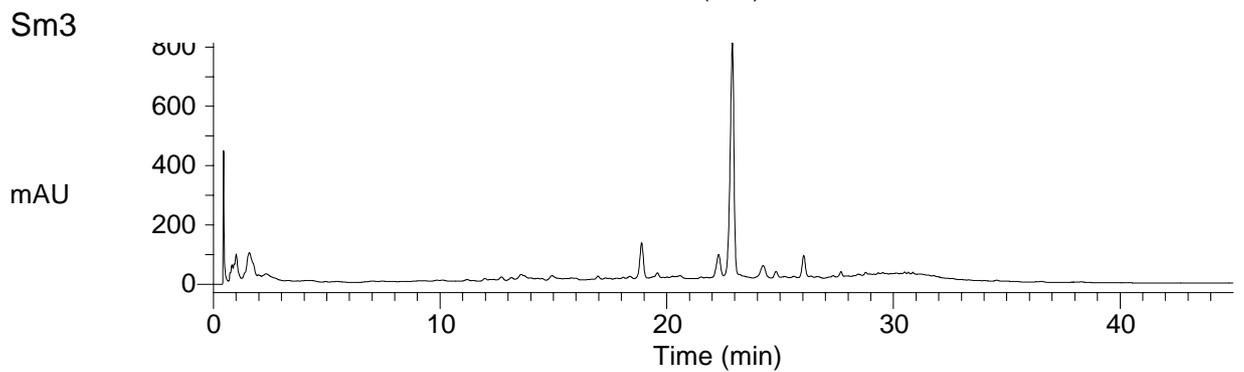
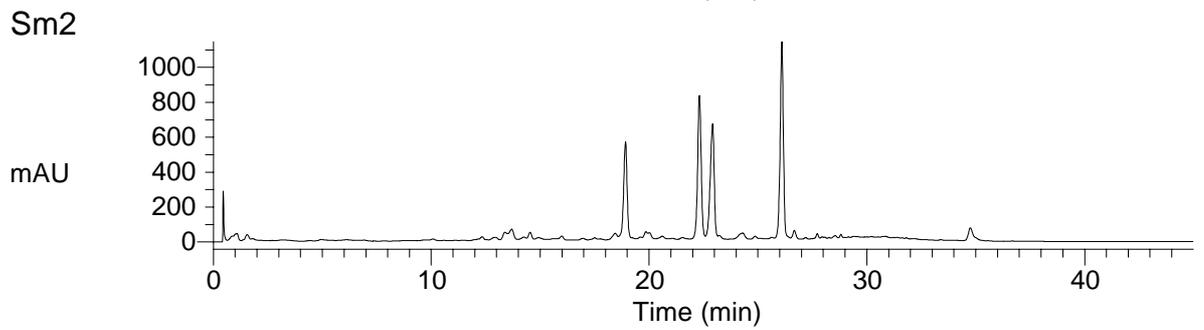
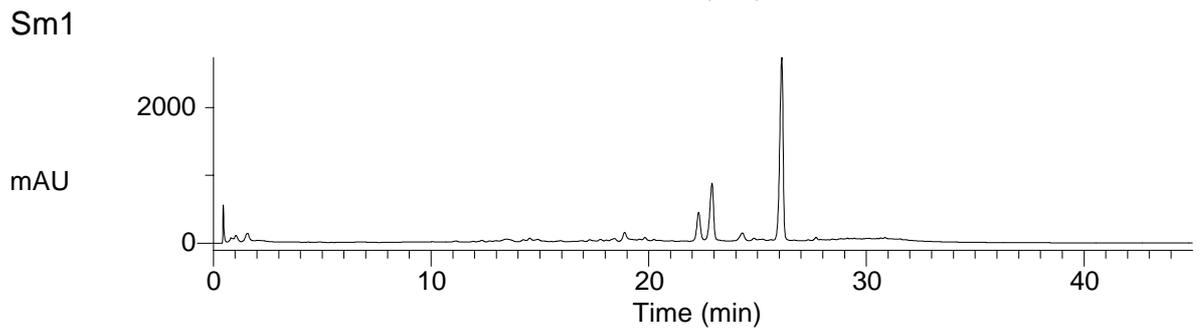
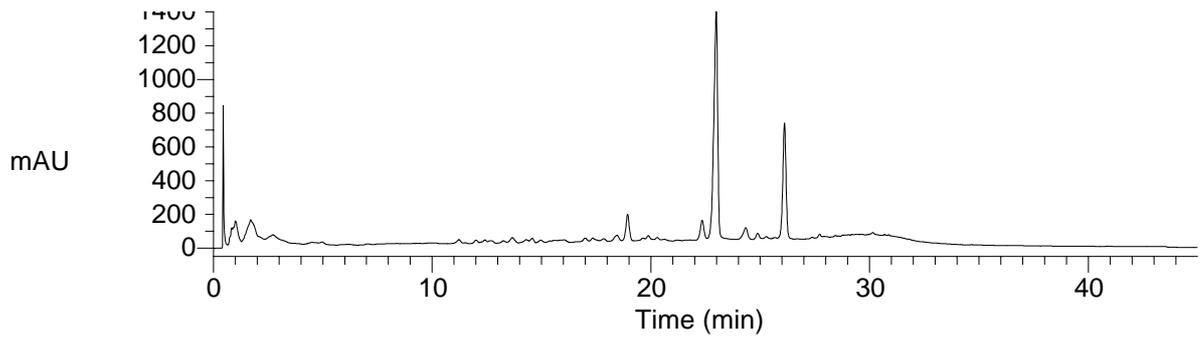
- WAN, A.; TANG, H.; SHEN, J.; CUI, G.; CUI, C.: Effects of injectio *Salvia miltiorrhiza* on gentamicin ototoxicity-induced activity of nitric oxide synthase in cochlear stria vascularis of guinea pig. *Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi* **17**, 89-92 (2001)
- WANG, N.; LUO, H.-W.; NIWA, M.; JI, J.: A new platelet aggregation inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica* **55**, 390-391 (1989)
- WANG, X.M.; Preliminary comparison of the quality between *Salvia paramiltiorrhiza* f. *purpureo-rubra* and *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Chin Pharm Bull* **16**, 8-9 (1986)
- WANG, Y.P.; CHEN, Y.H.; XU, D.Z.; JIANG, W.D.; Effects of Tanshinone IIA sodium sulfonate an the hemodynamics and extent of myocardial infarct in the coronary occluded dogs, *Acta. Acad. Med. Primae Shanghai* **7**, 347-353 (1980)
- WANG, Z.L.; Progress in clinical and experimental studies of *Salvia miltiorrhiza* in the treatment of chronic hepatitis. *Chin. J. Integrat. Trad. West. Med.* **5**, 509-510 (1985)
- WASSER, S.; HO, J.M.; ANG, H.K.; TAN C.E.: *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* **29**, 760-71 (1998)
- WEISS, M., MIROW, N.; BIRKHAHN, A.; SCHNEIDER, M.; WERNET, P.; Benzodiazepienses and their solvents influence neutrophil granulocyte function; *Br. J. Anaesth.* **70**, 317-321 (1993)
- XIE, M.; GU Z.; CHEN, K.; ZHOU, W.; GUO, C.: Effects of Xiaoyo tablets on electrophoretic mobility of serum LDL and levels of total cholesterol and triglyceride of LDL in atherosclerotic rabbits. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* **36**, 93-95 (2001)

