

**Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen
der Wurzeln von *Sophora flavescens*,
unter besonderer Berücksichtigung ihrer Wirkung auf die
Leukotrien- und Prostaglandinbiosynthese**



Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anne Schwarte

aus Geseke-Störmede

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. R. Bauer

Korreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. R. Bauer

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

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rudolf Bauer, für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis, das mir durch die Gewährung eines großen Freiraums entgegengebrachte Vertrauen und die stets wohlwollende Förderung und Unterstützung meiner Arbeit auch über die zum Ende der Arbeit entstandenen großen räumlichen Distanz Düsseldorf-Graz. Vielen Dank auch für seinen menschlichen Umgangsstil und seine prompten Korrekturleistungen, wenn die Zeit besonders knapp war.

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

Für meine Eltern

Seit frühesten Kindheit, wo man froh lacht,
verfolgt mich dieser Ausspruch magisch:
Man nehme ernst nur das, was froh macht,
nur das ernste aber niemals tragisch!

(Heinz Erhardt)

Inhaltsverzeichnis

1.	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	1
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die Leukotrienbiosynthese	4
1.3.	Zur Hemmung der Cyclooxygenasen	9
2.	ALLGEMEINES ZU <i>SOPHORA FLAVESCENS</i>	13
2.1.	Systematik	13
2.2.	Makroskopisches und mikroskopisches Erscheinungsbild der Droge	17
2.2.1.	Makroskopie	17
2.2.2.	Mikroskopische Beschreibung	18
2.3.	Prüfungen des chinesischen Arzneibuches	18
2.3.1.	Identität	18
2.3.2.	Reinheit	19
2.3.3.	Gehalt	19
2.4.	Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin	19
2.5.	Bereits bekannte Stoffe aus <i>Sophora flavescens</i>	20
2.6.	Aktueller Kenntnisstand zu Wirkungs- und Wirksamkeitsstudien von <i>Sophora flavescens</i>	25
2.6.1.	Antiarrhythmische Wirksamkeit	25
2.6.2.	Antiinflammatorische Wirksamkeit	26
2.6.3.	Antiulzerative Wirkungen	27
2.6.4.	Antiasthmatische Aktivität	27
2.6.5.	Weitere Untersuchungen an Extrakten und Inhaltsstoffen	28
2.7.	Toxizität	29
3.	EIGENE PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	30
3.1.	Chromatographische Untersuchungsmethoden	30
3.1.1.	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	30
3.1.2.	HPLC-Untersuchungen	37
3.2.	Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe von <i>Sophora flavescens</i>	44
4.	PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	48
4.1.	Auswahlkriterien von <i>Sophora flavescens</i> als 5-Lipoxygenase Inhibitor	48
4.2.	Eingesetzte Testsysteme	48
4.3.	Die Hemmung der Leukotrienbiosynthese	49
4.3.1.	Vergleichende Untersuchungen von Extrakten aus den Wurzeln von <i>Sophora flavescens</i> mit unterschiedlicher Polarität	51
4.3.2.	Zur Wirkung der einzelnen Fraktionen des Dichlormethanextraktes	52
4.3.3.	Die Wirkung der aus <i>Sophora flavescens</i> isolierten Reinsubstanzen	53

4.3.4.	Hemmwirkungen weiterer Inhaltsstoffe, die aus <i>Sophora flavescens</i> isoliert wurden	58
4.3.5.	Hemmwirkungen von Alkaloiden aus <i>Sophora flavescens</i>	59
4.3.6.	Testung chemisch synthetisch hergestellter Pterocarpanderivate	60
4.3.7.	Zytotoxizität der im 5-LOX-Test aktiven Verbindungen	61
4.4.	Die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese	62
4.4.1.	Hemmwirkungen von isolierten Reinstoffen	63
4.5.	Testungen einiger Inhaltsstoffe aus <i>Sophora flavescens</i> bezüglich ihrer antioxidativen Eigenschaften	66
4.5.1.	Dünnschichtchromatographischer Test auf radikalfangende Eigenschaften mittels DPPH-Reagenz	66
4.5.2.	Testsystem mit polymorphkernigen Granulozyten	66
4.5.3.	Wirkungen von ausgewählten Inhaltsstoffen in den eingesetzten Testsystemen auf antioxidative Eigenschaften	67
5.	ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON INHALTSSTOFFEN AUS SOPHORA FLAVESCENS	70
5.1.	Dichlormethan als Extraktionsmittel	70
5.2.	Extraktionen und wirkungsorientierte Fraktionierungen	70
5.2.1.	Isolierung und Strukturaufklärung von Pterocarpanderivaten	73
	Identifizierung von PT1 (Maackiain)	73
	Identifizierung von PT2 (Medicarpin)	78
	Identifizierung von PT3 (Anhydrovariabilin)	82
5.2.2.	Isolierung und Identifizierung der Flavanone	86
	Identifizierung von FL1 (Sophoraflavanon B)	89
	Identifizierung von FL2 (Exiguaflavanon K)	93
	Identifizierung von FL3 (Kushenol E)	99
	Identifizierung von FL4 (Kushenol B)	104
	Identifizierung von FL5 (Sophoraflavanon G)	110
	Identifizierung von FL6 (Kurarinon)	115
	Identifizierung von FL7 (Isokurarinon)	120
	Identifizierung von FL8 (2'-Methoxykurarinon)	124
	Identifizierung von FL9 (Kushenol A)	127
	Identifizierung von FL10 (Norkurarinol)	133
	Identifizierung von FL11 (Kushenol P)	138
	Identifizierung von FL12 (Kushenol I)	141
	Identifizierung von FL13 (Kushenol M)	145
	Identifizierung von FL14 (Biochanin A)	149
5.2.3.	Isolierungen und Strukturaufklärung von Chalkonen und weiteren Inhaltsstoffen	151
	Identifizierung von CH1 (Kushenol D)	151
	Identifizierung von CH2 (Kurardin)	156
	Identifizierung von CH3 (Kushenchroman A)	158

Identifizierung von CU1 (3,6-Dihydroxycumarin)	165
6. DISKUSSION	169
7. ZUSAMMENFASSUNG	180
8. EXPERIMENTELLER TEIL	183
8.1. Herkunft des untersuchten Pflanzenmaterials	183
8.2. Referenzsubstanzen und im 5-Lipoxygenase-Test untersuchte Vergleichsverbindungen	184
8.3. Chromatographische Methoden	184
8.3.1. Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)	184
8.3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie (DC)	184
8.3.3. Offene Säulenchromatographie (SC)	187
8.3.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	188
8.3.5. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)	190
8.3.6. Vakuumflüssigchromatographie (VLC)	192
8.4. Spektroskopische und physikalische Methoden	192
8.4.1. UV-Spektroskopie	192
8.4.2. IR-Spektroskopie	192
8.4.3. Massenspektroskopie (MS)	192
8.4.4. LC-MS	193
8.4.5. GC-MS	194
8.4.6. NMR-Spektroskopie	194
8.4.7. Optische Drehung	195
8.4.8. Circular dichroismus (CD)	195
8.5. Spezielle Arbeitsmethoden	196
8.5.1. Soxhletextrakte für pharmakologische Testungen und analytische Identitätsprüfungen	196
8.5.2. Wässrige Extrakte	196
8.5.3. Soxhletextrakte zur Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Sophora flavescens</i> radix	197
8.6. Fraktionierung des Extraktes und wirkungsorientierte Isolierung von Inhaltsstoffen	197
8.6.1. Phytochemische Untersuchung der Fraktion II	199
8.6.2. Weitere Auftrennung der Fraktion III	200
8.6.3. Isolierung der Inhaltsstoffe aus Fraktion IV	201
8.6.4. Die Aufarbeitung der Fraktion V	201
8.6.5. Auftrennung der Fraktion VI	201
8.6.6. Die Fraktion VII und ihre Inhaltsstoffe	202
8.6.7. Isolierung der Flavonoide aus Fraktion VIII	202
8.7. Gehaltsbestimmungen der Hauptinhaltsstoffe aus <i>Sophora flavescens</i> mittels HPLC	203
8.8. Physikalische und spektroskopische Daten isolierter Verbindungen	204
8.9. Pharmakologische Arbeitsmethoden	214

8.9.1.	Der 5-Lipoxygenase-Test	214
8.9.2.	Zytotoxizitätstest mit isolierten Leukozyten aus Schweineblut	222
8.9.3.	Der Cyclooxygenasetest	222
8.9.4.	DC-Untersuchung auf radikalfangende Eigenschaften mittels DPPH-Reagenz	224
8.9.5.	Chemilumineszenz-Test mit polymorphkernigen Granulozyten	225
9.	LITERATURVERZEICHNIS	228
10.	ANHANG	239

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CD	Circulardichroismus
CH	Chalkon
CI	Chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy (NMR-Methode)
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
CU	Cumarin
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI-MS	Massenspektroskopie mit Probendirekteinlass und chemischer Ionisation
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer (NMR-Methode)
DMSO-d ₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Reagenz
EI	Elektronenstoßionisation (MS-Methode)
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ESI	Elektrospray Ionisierung (LC-MS)
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardment (MS-Methode)
FL	Flavanon bzw. Flavanonol
FMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (NMR-Methode)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IR	Infrarotspektroskopie
LC-MS	Einsatz der Massenspektroskopie nach vorausgegangener HPLC
5-LOX	5-Lipoxygenase
LTB ₄	Leukotrien B ₄
mAU	Milli-Absorption-Units
M _R	relative Molekülmasse
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektroskopie
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)

NOESY	Nuclear-Overhauser and Exchange Spectroscopy (NMR-Methode)
OTC	„over the counter“
PT	Pterocarpan
RDA	Retro-Diels-Alder
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
R _f	Retentionsfaktor (DC)
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NMR-Methode)
RP-18	Reversed phase (Umkehrphase mit durchschnittlicher Kettenlänge C-18)
RT	Retention time (Retentionszeit HPLC)
SC	offene Säulenchromatographie
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TIC	Total Ion Current
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	Visuelles Licht (Tageslicht)
VLC	Vakuum-Flüssig-Chromatographie
VS	Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

1. Einführung in die Thematik

1.1 Einleitung

Entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Bronchialasthma, Allergien, Neurodermitis und Psoriasis zählen zu den häufigsten Gesundheitsstörungen in den Industrieländern, und es werden enorme finanzielle Summen für ihre Behandlung aufgewendet. Ca. 60 % der Verordnungen zur Behandlung dieser Krankheiten und 20 % aller abgegebenen OTC-Arzneimittel fallen in die Kategorie der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR), also Arzneistoffen, für die als Wirkmechanismus in erster Linie die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese angegeben wird. Prostaglandine sind Metabolite des Eicosanoidstoffwechsels und werden u.a. nach der Einwirkung von Noxen freigesetzt. Sie bewirken u.a. eine höhere Empfindlichkeit der schmerzleitenden Nervenfasern und sind bei der Entstehung von Entzündungen beteiligt. Durch eine Verminderung ihrer Biosynthese wirken die NSAR analgetisch und entzündungshemmend.