- XU, M.; WANG, Y.-P.; LUO, W.-B.; XUAN, L.-J.: Salvianolate inhibits proliferation and endothelin release in cultured rat mesangial cells. *Acta Pharmacologica Sinica* **22**, 629-633 (2000)
- XUE, Q.F.; DAI, S.L.; WU, Y.Q.; YUAN, S.Y.; ZHU, L.X.; LIU, C.G.; WANG, Z.Y.: Effect of ligustrazine and *Salvia miltiorrhiza* on microcirculation in the hamster cheek pouch. *Natl Med J China* **66**, 334-337 (1986)
- YAGI, A.; FUJIMOTO, K.; NIWA, T.; TANONAKA, K.; TAKEO, S.: Effect of abietane-type pigments from *Salvia miltiorrhiza* on post-hypoxic recovery of cardiac contractile force in rats. *Planta Medica* **57**, 288-289 (1991)
- YAGI, A.; FUJIMOTO, K.; TANONAKA, K.; HIRAI, K.; TAKEO, S.: Possible active components of Tan-Shen (*Salvia miltiorrhiza*) for protection of the myocardium against ischemia-induced derangements. *Planta Medica* **55**, 51-54 (1989)
- YANG, B.J.; QUIAN, M.K.; QIN, M.K.; CHEN, Z.X.: Studies of the active principle of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* BUNGE) Isolation and chemical structure of przewaquinone A and przewaquinone B. *Acta Pharm Sin* **19**, 837-841 (1981)
- YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y.; SHIMIZU, T.: A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* **387**, 620-624 (1997)
- YOKOZAWA, T.: The antihypertensive properties of danshen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Med. Aromat. Plants – Ind. Profiles* **14**, 193-195 (2000)
- PUHANI, J.: Statistik Einführung mit praktischen Beispielen, Lexika Verlag Kick, Würzburg 2001
- YOKOZAWA, T.; CHUNG, H.Y.; OURA, H.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.: Isolation of the active component having the uremic-preventive effect from *Salviae miltiorrhizae radix* extract. *Chem Pharm Bull* **36**, 316-320 (1988)

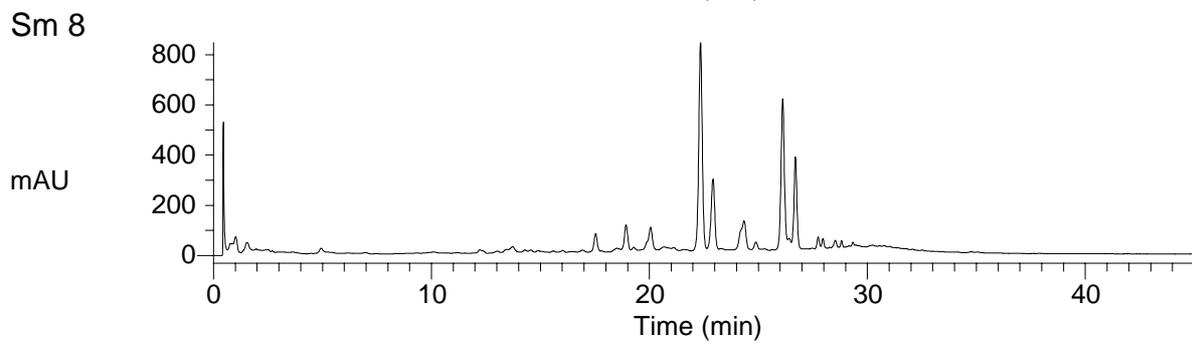
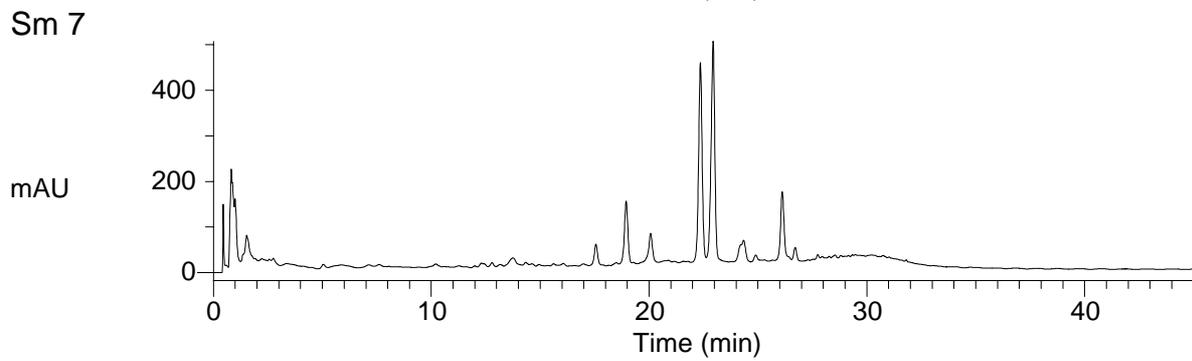
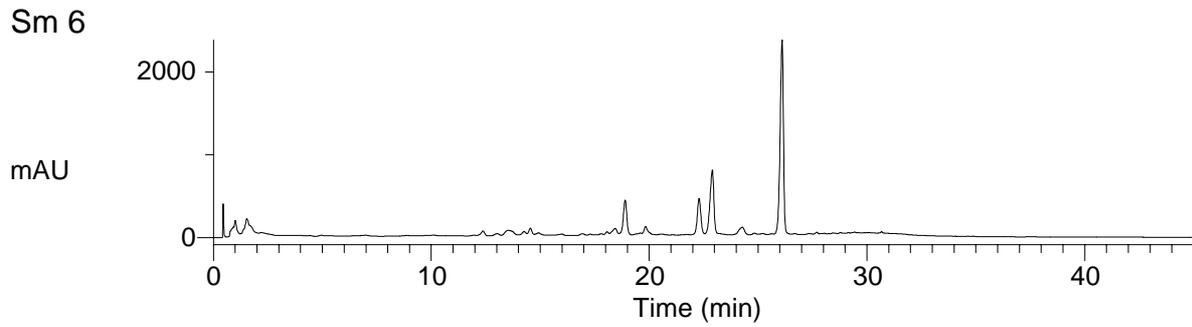
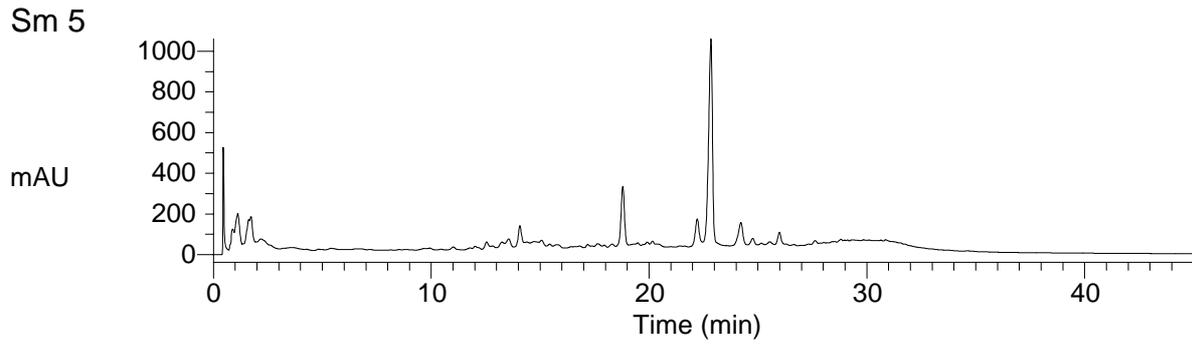
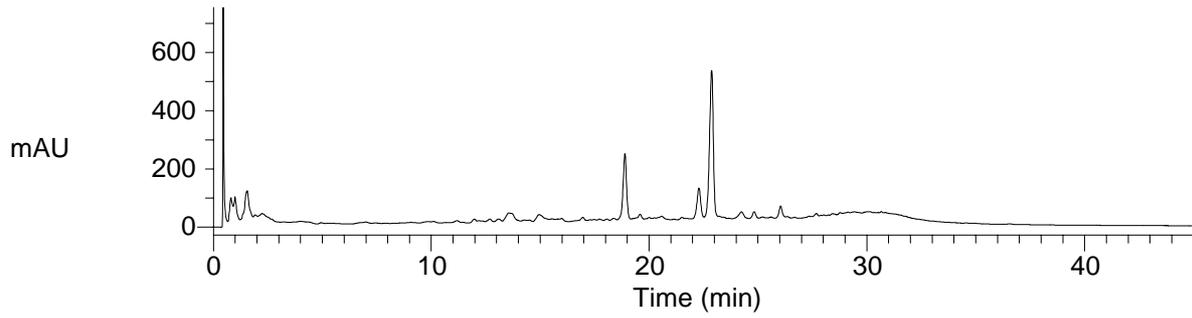
- ZHANG, D.C.; WU, C.L.; LIU, H.C.; PAN, T.C.: Studies on the water-soluble active principles in *Salvia miltiorrhiza* BUNGE. Acta Acad. Med. Primae Shanghai **7**, 384-385 (1980)
- ZHAO, B.L.; JIANG, W.; ZHAO, Y.; HOU, J.-W.; XIN, W.-J.: Scavenging effects of *Salvia miltiorrhiza* on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia-reperfusion injury. Biochemistry and Molecular Biology International **38**, 1171-1182 (1996)
- ZHU, Y.P.: Chinese Materia Medica, Chemistry, Pharmacology and Applications, Harwood academic publishers, Amsterdam (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)
- ZUPKO, I.; HOHMANN, J.; REDEI, D.; FALKAY, G.; JANICSAK, G.; MATHE, I.: Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. Planta Medica **67**, 366-368 (2001)