In Mitteleuropa leiden etwa 5 % der Menschen an Asthma. Bei dieser entzündlichen Erkrankung der Atemwege wird durch vielerlei Stimuli eine Hyperreaktivität der Bronchien ausgelöst und es kommt zur anfallsweise auftretenden Atemwegsobstruktion. Bei Kindern ist Asthma die häufigste chronische Krankheit (SALVI, 2001). Bei der Therapie asthmatischer Erkrankungen sind Glucocortikoide und β_2 -Sympathomimetika die Mittel der ersten Wahl. Da die Therapie meist über Jahre hinweg erfolgen muss, kann es zu schweren unerwünschten Wirkungen kommen. Das Ziel aktueller Forschungen für diese Indikation ist es daher, neue Arzneistoffe mit anderen Angriffspunkten zu finden. Nach der Entdeckung der Leukotriene versuchte man, diese Mediatoren durch Blockade ihrer Rezeptoren in ihrer Wirkung zu hemmen. Leukotriene steigern die Produktion proinflammatorischer Zytokine und sind in der Lage durch Aktivierung von Entzündungszellen wie Granulozyten und Makrophagen den Entzündungsprozess voranzutreiben. Die Leukotriene C_4 , D_4 und E_4 haben bronchokonstriktorische Aktivität und Bedeutung bei der Auslösung von Asthma. Bisher wird in Deutschland das Fertigarzneimittel Singulair[®] (Montelukast) therapeutisch eingesetzt. Weitere

Fertigarzneimittel, wie Accolate[®] (Zafirlukast) und Onon[®] (Pranlukast) wurden bereits in anderen EU-Ländern und Japan zugelassen.

Ein weiterer neuer Ansatzpunkt in der Asthmatherapie ist die Unterbindung der Leukotrienbiosynthese durch eine Hemmung der 5-Lipoxygenase, das Enzym, welches für die Bildung der Leukotriene verantwortlich gemacht wird. Auf dem amerikanischen Arzneimittelmarkt gibt es mit Zyflo[®] (Zileuton) bereits ein zugelassenes Medikament, das eine 5-Lipoxygenasehemmung bewirkt. Allerdings ist die Therapie mit hepatotoxischen Nebenwirkungen verbunden, so dass der Einsatz des Arzneimittels mittlerweile kritisch bewertet wird.

Als Alternative zu chemisch synthetisierten Arzneistoffen bietet die Natur einen reichhaltigen Schatz an Substanzen, die potentiell derartige Wirkmechanismen haben können. Durch Untersuchung von Arzneipflanzen der traditionellen Medizin besteht die Möglichkeit und Chance, gezielt nach solchen Stoffen zu suchen. In diesem Zusammenhang gewinnt die traditionelle chinesische Medizin (TCM) immer mehr an Bedeutung. In ihr werden Arzneidrogen eingesetzt, die in ihrer Heimat schon seit Jahrtausenden verwendet werden, so dass auf eine reichhaltige und lange Erfahrung zurückgegriffen werden kann.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, eine in China traditionell bei Asthma bronchiale und entzündlichen Erkrankungen angewendete Arzneidroge, die Wurzeln von *Sophora flavescens*, auf ihre Aktivität in einem 5-Lipoxygenase-Test zu untersuchen und ihre aktiven Inhaltsstoffe wirkungsorientiert zu isolieren und zu identifizieren. Darüber hinaus sollten die isolierten Inhaltsstoffe auch bezüglich ihrer Cyclooxygenase-1 und -2-Hemmung getestet werden, um eventuelle duale Hemmstoffe mit günstigem Nebenwirkungsprofil zu finden. Weiterhin sollten Analyseverfahren zur Qualitätsprüfung der chinesischen Wurzeldroge entwickelt werden, damit ihre Identität bei einer Anwendung in Deutschland schnell und einfach sichergestellt werden kann.

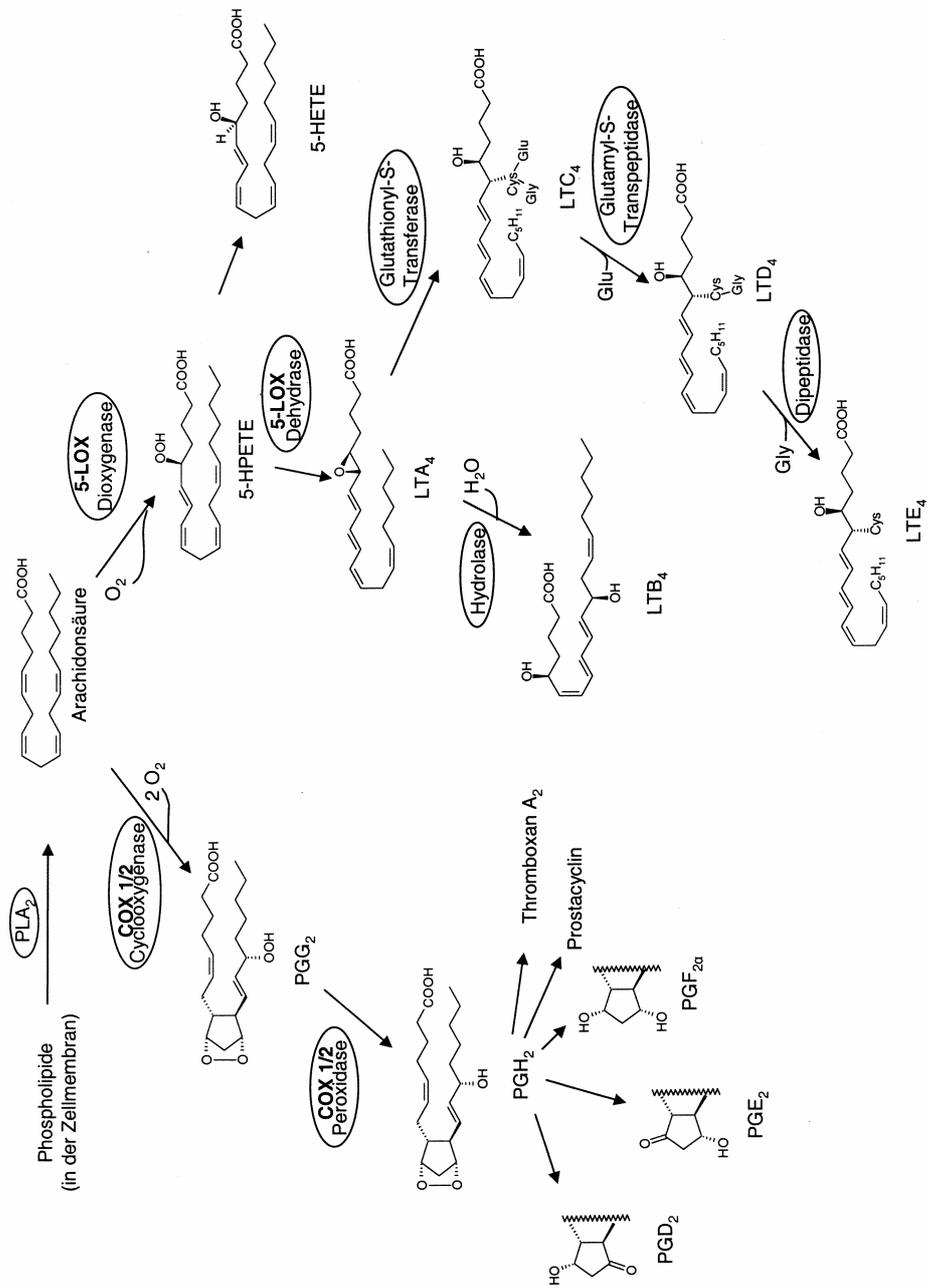


Abb. 1: Biosynthese von Prostaglandinen (PG) und Leukotrienen (LT)

1.2 Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die Leukotrienbiosynthese

Arachidonsäure wird mittels der Phospholipase A₂ aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt und kann einerseits durch die Cyclooxygenasen-1 und -2 zu Prostanoiden, andererseits durch die Lipoxygenasen zu Leukotrienen umgesetzt werden (Abb.1). Unter den im menschlichen Organismus existierenden 5- und 12-Lipoxygenasen sind besonders die aus der 5-LOX entstehenden Mediatoren, die Leukotriene B₄ - E₄, die wiederum aus dem Leukotrien A₄ entstehen, bei der Auslösung eines Asthmaanfalls von großem Interesse.

Jahre vor der endgültigen Identifizierung der Leukotriene wurde ihre Existenz als „slow-reacting factor“ erkannt (FELDBERG, 1938; KELLAWAY, 1940). Bereits 1960 gelang es BROCKLEHURST, die Freisetzung eines „slow-reacting factor“ ähnlichen Mediators nach anaphylaktischem Schock aus sensitivem Gewebe nachzuweisen. Er bezeichnete diese Substanz als „slow-reacting factor of anaphylaxis“ (kurz: SRS-A). Verbesserungen analytischer Arbeitsmethoden in den folgenden Jahren erlaubten es SAMUELSEN *et al.* (1983) das Leukotrien C₄ zu charakterisieren, das neben den Leukotrienen D₄ und E₄ Bestandteil der SRS-A ist.

Der Name „Leukotriene“ kommt daher, dass Stoffe solcher Art zum ersten Mal aus Leukozyten isoliert wurden. Das Kohlenstoffskelett der Substanzen enthält wie die Arachidonsäure vier Doppelbindungen, von denen drei konjugiert vorliegen. Die Anzahl der Doppelbindungen wird durch den Index „4“ in der Kurzbezeichnung ausgedrückt.