I Anhang

1 HPLC-Chromatogramme der n-Hexanextrakte aller untersuchten *Danshen*-Drogenmuster

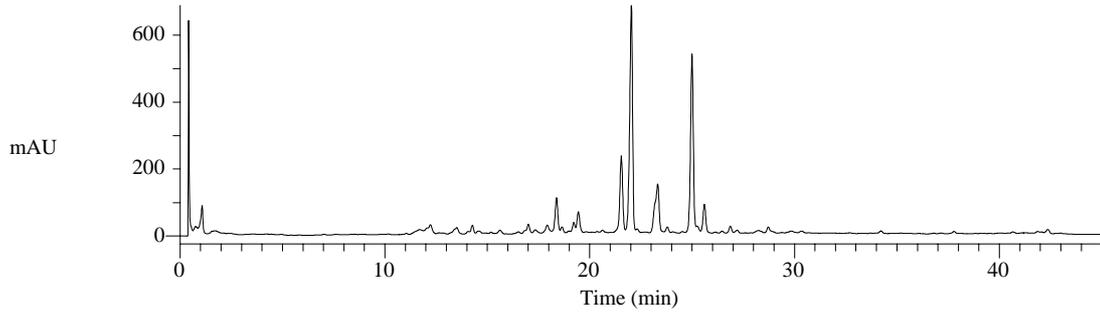


Anhang

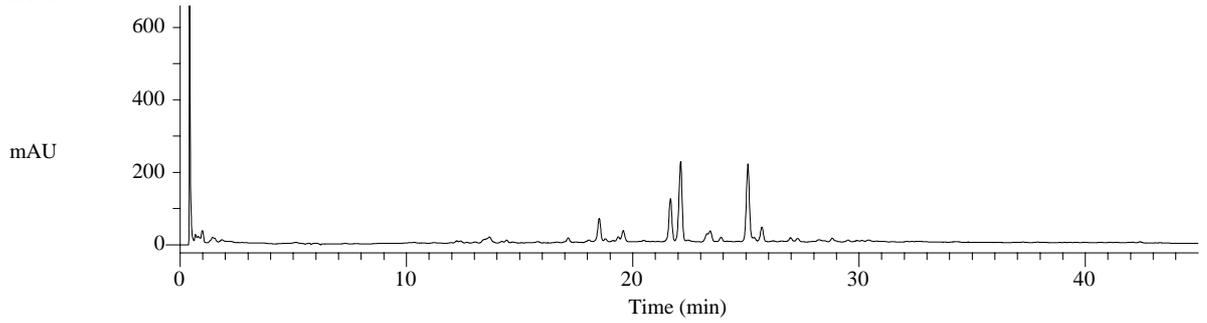


Sm9

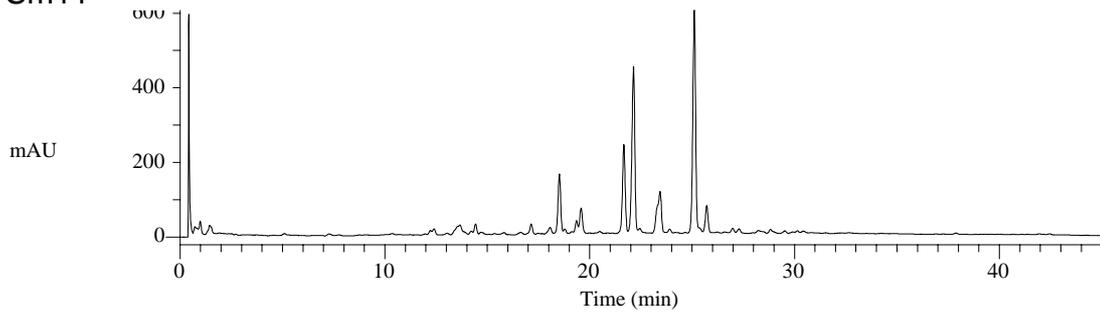
Anhang



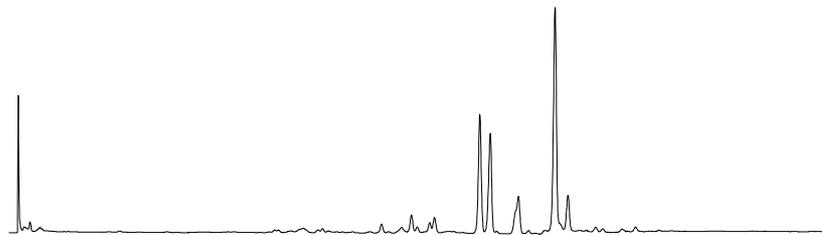
Sm10



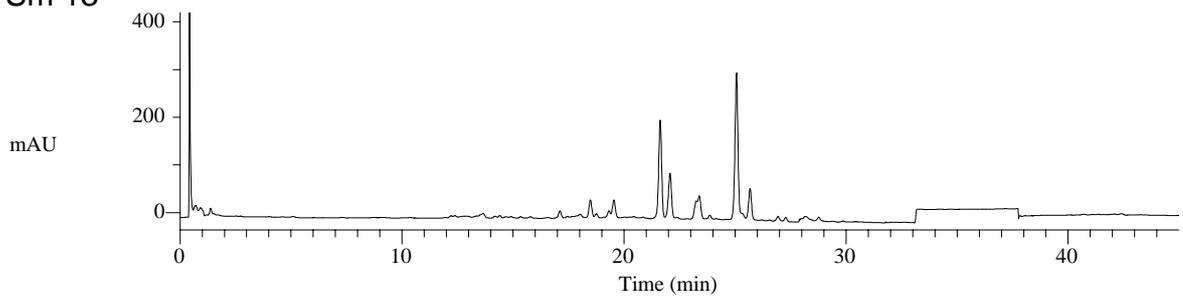
Sm11



Sm12

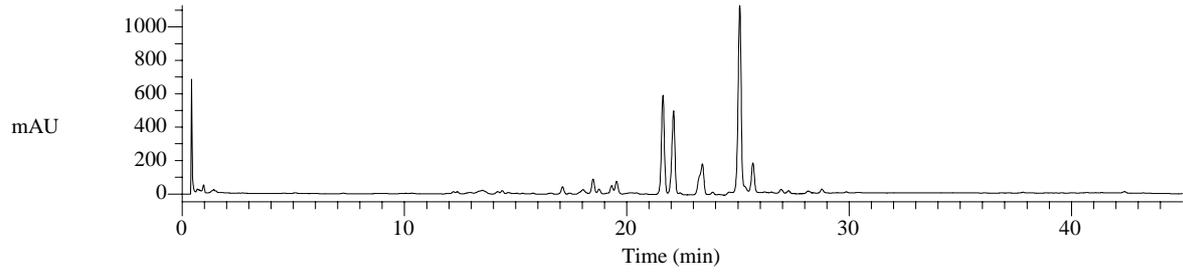


Sm 13

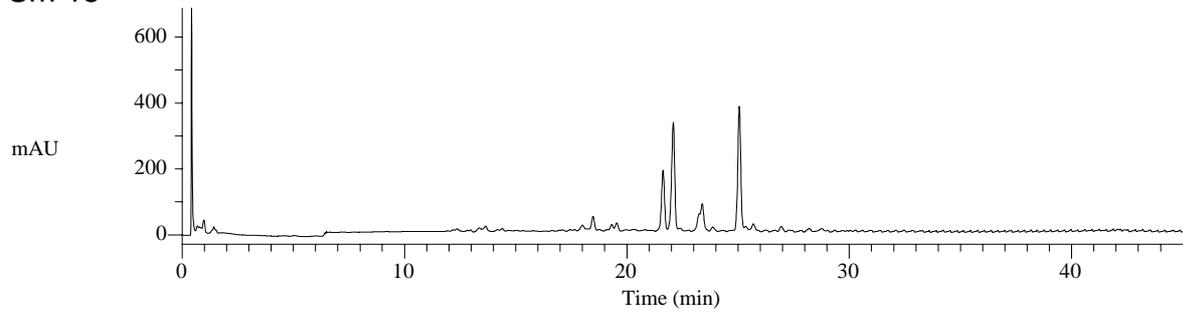


Sm 14

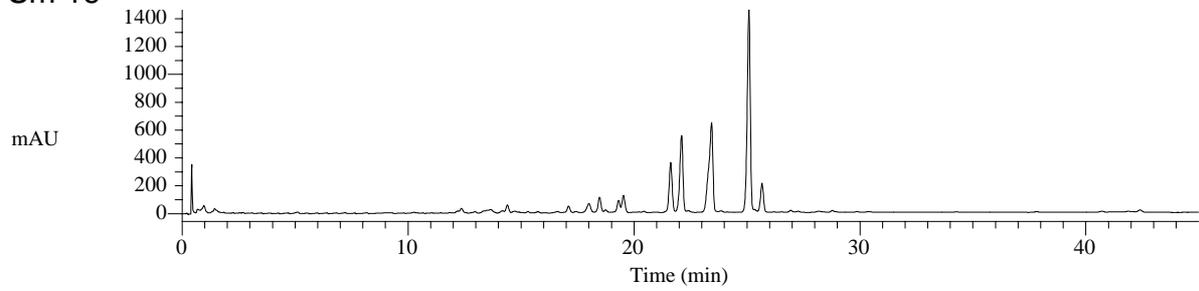
Anhang



Sm 15



Sm 16



Sm 17

DANKSAGUNG

Ich möchte allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben, an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Dr. Anne Schwarte und Dr. Birgit Dietz waren meine engsten und besten Kolleginnen. Mit Birgit teilte ich zudem Freud und Leid im Bio1-Praktikum. Ohne Anne wären die 5-LOX Tests nur halb so effektiv und auch amüsant gewesen. Vielen Dank für die konstruktive Zusammenarbeit, den engen Zusammenhalt, die gegenseitige Hilfe und nicht zu vergessen die vielen wilden und weniger wilden Abende. Danke schön für eure Freundschaft!