Die Leukotriene werden in vielen unterschiedlichen Zellen gebildet, wie basophile, neutrophile oder eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (MUTSCHLER, 2001). Sie werden aus Arachidonsäure als Substrat, mit Hilfe der 5-Lipoxygenase, sowie FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) als essentiellm Cofaktor biosynthetisiert. Daraus resultiert die 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE), die durch das gleiche Enzym und Cofaktor zum instabilen Leukotrien A₄ oder zur 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) umgesetzt wird. Die weitere Umsetzung von Leukotrien A₄ kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Einerseits ist eine enzymatische Umwandlung zum chemotaktisch und -kinetisch

wirksamen Leukotrien B₄ (LTB₄) mittels einer Hydrolase möglich, andererseits können durch Glutathionyl-Transferase und weitere Enzyme LTC₄, LTD₄ und LTE₄ gebildet werden. Die Cysteinyl-konjugierten Peptidleukotriene wirken stark bronchokonstriktorisch (etwa 1000-fach stärker als Histamin) und sind damit massiv an der Auslösung von Asthma beteiligt. Zudem haben sie vasokonstriktorische Eigenschaften (O'BRYNE, 1977; DAHLÉN, 1980; BUSSE, 1996; WENZEL, 1997; BERLIN, 1999).

Während die schwefelhaltigen Leukotriene an den CysLT₁-, CysLT₂ oder CysLT₃-Rezeptoren angreifen können, erstere finden sich in der glatten Muskulatur der Atemwege, die CysLT₂- und CysLT₃-Rezeptoren sind in pulmonalen Zellen lokalisiert (DRAZEN, 1987; TUDHOPE, 1994), erfolgt der Angriff des LTB₄ am transmembranären G-Protein gekoppelten BLT₁-Rezeptor in Leukozyten oder an BLT₂-Rezeptoren, die ubiquitär exprimiert werden. Allerdings ist die Bindungsaffinität von LTB₄ zu BLT₂-Rezeptoren wesentlich schwächer als zu BLT₁-Rezeptoren (YOKOMIZO, 1997 und 2000; SALVI, 2001; NICOSIA, 2001).

Die Leukotrienbiosynthese bietet für Arzneistoffe vier unterschiedliche Angriffspunkte:

Hemmung der 5-Lipoxygenase

Inhibition des FLAP

Angriff an den Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren

Blockade der BLT-Rezeptoren

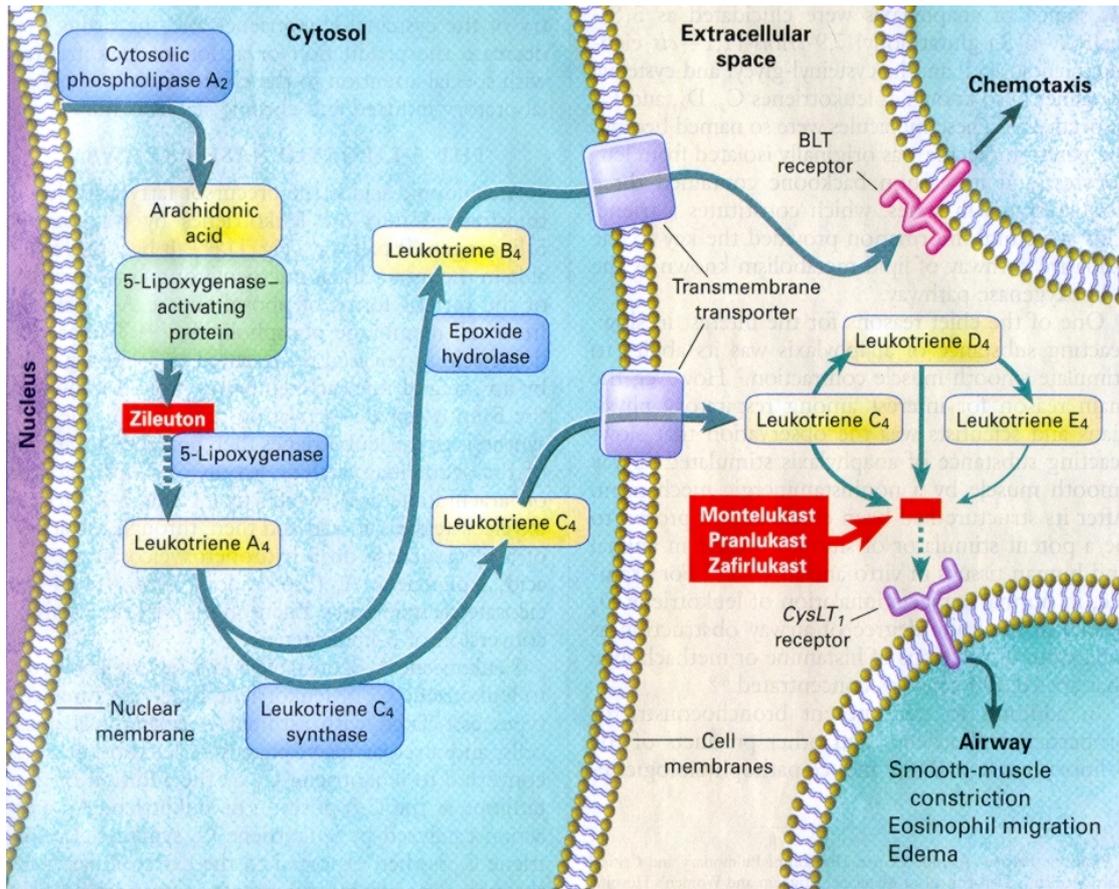


Abb. 2: Die Bildung und Wirkungen der Leukotriene sowie deren Hemmung durch Pharmaka (nach DRAZEN, 1999)

Mit der Entwicklung von Zileuton (Zyflo[®], siehe Abb. 3), einem Hydroxamsäurederivat, ist es gelungen das Eisenion der 5-Lipoxygenase zu chelatisieren und damit das Enzym zu hemmen. Somit wurde nicht nur die Bildung der Cysteinyl-Leukotriene beeinträchtigt, sondern auch die Biosynthese von LTB₄. Allerdings konnten die hochgesteckten Erwartungen, die in dieses Medikament gesetzt worden waren, nicht zufriedenstellend erfüllt werden. Nach der Zulassung durch die FDA in den USA (1997) konnte sich Zyflo[®] auf dem Arzneimittelmarkt nicht behaupten. Nach der Markteinführung kam es bei einigen Patienten zu gravierenden hepatotoxischen Nebenwirkungen. Zudem wurden mittlerweile Wechselwirkungen mit Theophyllin, Warfarin und Propranolol beobachtet. Bei einer Co-Medikation Theophyllin-Zileuton kam es zu einem signifikanten Abfall der steady-state Clearance von Theophyllin. Wurde Zileuton mit Warfarin eingenommen, zeigte sich bereits in der klinischen Phase ein Anstieg der Prothrombinzeit. In Kombination mit Propranolol bewirkte Zileuton einen Abfall der Clearance des Betablockers. In Europa wurde das Arzneimittel bisher nicht zugelassen. (ABBOTT LABORATORIES, 1998)

Eine weitere Eingriffsmöglichkeit in den Leukotrien-Signalweg besteht in der Blockade des CysLT₁-Rezeptors. Dafür gibt es bisher drei zugelassene Arzneistoffe: Montelukast, Pranlukast und Zafirlukast (Abb. 3).

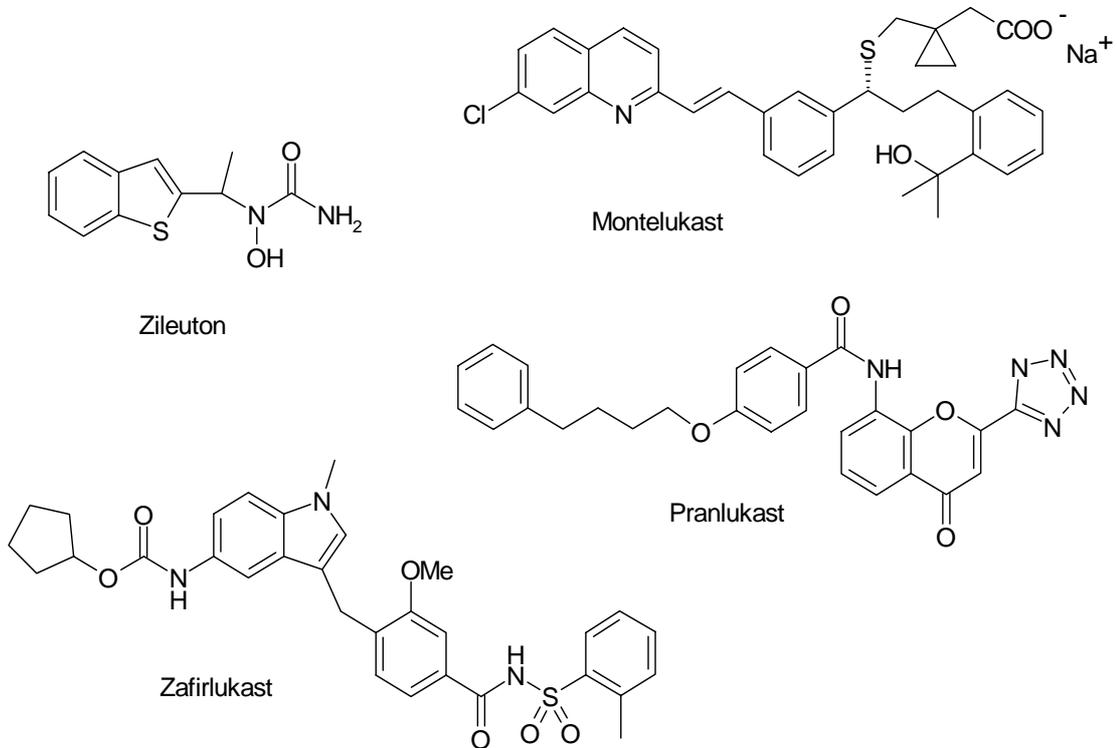


Abb. 3: Arzneistoffe, die die Leukotrienbiosynthese hemmen

Nach dem Besetzen des CysLT₁-Rezeptors durch den Antagonisten wird die durch Cysteinyl-Leukotriene ausgelöste Bronchokonstriktion, erhöhte Mukus-Produktion, Ödembildung und Schädigung des Bronchialepithels verhindert.

Seit 1996 stehen mit Zafirlukast (Accolate®) und Pranlukast (Onon®) weitere Cys-LT₁-Antagonisten zur Verfügung (bisher in einigen EU-Ländern und in Japan zugelassen).

Montelukast (Singulair®/Singulair® mini) wird als Leukotrienrezeptor-Antagonist in der Stufe 2 der Asthmatherapie (leichtes bis mittelgradiges chronisches Asthma) als „Add-on-Antiasthmatikum“ eingesetzt. Es wurde 1998 vom BfArM als Arzneimittel für Kinder ab 6 Jahren zugelassen, 2001 erfolgte eine erweiterte Zulassung sogar für Kinder ab 2 Jahren (MSD PHARMA, 1998 bzw. 2001). Damit soll besonders die täglich erforderliche Dosis der Glucocortikoide und β_2 -Sympathomimetika herabgesetzt werden. Es ist bisher in Deutschland

das einzige Fertigarzneimittel auf dem Markt, das die Leukotrienwirkungen hemmt.

Mit Iralukast, Pobilukast, Verlukast und Tomelukast wurden weitere LT-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, die sich bis dato allerdings noch in der Prüfungsphase befinden.

Tab. 1: Hemmstoffe bei der Leukotrienbildung und deren Wirkungen

LT-Rezeptor-Antagonisten

Montelukast	Singulair [®]	10 mg (zur Nacht); 5 mg als Tagesdosis für Kinder (6-14 Jahre) (jeweils 1x tägl.)	Für Kinder als Kautablette
	Singulair [®] mini	4 mg (2-5- jähr. Kinder)	
Zafirlukast	Accolate [®]	20 mg (2x tägl.)	In einigen EU-Ländern zugelassen
Pranlukast	Onon [®]	225 mg (2x tägl.)	Nur in Japan zugelassen
Iralukast			Bisher
Pobilukast			noch nicht
Tomelukast			zugelassen!
Verlukast			

5-LOX-Hemmer

Zileuton	Zyflo [®]	600 mg (4x tägl.)	Nur in USA zugelassen
----------	--------------------	-------------------	-----------------------

Neben den synthetisch hergestellten Hemmstoffen gibt es auch eine große Anzahl vielversprechender Naturstoffe, die Einfluss auf die Leukotrienbildung durch Hemmung der 5-Lipoxygenase haben.

Aus dem Gummiharz von *Boswellia serrata* konnten vor allem die Boswelliasäuren Acetyl-11-keto- β -Boswelliasäure (AKBA) und 11-Keto- β -Boswelliasäure *in vitro* als hoch potente selektive 5-Lipoxygenasehemmstoffe mit IC₅₀-Werten in unteren mikromolaren Bereich gefunden werden. Die Enzymhemmung durch die pentazyklischen Triterpene erfolgte über eine für die Inhaltsstoffe selektive Bindungsregion, die nicht mit der Substratbindungsstelle des Enzyms identisch ist (SAFAYHI *et al.*, 1995 und 1997). Auch *in vivo*

Untersuchungen bestätigten die vorangegangenen Versuchsergebnisse zur Hemmung der Leukotrienbiosynthese. So wurde im Jahre 1998 von GUPTA *et al.* eine randomisierte placebokontrollierte Doppelblindstudie mit 80 Probanden, die an Bronchialasthma erkrankt waren, durchgeführt. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurde den Patienten dreimal täglich 300 mg Gummiharz von *Boswellia serrata* bzw. Lactose verabreicht. Bei den Probanden der Wirkstoffgruppe zeigten sich signifikante Verbesserungen der Krankheitssymptome im Gegensatz zur Placebogruppe. In einer weiteren *in vivo* Studie wurden die Effekte der Boswelliasäuren gegen Sulfasalazin an 30 Patienten, die an chronischer Colitis litten, getestet. Dabei zeigte sich bei Patienten, die mit *Boswellia serrata* behandelt worden waren, eine deutliche Verbesserung der Krankheit mit minimalen Nebenwirkungen, im Gegensatz zu Sulfasalazin (GUPTA *et al.*, 2001).

Isolierte phenolische Verbindungen aus Rhizomen von *Atractylodes lancea*, wie z.B. Atractylochinon ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$), Atractylochromen ($IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$) und Atractylohydrochinon ($IC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$) erwiesen sich als hoch potente Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase (RESCH, 1999).

Aus *Angelica sinensis* Wurzeln wurden unter anderem Phenylferulat und das Polyacetylen Falcarindiol gefunden, die mit IC_{50} Hemmwerten von $5 \mu\text{M}$ bzw. $1,3 \mu\text{M}$ eine sehr starke Hemmung der 5-Lipoxygenase zeigten (ZSCHOCKE, 1997).

1.3 Zur Hemmung der Cyclooxygenasen

Die Wirkungen der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) und Antiphlogistika beruhen vor allem auf der Hemmung der Cyclooxygenasen (synonym: Prostaglandin-H-Synthasen). Die Enzyminhibition bewirkt, dass die Arachidonsäure als Substrat nicht in cyclische Endoperoxide (Prostaglandin H_2) umgesetzt werden kann und diese im weiteren Verlauf nicht in Prostaglandine (z.B. PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$), Thromboxan (TXA_2) und Prostacyclin (PGI_2) überführt werden können. Ziel bei der Schmerzhemmung ist die Unterbindung der Prostaglandinbildung. Besonders dem Prostaglandin E_2 kommt hier eine besondere Bedeutung zu, weil diese Mediators substanz die Nozizeptoren gegenüber analgetischen Einwirkungen sensibilisiert. Bei einer PGE_2 Hemmung vermindert sich die

Rezeptorempfindlichkeit gegenüber Serotonin, Histamin und damit auch die Schmerzempfindung. Außerdem können durch deren Hemmung Fieber und entzündliche Reaktionen zurückgedrängt werden. Die Prostaglandine als Gewebshormone erfüllen aber auch physiologische Funktionen, wie die Regulation des Elektrolythaushaltes der Niere oder zytoprotektive Eigenschaften auf die Magenschleimhaut.

Seit 1990 sind zwei Isoformen der Cyclooxygenase, die konstitutiv vorliegende COX-1 und die regulierbare COX-2, bekannt (FU, 1990; O'BANION, 1991). Während die COX-1 vorwiegend für die physiologische Synthese der Prostaglandine verantwortlich gemacht wird, wird die COX-2 verstärkt bei Gewebläsionen exprimiert (COX-2 Gen auch als „immediate early gene“). Daraus wurde abgeleitet, dass moderne Antiphlogistika, die ausschließlich die COX-2 hemmen, ein günstiges Nebenwirkungsprofil haben müssten und ebenfalls besser magenverträglich sein sollten. Ob diese hochgesteckten Erwartungen eingehalten werden können, werden die zukünftigen Erfahrungsberichte mit den Arzneistoffen zeigen.

Die ersten Arzneistoffe mit selektiver COX-2-Hemmung, die in Deutschland am Arzneimittelmarkt zugelassen worden sind, sind Rofecoxib (Vioxx[®], seit 1999 zugelassen) und Celecoxib (Celebrex[®], Zulassung seit April 2000). Die beiden Hemmstoffe wirken zeitabhängig reversibel. Ihre Sulfongruppe kann die größere Seitentasche der COX-2 besetzen. Die COX-2-Selektivität von Rofecoxib ist doppelt so hoch wie die von Celecoxib (MUTSCHLER, 2001). Alle anderen dargestellten NSAIDs hemmen in therapeutischen Dosen beide COX-Isoformen (Abb. 4)

Tenidap (Enable[®]) wird als dualer Hemmstoff der 5-Lipoxygenase und der Cyclooxygenase beschrieben. Die Enzymhemmung wurde bisher allerdings lediglich *in vitro* nachgewiesen (MADHOK, 1995).

Licofelone (ML3000) ist ein weiterer balancierter 5-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Hemmstoff, der mittlerweile in klinischen Studien der Phase III bei der Behandlung von Osteoarthritis eingesetzt wird. In *in vivo* Studien zeichnete sich der Wirkstoff bisher als nebenwirkungsarm bezüglich gastro-intestinaler Beschwerden aus und war vergleichbar wirksam wie Diclofenac

(3x 50 mg) bei einer täglichen Dosis von 2x 100 mg (Merckle, 2001 und Bertolini *et al.*, 2002).

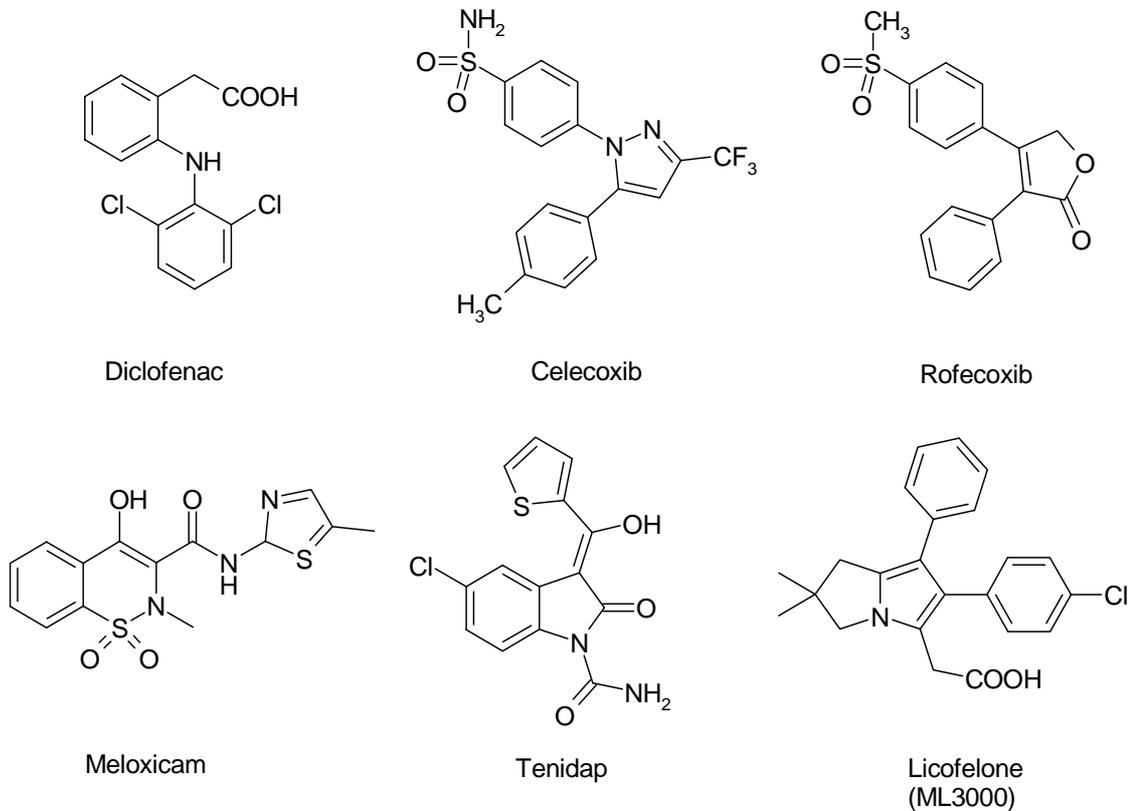


Abb. 4: Strukturformeln von Arzneistoffen zur Hemmung der Prostaglandinbiosynthese