Dr. Marion Resch danke ich sehr herzlich für die zahlreichen Tipps und die aufmunternden Gespräche, die mir das Eingewöhnen in den Arbeitskreis sehr erleichtert haben.

Dr. Sibylle Jennings danke ich für die vielen Ratschläge zum LOX-Test, auch über mehrere 1000 km hinweg.

Dr. Jörg Heilmann danke ich für die Einführung in die pharmakologischen Arbeitsmethoden und für die Durchführung des Peroxidationstests.

Dr. Jochen Stöhr danke ich für die gemeinsame nette Praktikumsbetreuung und die Hilfe bei Computerproblemen.

Dr. Evi Reininger danke ich für die Hilfe bei der Einführung in die EIA-Technik.

Klaus Lohmann war eine große Hilfe bei allen Computerfragen. Vielen Dank auch für die vielen netten Gespräche am und ausserhalb des Instituts.

Franka Teuscher danke ich für die große Unterstützung zum Ende dieser Arbeit und für die nette gemeinsame Praktikumsbetreuung. Die zahlreichen „schwedisch-Abende“ haben mein Schwedisch zudem vor dem Vergessenwerden bewahrt.

Dr. Günter Lang und Sebastian Stöber danke ich für die nette Aufnahme am Institut und für viele aufmunternde Worte, vor allem zu Beginn dieser Arbeit.

Priv. Dozent Dr. Claus Paßreiter danke ich für viele Tipps, besonders zur Praktikumsbetreuung.