Tab. 2: COX-Inhibitoren

Selektive COX-1 Inhibitoren

Acetylsalicylsäure	Aspirin [®]	50 mg, bzw. 100 mg (1x pro Tag)	Wirkung in den Thrombozyten
--------------------	----------------------	------------------------------------	--------------------------------

Selektive COX-2 Inhibitoren

Celecoxib	Celebrex [®]	100 mg, bzw. 200 mg (jeweils 1-2x tägl.)
Rofecoxib	Vioxx [®]	12,5 mg, bzw. 25 mg
	Vioxx dolor [®]	50 mg

Nichtselektive COX Inhibitoren

Diclofenac	Voltaren®	50 mg- 100 mg (2x tägl.)	
Aceclofenac	Beofenac®	100 mg (2x tägl.)	
Indometacin	Amuno®	25 mg- 100 mg (2x pro Tag)	
Meloxicam	Mobec®	7,5 mg bzw. 15 mg (1x pro Tag)	Moderate COX- 2 Selektivität

2. Allgemeines zu *Sophora flavescens*

2.1 Systematik

Sophora flavescens zählt zur Familie der Fabaceae (Schmetterlingsblütler). Diese Pflanzenfamilie zählte neben den Mimosaceae und Caesalpiniaceae ehemals zu den Leguminosae (ältere Familienbezeichnung) und wird häufig mit diesen gleichgestellt. Die Schmetterlingsblütler gehören zu den drei größten Pflanzenfamilien der höheren Pflanzen (HARBORNE *et al.*, 1991, HARLEY und REYNOLDS, 1992, HERENDEEN und DILCHER, 1992) und schließen lt. ENGLER ca. 400 Gattungen und ca. 9000 Arten ein. ZANDER nennt bei den Fabaceen neben dem Tribus Sophoreae noch 137 weitere.

Da die einzelnen Arten von *Sophora* zahlreiche Synonyme einschließen (THE MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2001), ist es schwierig, eine genaue Anzahl an Vertretern der Gattung anzugeben. Die Gattung *Sophora* unterteilt sich in etwa 50 Arten, die in tropischem und warm temperiertem Klima wachsen (WILLIS, 1985).

ZANDER (2000) gibt 8 unterschiedliche *Sophora*-Arten an:

Sophora flavescens (Aiton) = *S. angustifolia* Sieb. et Succ.; *S. angustifolia* var. *stenophylla* Makino & Nemoto; *S. flavescens* fo. *angustifolia* (Aiton) Yakovlev; *S. flavescens* var. *stenophylla* Hayata; *S. macrosperma* DC.; *S. tetragonocarpa* Hayata

Sophora tonkinensis (Gagnep.) = *S. subprostata* Chun & T.C. Chen; Chun & F.C. How

Sophora davidii (Kom. ex Pavol.)

Sophora japonica L. = *Ormosia esquirolii* H. Lev.; *Robinia mitis* Lour.; *S. mairei* H. Lev.; *S. pubescens* Tausch; *S. sinensis* Forrest; *Styphnolobium japonicum* L. Schott

Sophora microphylla (Aiton) = *Edwardsia grandiflora* var. *microphylla* (Aiton) Hook. ; *Edwardsia microphylla* Aiton Salisb.; *S. tetraptera* L.; *S. tetraptera* var. *microphylla* (Aiton) Hook.

Sophora mollis (Graham) = *Edwardsia hortensis* Boiss. & Buhse; *Edwardsia mollis* Royle; *Edwardsia persica* Boiss. & Buhse; *Keyserlingia buxbaumii* Bunge ex. Boiss; *Keyserlingia hortensis* (Boiss. & Buhse) Yakovlev

Sophora tomentosa L. = *S. arenicola* Nees; *S. havanensis* Jacq.; *S. littoralis* Schrader; *S. occidentalis* L.; *S. tomentosa* var. *littoralis* (Schrader) Benth.; *S. tomentosa* var. *truncata* Torr. & A. Gray; *Zanthyrasis paniculata* Raf.

Sophora secundiflora (Gomez-Ortega) Lagerh. Ex DC. = *Agastianis secundiflora* (Gomez-Ortega) Raf.; *Broussonetia secundiflora* Gomez-Ortega; *Calia erythrosperma* Teran & Berland; *Calia secundiflora* (Gomez-Ortega) Yakovlev; *Calia secundiflora* fo. *xanthosperma* (Rehder) Yakovlev; *Cladrastis secundiflora* Raf.; *Dermatophyllum speciosum* (Ortega) Scheele; *S. secundiflora* fo. *xanthosperma* Rehder; *S. sempervirens* Engelm.; *S. speciosa* (Ortega) Benth.; *Virgilia secundiflora* Cav.



Abb. 5: Habitus von *Sophora flavescens*

Bei der Pflanze *Sophora flavescens* (zu deutsch der Schnurbaum, Abb. 5), handelt es sich um einen im Osten Chinas vorkommenden 2 m hohen Halbstrauch, der sich vor allem in den östlichen Provinzen Chinas Shanxi, Hubei, Henan und Hebei findet. Außerdem wächst die Pflanze in Japan und Korea.

Der Schnurbaum hat als typischer Vertreter der Schmetterlingsblütler wechselständig stehende einfach unpaarig gefiederte Blätter mit Endfieder, deren Fiederblättchen gegenständig stehen. Pro Blatt finden sich etwa 5-6 Fiederblattpaare, wobei die Blattspreite der einzelnen Fiederblättchen 3-5 cm lang und ca. 1,5 cm breit ist. Der schwach gelblichweiße Blütenstand stellt eine walzenförmige Rispe oder Traube dar, die eine Länge bis zu 30 cm erreicht. Die im Mai bis Juli erscheinenden zygomorphen Blüten bestehen aus 5 Kelchblättern mit kurzen Zähnen und 5 Kronblättern, die wiederum aus Fahne, Flügel, Schiffchen zusammengesetzt sind. Die 10 Stamina des Androeceums sind frei. Als Frucht reift eine 10-13 cm lange, fleischige gegliederte Hülse von August bis September.

Die botanische Originalbeschreibung von *Sophora flavescens* erfolgte zum ersten Mal im Jahre 1789 in Hortus Kewensis von WILLIAM AITON (1731-1793).

Taxonomisch wird die Pflanze wie folgt eingeteilt:

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Angiospermae (Magnoliophytina)
Klasse:	Magnoliopsida (Dicotyledonae p.p.)
Unterklasse:	Fabanae
Ordnung:	Fabales (Leguminosae)
Familie:	Fabaceae (Papilionaceae)
Tribus:	Sophoreae
Subtribus:	Sophorinae (Papilionatiformes)
Gattung:	<i>Sophora</i>
Art:	<i>Sophora flavescens</i>

In ZHONG YAO ZHI (1959) wird beschrieben, dass Kushen die Wurzel Droge von *Sophora flavescens* darstellt.

Die wörtliche englische Übersetzung von Kushen lautet „bitter ginseng“, wobei „ku“ für bitter steht und „shen“ bedeutet, dass es sich um eine Wurzel mit hoher Qualität handelt (WANG, 2002). Auch in Japan und Korea ist die Droge bekannt, und zwar unter den Namen Kujin bzw. Kosam (YEN, 1992 und BENSKY, 1993). In einer Monographie des Chinesischen Arzneibuches wird die Droge neben

„Radix Sophorae flavescens“ auch „Lightyellow Sophora Root“ (hellgelbe Sophorawurzel) genannt.

Neben *Sophora flavescens* gibt es mit *Sophora japonica* (chin.: *Huaihua*) und *Sophora tonkinensis* L. (chin.: *Shandougen*) in China vor allem zwei weitere bekannte Vertreter aus der Gattung *Sophora*, die auch in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt werden.

Sophora flavescens weist vom Habitus her Ähnlichkeiten zu den beiden Arten auf, allerdings erreicht *Sophora japonica* (Japanischer Pagodenbaum) eine Höhe von 7-15 m und *Sophora tonkinensis* hat eine andere Form der Fiederblättchen und Blüten.

Zudem unterscheiden sich diese drei *Sophora*-Spezies deutlich in ihrer Inhaltsstoffführung. Während sich die für *Sophora flavescens* typischen Prenylflavonoide mit Lavandulyl-Seitenkette in der Wurzel finden, enthält die Radixdroge von *Sophora japonica* vor allem glykosylierte Isoflavone. Rutin kommt als Hauptinhaltsstoff in den Blüten von *Sophora japonica* vor und wurde hieraus einst in industriellem Maßstab für den unterstützenden therapeutischen Einsatz bei Venenerkrankungen isoliert (WAGNER *et al.*, 1999). Das chinesische Arzneibuch schreibt einen Gehalt an Rutin von mehr als 20 % vor. *Sophora tonkinensis* enthält zwar ebenfalls Chinolizidinalkaloide in deren Wurzeln, wie Matrin und Oxymatrin, jedoch fehlen auch hier sowohl Sophoridin als auch die Prenylflavonoide.

Lou *et al.* (1995) beschreibt als weitere mögliche Verfälschung *Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim. (chin.: *Jiangshu*). Von dieser Droge wurden von Bewohnern in Yancheng (Stadt im Osten Chinas in der Nähe von Shang-hai) und Jiangsu (chinesische Provinz) die Wurzeln und Sprosse alternativ zu *Kushen* verwendet. Auch diese Droge ist von *Sophora flavescens* sehr leicht zu unterscheiden. Unseren phytochemischen Untersuchungen nach hat *Glycyrrhiza pallidiflora* ein völlig anderes Inhaltsstoffmuster als *Kushen* (siehe DC- und HPLC-Untersuchungen S. 34). Zudem wachsen die violetten Blüten der Verfälschungsdroge blattachselständig (im Gegensatz zur endständigen Rispe bei *Sophora flavescens*), die Früchte sind eher ei- oder pflaumenförmig. Das Drogenpulver enthält im Gegensatz zu dem vom *Kushen* keine Stärkekörner.

2.2 Makroskopisches und mikroskopisches Erscheinungsbild der Droge

2.2.1 Makroskopie

Die Wurzeln von *Sophora flavescens* werden im Frühjahr oder im Herbst ausgegraben, anschließend von kleineren Nebenwurzeln und Wurzelköpfen befreit, gewaschen, getrocknet und geschnitten. Alternativ kann man die Wurzel auch nach dem Schneiden trocknen (PHARMACOPOEIA OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, 2000)



Abb. 6: Die Wurzeln von *Sophora flavescens* (Kushen)

Im Arzneibuch der chinesischen Medizin wird die Droge als lang gestreckt rundzylindrisch, in unteren Abschnitten häufig verzweigt, 10-30 cm lang und 1-2 cm im Durchmesser mit graubrauner oder gelbbrauner Oberfläche mit Längsrundeln und quergestellten, länglichen Poren beschrieben (Abb. 6). Die dünne, oft aufgerissene Rinde ist leicht abschälbar. Die Wurzel droge hat eine harte Konsistenz und ist schwer brechbar mit faserigem Bruch. Die Schnitt droge stellt Scheiben mit 3-6 mm im Durchmesser dar. Dabei sieht man auf der gelblichweißen Schnittfläche radiär verlaufende Strahlen und Risse. Neben einem extrem bitteren Geschmack hat sie einen schwachen charakteristischen Geruch (STÖGER, 1999).

2.2.2 Mikroskopische Beschreibung

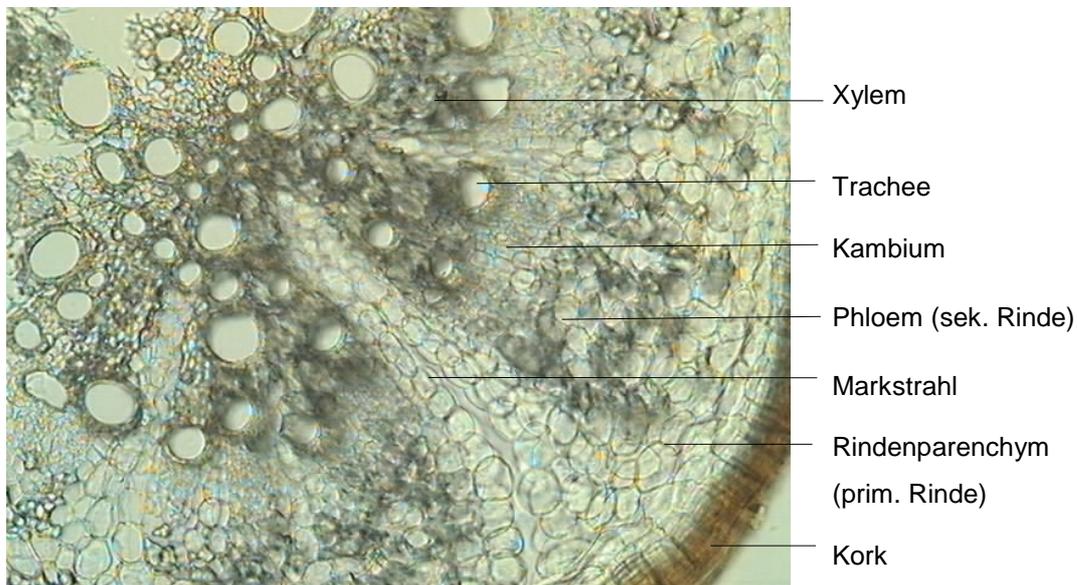


Abb. 7: Wurzelquerschnitt der Droge bei 100-facher Vergrößerung

Im Querschnitt der Wurzel (Abb. 7) findet man als äußeren Abschluss eine Korkschicht aus 8-12 Zellschichten, die nach Schädlung gelegentlich fehlen kann. Daran schließt sich Rindenparenchymgewebe der primären Rinde an. Das Phloem besteht aus zahlreichen, zumeist zu Bündeln zusammengeschlossenen Fasern. Zwischen den Faserbündeln gelegene Zellen des Kambiums sind teilweise nur undeutlich erkennbar. Die Xylemelemente sind vom Zentrum her nach außen in 2-4 Äste gegabelt, die Gefäße des Xylems sind in 1-2 Reihen angeordnet und weisen einen Durchmesser bis zu $72\mu\text{m}$ auf. In den Parenchymzellen sind Stärke und tetragonale Calciumoxalat-Solitärkristalle enthalten (STÖGER, 1999).

2.3 Prüfungen des chinesischen Arzneibuches

2.3.1 Identität

Zur Identitätsprüfung werden mikroskopische Merkmale und chemische Nachweise herangezogen. Dabei handelt es sich im einzelnen um histochemische Lignin-, Stärke- und Alkaloidnachweise. Die Flavonoide werden nach der PEW-Methode nachgewiesen. Zudem ist eine DC-Untersuchung zum qualitativen Nachweis von Oxymatrin und Sophoridin vorgeschrieben.

2.3.2 Reinheit

Bei der Prüfung auf Reinheit sind Verunreinigungen, wie Stängelreste, mit maximal 10 % erlaubt, fremde Beimengungen werden nur bis zu 1 % geduldet. Die Normalasche darf nicht mehr als 6 %, die säureunlösliche Asche muss weniger als 1,5 % betragen.

2.3.3 Gehalt

Als Gehaltsbestimmung ist eine Säure-Base-Titration der enthaltenen Alkaloide vorgeschrieben. Der Gehalt der Droge an Alkaloiden wird als Matrin berechnet und darf 2,0 % nicht unterschreiten.

Das Japanische Arzneibuch enthält zwei Monographien über *Sophora flavescens*, und zwar handelt eine Monographie von *Sophorae Radix* als Wurzel Droge und eine weitere Monographie beschreibt das Drogenpulver, *Sophorae Radix Pulverata*.

Die Monographien stellen die gleichen Anforderungen an die Droge wie sie auch im chinesischen Arzneibuch zu finden sind, lassen jedoch die Gehaltsbestimmung vermissen (JAPANESE PHARMACOPOEIA, VOL. VIII).

2.4 Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin

Laut den Vorstellungen der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) soll Kushen eine **Affinität** zu den Organsystemen „Herz“, „Leber“, „Nieren“, „Blase“, „Dünn- und Dickdarm“ haben. Die Droge wird als „kalt“ und „bitter“ charakterisiert. Die traditionelle chinesische Wirkungsbeschreibung ist **Beseitigung von Hitze und Feuchtigkeit** (*qingre zaoshi*), die Förderung des Harnflusses (*liniao*), die **Eliminierung von Wind**, Linderung von Juckreiz und eine anthelmintische Wirkung (*shachong*) (REICH, 1995; STÖGER, 1999; PHARMACOPOEIA OF THE PEOPLE´S REPUBLIC OF CHINA, 1997).

Daraus ergeben sich als **Indikationsgebiete gemäß der TCM** calor-bedingte Dysenterie (*reli*), blutiger Stuhl (*bianxue*), Ikterus und Harnverhaltung (*huangdan niaobi*), rötlicher persistierender Scheidenfluss (*chibaidaixia*), Schwellungen und Juckreiz im Schambereich (*yinzhong yinyang*), nässende Exantheme (*shizhen*), nässende Geschwüre (*shichuang*), Hautjucken (*pifu saoyang*), Krätze und Lepra (*jiexuan mafeng*) und die äußerliche Behandlung

von Trichomonadeninfektionen der weiblichen Geschlechtsorgane (STÖGER, 1999; PHARMACOPOEIA OF THE PEOPLE´S REPUBLIC OF CHINA, 2000).

Als **Tagesdosis** empfiehlt das chinesische Arzneibuch 4,5-9 g für die innerliche Anwendung. Zur äußerlichen Verwendung als Dekokt für Bäder werden keine genauen Mengenangaben gemacht, es wird lediglich darauf hingewiesen eine angemessene Menge der Droge zur Zubereitung zu nehmen.

Häufig wird *Sophorae flavescens* radix **mit anderen Drogen kombiniert**.

So wird sie im Nässe-Disharmoniemuster bei der Gelbsucht zusammen mit *Phellodendri cortex*, *Gardeniae fructus*, *Gentianae radix* oder *Artemisiae scopariae herba* angewendet. Bei Diarrhöe und Dysenterie sind Kombinationen mit *Aucklandiae radix* und *Glycyrrhizae radix* möglich. Im Falle von Leukorrhoe sowie Ekzemen der Genitalien kann *Kushen* zusammen mit *Phellodendri cortex*, *Cnidii fructus* und *Gentianae radix* verordnet werden.

Die Anwendung der Droge bei Hauterkrankungen kann sowohl innerlich als auch äußerlich erfolgen. Das Arzneimittel wird mit *Angelicae sinensis radix*, *Dictamni radice cortex*, *Kochiae fructus* und *Paeoniae rubrae radix* angewendet.

Eine Kombination mit *Taraxaci herba* und *Pyrrosiae folium* ist gegen schmerzhaften Harnfluss möglich.

Die Droge sollte nicht zusammen mit *Rhizoma* und *Radix Veratri nigri (Lilu)* angewendet werden, hier können sich **Inkompatibilitäten** ergeben. BENSKY (1993) nennt weitere Unverträglichkeiten mit den Drogen *Fritillariae verticillatae bulbus* und *Cuscutae chinensis semen* und begründet diese Inkompatibilitäten mit einer antagonistischen Wirkung. Bei Patienten mit Schwäche und Kälte in Milz und Magen ist *Kushen* ebenfalls kontraindiziert (GENG, 1994).