Dr. Rainer Ebel danke ich für seine nicht enden wollende Hilfsbereitschaft bei allen großen und kleinen Problemen über alle „Arbeitskreisgrenzen“ hinweg.

Jan Hiort und Gernot Brauers danke ich für die nette Zusammenarbeit und die vielen aufmunternden Gespräche. Jan und Gernot wurden nie müde, mich zu Gruppenevents einzuladen und waren sogar mit mir beim Skifahren.

Carsten Thoms danke ich für die nette gemeinsame Praktikumsbetreuung.

Priv. Dozent Dr. Thomas Schmidt danke ich für viele NMR-Tipps und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Dr. Heiko Buff danke ich für die erfolgreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit beim 5-LOX Test. Mit Heiko gelang mir auch ein wichtiger Vorstoß im Bereich der „Limetten-Forschung“.

Klaus-Dieter Jansen danke ich für seine Mithilfe bei der Isolierung der Inhaltsstoffe aus *S. miltiorrhiza*.

Dr. Friederike Stoll danke ich ganz besonders herzlich für das kritische Korrekturlesen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Friederike wurde, besonders in der Endphase der Promotion, nie müde mich immer wieder aufzumuntern und zu beruhigen. Vielen Dank auch für die schöne Zeit, besonders ausserhalb der Uni.

Dr. Robin Ghosh hat mit die Heidelberger Hütte sehr erleichtert. Vielen Dank für die nette gemeinsame Zeit, ob beim MSV oder im Graefen.

Dr. Bingui Wang danke ich ganz herzlich für die zahlreichen Übersetzungen chinesischer Literatur.

Sabine Borstel danke ich sehr herzlich für die große Unterstützung beim 5-LOX Test und für die zahlreichen Ratschläge bei den wirklich wichtigen Dingen des Lebens.

Dr. RuAngelie Errada danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Gero Eck danke ich für die aufwendige Literaturrecherche und die stets anregenden Diskussionen.

Katja Friedrich und Katrin Kohnert danke ich herzlich für die unzähligen Laborleihgaben.

Mit meiner „Landsfrau“ Bärbel Steffan hat zum Glück noch eine Saarländerin am Institut angefangen. Vielen Dank für die nette Zeit.

All meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut danke ich sehr herzlich für die wirklich nette und harmonische Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre.

Der Firma Bionorica danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Der TCM-Klinik in Kötzing danke ich für die großzügige Unterstützung des Arbeitskreises.

Prof. Dr. Alfermann und seinen Mitarbeitern danke ich herzlich für die Hilfe bei „radioaktiven“ Fragen.

Dr. W. Peters und seinen Mitarbeitern des NMR-Services, besonders Dr. Carsten Uhlemann und Dr. Sven Augner danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Mein Freund Thomas Nickels hatte unter meinen Launen und Ängsten während der Promotionszeit sicher am meisten zu leiden. Er wurde nie müde, mich immer wieder aufzubauen und zu ermutigen. Vielen Dank Tommi!

Besonders möchte ich auch meinen Eltern für Ihr Interesse und die vielen aufmunternden und motivierenden Worte während dieser Arbeit danken.

LEBENS LAUF

Name: Kerstin Paulus
Geburtsdatum: 24. Juni 1971
Geburtsort: Wadern
Eltern: Edfrid Paulus
Gerlinde Paulus, geb. Frank
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977-1981 Grundschohle Bardenbach
1981-1990 Hochwald-Gymnasium Wadern
Juni 1990 Abitur

Studium

April 1991 Beginn des Pharmaziestudiums an der
Universität des Saarlandes in Saarbrücken
September 1993 1. Staatsexamen
April 1996 2. Staatsexamen
Mai-Oktober 1996 Pharmaziepraktikum in der
Gambrinusapotheko, St. Ingbert
November 1996-Mai 1997 Pharmaziepraktikum in der
Krankenhausapotheko Ryhov, Jonkoping,
Schweden
Juni 1997 3. Staatsexamen
Approbation als Apothekerin
Juli 1997-Oktober 1997: Apothekerin in der Kaiser Friedrich Apotheko
in Mülheim/R.
November 1997-Juli 2002: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