2.5 Bereits bekannte Inhaltsstoffe aus *Sophora flavescens*

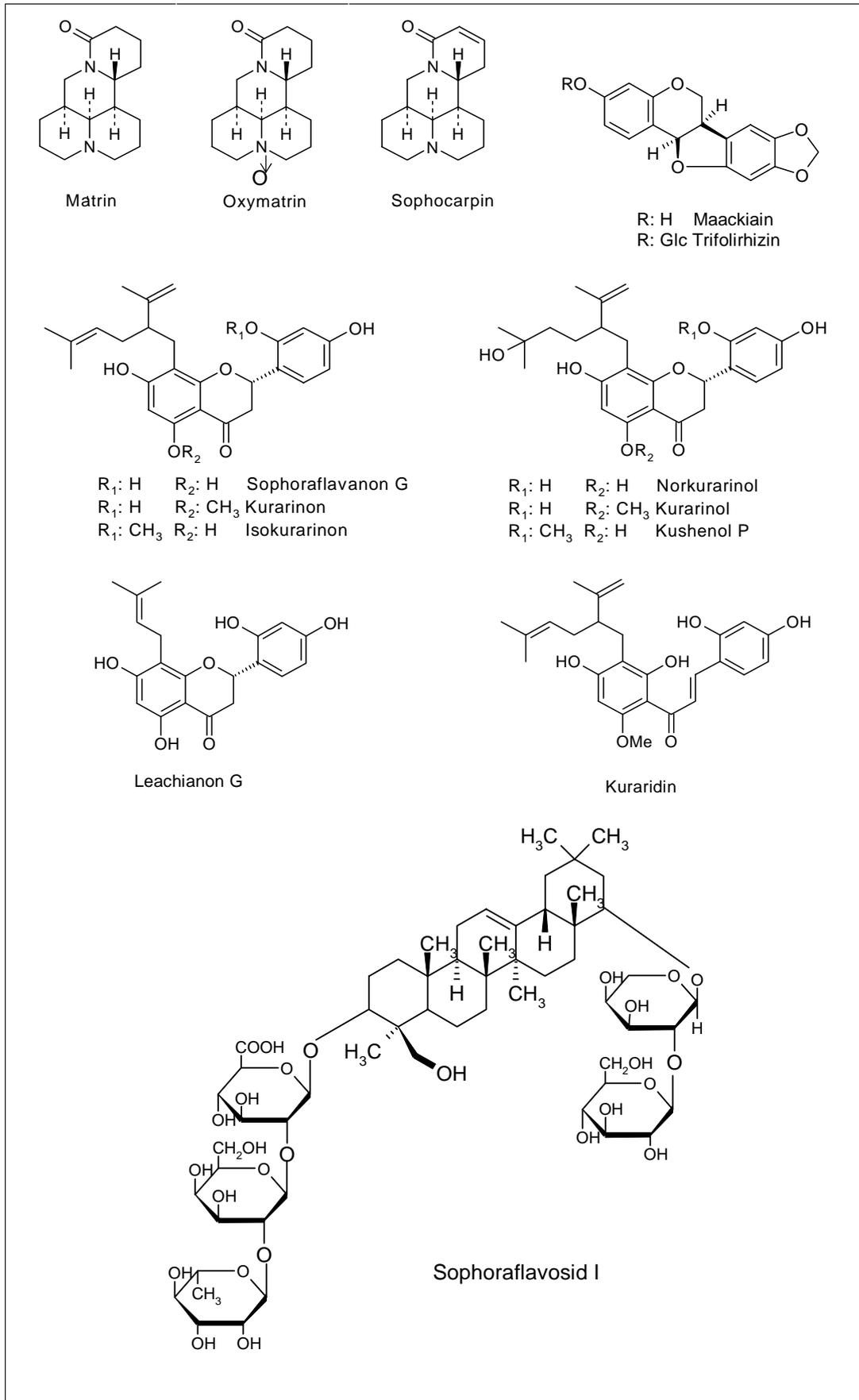
Bereits im Jahr 1889 gelang es einer japanischen Arbeitsgruppe (NAGAI und TAHARA) das Chinolizidinalkaloid *Matrin* mit *Matridin*-Grundkörper aus „*Kushin*“ zu isolieren und dessen Struktur zu formulieren. Fast 50 Jahre später berichtete OCHIAI *et al.* (1938) zusätzlich von der Charakterisierung des *Oxymatrin*s, dem N-Oxid des *Matrin*s. Weitere Alkaloide wurden von BOHLMANN *et al.* (1958), OKUDA *et al.* (1965) und UENO *et al.* (1975) isoliert. Somit waren es anfangs

ausschließlich die Alkaloide, auf die das Augenmerk bei der Inhaltsstoffanalyse von *Sophorae flavescentis radix* gelegt wurde. Auch heute sind die stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe der Droge noch oft Gegenstand analytischer Forschungsarbeiten.

Seit 1970 (KOMATSU *et al.*) konzentrierte man sich auch auf die Isolierung der Flavonoide aus der Pflanze. Das im darauffolgenden Jahr isolierte Kurarinon stellt den Hauptinhaltsstoff aus dieser Substanzklasse dar (HATAYAMA *et al.* 1971). Auch bei der eigenen Isolierung war dieses Flavanonderivat der im Extrakt mengenmäßig dominierende Bestandteil (zu genaueren Angaben siehe in den Kapiteln *Eigene phytochemische Untersuchungen* bzw. im *Experimentellen Teil*).

In einigen Arbeiten wurden Flavonoide wirkungsorientiert fraktioniert, wie es auch Grundlage der vorliegenden Arbeit war. Beispielsweise konnten in einer Publikation von KUROYANAGI *et al.* (1999) bei einem Screening auf der Suche nach antibakteriellen Pflanzeninhaltsstoffen unter anderem neben drei Pterocarpanen und einem Prenylflavanonol acht weitere Prenylflavanone als neue Naturstoffe isoliert werden.

Einen allgemeinen Überblick über die wichtigsten bekannten Strukturen gibt Abb. 8, eine Aufstellung der gesamten gefundenen Inhaltsstoffe aus Kushen und entsprechende Literaturangaben finden sich in der daran anschließenden Tab. 3.

Abb. 8: Inhaltsstoffe aus *Sophora flavescens*

Tab. 3: Bisher bekannte Inhaltsstoffe aus *Sophora flavescens*

Inhaltsstoffe	Literatur
Alkaloide:	
Matrin	BOHLMANN F. <i>et al.</i> , 1958
Oxymatrin	BOHLMANN F. <i>et al.</i> , 1958
Sophoranol	BOHLMANN F. <i>et al.</i> , 1958
Sophocarpin	KIM J.S. <i>et al.</i> , 2001
Isomatrin	UENO A. <i>et al.</i> , 1975
(-)- Dehydrosophorammin	UENO A. <i>et al.</i> , 1978
Flavanone:	
Kurarinol	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Neokurarinol	KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Norkurarinol	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Isokurarininon	KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Isoxanthohumol	WANG X. <i>et al.</i> , 1997
Kushenol A	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985; IINUMA M <i>et al.</i> , 1993
Kushenol B	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol E	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol F	HA T.J. <i>et al.</i> , 2001; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol P	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol Q	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol R	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol S	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol T	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol U	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol V	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol W	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushenol X	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kurarininon	KANG T.-H. <i>et al.</i> , 2000; Ha T.J. <i>et al.</i> , 2001; RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; HATAYAMA K. <i>et al.</i> , 1971
Norkurarininon	HATAYAMA K. <i>et al.</i> , 1971; WANG X. <i>et al.</i> , 1997

(2-S)-7,4'-dihydroxy-5-methoxy-8'-dimethylallylflavanon	KANG S.S. <i>et al.</i> , 2000
2'-Methoxykurarinon	KANG T.-H. <i>et al.</i> , 2000
Sophoraflavanon G	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WANG X. <i>et al.</i> , 1997
Sophoraflavanon B	ZHAO Y. <i>et al.</i> , 1993
Flanonole:	
Kushenol C	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol G	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Sophoflavescenol	WOO E.-R. <i>et al.</i> , 1998
Flavanonole:	
Kushenol H	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol I	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol J	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol K	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol L	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol M	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushenol N	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; WU L.J. <i>et al.</i> , 1986
Kosamol A	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1996
Kushenol X	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Chalkone:	
Kuraridinol	KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Kushenol D	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kuraridin	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; HATAYAMA K. <i>et al.</i> , 1971
Isoflavone:	
Formononetin	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997; KYOGOKU K. <i>et al.</i> , 1973
Kushenol O	WU L.J. <i>et al.</i> , 1986
Genistein	KIM J.S. <i>et al.</i> , 2001
3'-Methoxydaidzein	KIM J.S. <i>et al.</i> , 2001
Calycosin	KIM J.S. <i>et al.</i> , 2001
Chinone:	
Kushechinon A	Wu L.J. <i>et al.</i> , 1986
Pterocarpane:	
Maackiain	ZHAO Y. <i>et al.</i> , 1993; HONDA G. <i>et al.</i> , 1982; FURUYA T <i>et al.</i> 1968
4-Methoxymaackiain	ZHAO Y. <i>et al.</i> , 1993

Kushenin	WU L.J. <i>et al.</i> , 1985
Kushecarpin A	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushecarpin B	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Kushecarpin C	KUROYANAGI M. <i>et al.</i> , 1999
Saponine:	
Sophoraflavosid I	YOSHIKAWA M. <i>et al.</i> , 1985
Sophoraflavosid II	DING Y. <i>et al.</i> , 1992
Sophoraflavosid III	DING Y. <i>et al.</i> , 1992
Sophoraflavosid IV	DING Y. <i>et al.</i> , 1992
Trifolirhizin	RYU S.Y. <i>et al.</i> , 1997
Cumarine:	
Umbelliferon	ZHANG J. <i>et al.</i> 2000
Sonstige:	
β-Sitosterol	WANG X. <i>et al.</i> , 1997; ZHANG J. <i>et al.</i> 2000
Hexadecylferulat	KIM J.S. <i>et al.</i> , 2001

2.6 Aktueller Kenntnisstand zu Wirkungs- und Wirksamkeitsstudien von *Sophora flavescens*

Zur pharmakologischen Wirkung gibt es neben Untersuchungen an Extrakten unterschiedlicher Polarität vor allem Studien zu Flavonoiden, hier insbesondere zum Hauptinhaltsstoff Kurarinon, und zur anderen dominierenden Inhaltsstoffgruppe, den Alkaloiden. Hier finden sich vor allem Arbeiten zu Matrin und Oxymatrin.

Eine gute Übersicht geben ein von MIAO *et al.* (2001) erstellter Review-Artikel, sowie TANG und EISENBRAND (1992), die phytochemische und pharmakologische Ergebnisse zusammenfassen.

2.6.1 Antiarrhythmische Wirksamkeit

Sowohl die Alkaloide als auch die Flavonoide zeigten Wirksamkeit gegen Herzrhythmusstörungen. Dabei scheint laut ZHAO *et al.* (1983) vor allem Sophocarpin einen Effekt insbesondere auf die ventrikuläre Arrhythmie zu haben. Die Versuche wurden an Mäusen durchgeführt. WU *et al.* (1988) und LI *et al.* (1989) berichteten ähnliche Effekte von Sophoridin und Sophoramin. Aber

auch die Gesamtheit der Flavonoide zeigte herzwirksame Aktivität. Die i.v. Gabe an Mäusen hemmte dosisabhängig Chloroform induziertes ventrikuläres Flimmern (ZHANG *et al.*, 1979). Im Vergleich zu den Alkaloiden enthaltenen Injektionen stellte die chinesische Arbeitsgruppe eine geringere Toxizität der Flavonoide fest. Damit ergibt sich eine höhere therapeutische Breite für die Anwendung von Flavonoiden aus *Kushen*. WANG *et al.* (1983) wiesen nach Gabe von Flavonoiden aus *Sophora flavescens* antiarrhythmische und negativ chronotrope Einflüsse nach. In einer weiteren Studie von YAMAHARA *et al.* (1990) wurden nach wirkungsorientierter Fraktionierung aus einem aktiven Ethylacetatextrakt Vexibinol und Kurarinon isoliert und ihr Einfluss auf Ca-Kanäle getestet. Hier zeigte sich eine Beeinflussung der spannungsabhängigen Calciumkanäle, die allerdings eher schwach war im Vergleich zu den verwendeten Referenzsubstanzen Nifedipin und Papaverin.

2.6.2 Antiinflammatorische Aktivität

Entzündungshemmende Eigenschaften durch Extrakte oder Inhaltsstoffe von *Sophorae flavescens radix* fanden sich *in vitro* bislang in:

PRÖBSTLE (1994); hier wurde für den Methanolextrakt eine Cyclooxygenasehemmung gefunden. REININGER (2001) fand in sukzessiv hergestellten n-Hexan-, Dichlormethan- und Methanolextrakten je nach Lipophilie moderate bis schwache Hemmungen der COX-1 bzw. COX-2 bei einer eingesetzten Testkonzentration von 50 µg/ml. Am besten wirksam war hier der DCM-Extrakt mit einer 76 %igen Hemmwirkung auf die Cyclooxygenase-1 (die COX-2 Hemmung lag beim gleichen Extrakt bei 33 %).

CHI *et al.* (2001) konnten beim Chalkonderivat Kuraridin und bei den Flavanonderivaten Kurarinon und Sophoraflavanon G eine starke Hemmung der COX-1, sowie eine gute bis sehr gute Inhibition der 5-Lipoxygenase nachweisen. Dabei lagen die Testergebnisse jeweils im unteren mikromolaren Bereich. Die Inhaltsstoffe waren ähnlich gute Hemmstoffe der COX-1 wie die Referenzsubstanz Indometacin. Die induzierbare Isoform des Enzyms, die COX-2, wurde bei einer Testkonzentration der Proben von 100 µM nur sehr schwach bis gar nicht gehemmt. Allerdings lässt sich die Identität von

Sophoraflavanon G in der angegebenen weiterführenden Literatur nicht zurückverfolgen. Somit ist fraglich, ob dieser Inhaltsstoff tatsächlich untersucht wurde.

2.6.3 Antiulzerative Wirkungen

Nach oraler Applikation von Oxymatrin traten durch Indometacin und Stress induzierte Ulzera nachweislich seltener auf. Dies begründete YAMAZAKI *et al.* (1984) mit verminderter Magensäureausschüttung. Nach intraduodенaler Applikation hemmte Oxymatrin zusätzlich die gastrische Motilität (siehe auch YAMAZAKI *et al.*, 2000).

Bei durch Salzsäure/Ethanol hervorgerufenen Verletzungen der Magenschleimhaut von Ratten entwickelten Kurarinon und Vexibinol nach wirkungsorientierter Fraktionierung aus dem Methanolextrakt signifikante protektive Eigenschaften (YAMAHARA *et al.*, 1990 a). Später untersuchte die Arbeitsgruppe Vexibinol zusätzlich in weiteren Ulzera-Modellen. Es zeigte sich, dass das Flavonoid auch einen hemmenden Effekt auf die Magensäuresekretion hat (YAMAHARA *et al.*, 1990 b).

2.6.4 Antiasthmatische Aktivität

Oral gegebenes Matrin reicherte sich bei Ratten besonders in den Lungen an. In anschließenden Versuchen wurde Matrin auf antiasthmatische Eigenschaften untersucht. Dabei wurden die Versuchstiere (Ratten und Meerschweinchen) vorher mit einem Aerosol, bestehend aus einer 1:1 Mischung von Acetylcholin und Histamin behandelt, wodurch ein Asthmaanfall ausgelöst wurde. Vor allem nach i.v. Applikation des Matrins konnten positive Effekte verzeichnet werden, während man nach i.v. appliziertem Oxymatrin keinen Effekt beobachten konnte. Nach oraler Gabe von Oxymatrin wurde im Gewebe Matrin gefunden. Dies bedeutet, dass eine Biotransformation von Oxymatrin in Matrin im GI-Trakt stattfindet. Belegt wurde diese Tatsache, indem man nach i.m. Injektion von Oxymatrin diesen Stoff in der Galle und im Urin in hoher Konzentration nachweisen konnte. Somit ist Matrin wahrscheinlich die pharmakologisch aktive Substanz, die zu einer Verminderung des Asthmaanfalls führt (XIE *et al.*, 1983; XIE *et al.*, 1981; MASSEY *et al.*, 1994).

2.6.5 Weitere Untersuchungen an Extrakten und Inhaltsstoffen

Extrakte und isolierte Inhaltsstoffe von *Sophora flavescens* wurden in zahlreichen weiteren pharmakologischen Tests eingesetzt. Eine Übersicht zu einzelnen Studien gibt Tab. 4.

Tab. 4: Übersicht zu einzelnen Studien über weitere Wirkungen von *Sophora flavescens*

Wirkung	Extrakt/ Inhaltsstoffe	verantwortliche Quelle
Antibakterielle Wirkung		
geg. <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. acnes</i>	<u>Methanol</u> / Kushenol A, H, I, P-X, Kushecarpin A-C, Norkurarinin, Isokurarinin, Kurarinon, Neokurarinol, Kurarinol, Norkurarinol, I- Maackiain, Leachianon G	KUROYANAGI <i>et al.</i> , 1999
geg. <i>S. aureus</i> , <i>S. Mutans</i>	<u>Ether</u>	YAMAKI <i>et al.</i> , 1990
geg. <i>S. aureus</i> geg. <i>B. subtilis</i> , <i>E. Coli</i> , <i>M. luteus</i>	Sophoraflavanon G <u>Methanol</u>	SATO <i>et al.</i> , 1995 PRÖBSTLE, 1994
gegen Kokken	<u>Dekokt</u>	YOUN und NOH, 2001
Antimikrobielle Aktivität	<u>Ethylacetat</u> / I-Maackiain	HONDA und TABATA, 1982
Antivirale Wirkung		
Wirkung gegen Herpes simplex Viren	<u>Methanol</u> / Kurarinol, Kushenol H, Kushenol K, Kuraridin, Trifolirhizin, Sophoflavescenol <u>Ethylacetat</u>	WOO <i>et al.</i> , 1998 WOO <i>et al.</i> , 1997
Wirkung gegen Hepatitis B-Viren	Kurarinin	CHEN <i>et al.</i> , 2000
Wirkung auf Enzyme		
Hemmung der Wirkung von c-AMP	<u>Methanol</u> / Kuraridin, Kurarinon, Kushenol A	OHMOTO <i>et al.</i> , 1986 NIKAIDO <i>et al.</i> , 1989
Inhibition der Phospholipase C γ_1	<u>Methanol</u> / Kosamol A, Kuraridin, Kushenol B, E, H, K-N, Kurarinon, Sophoraflavanon G	LEE und KO, 1997
Hemmwirkung auf Tumorzellen		
Hemmende Einflüsse auf das Tumorwachstum menschlicher Krebszellen	<u>Methanol</u> / Formononetin, Kushenol B, E, H, L-N, Kurarinol, Kurarinon, Kuraridin, Trifolirhizin, Sophoraflavanon G, Norkurarinol	RUY <i>et al.</i> , 1997
Cytotoxisch gegen HL-60 Zellen	<u>Methanol</u> / (2-S)-2'-Methoxykurarinon, Kurarinon, Leachianon A, Sophoraflavanon G, I-Maackiain, Formononetin,	KANG <i>et al.</i> , 2000 KO <i>et al.</i> , 2000
gegen HCT-15 Zellen (menschl. Tumorzellen)	Sophoraflavanon G, Kurarinon, Norkurarinol, Kushenol K	CHOI <i>et al.</i> , 1999

Weitere Effekte		
Anaphylaxie	<u>Dekokt</u>	LEE, PARK <i>et al.</i> , 2001
Vasodilatierende Wirkung	<u>Ethylacetat</u> / Kurarinon, Vexibinol	YAMAHARA <i>et al.</i> , 1990
Kapillarmembran-stabilisierende Effekte (HET-CAM-Assay)	<u>Methanol</u>	PRÖBSTLE, 1994
Mutagenität (Anomalien des Zellkerns, Ames Test)	<u>Dekokt</u>	YIN <i>et al.</i> , 1991

2.7 Toxizität

Der Dekokt zeigte in Mäusen nach subcutaner Gabe eine LD₅₀ von 43 ± 2,2 g/kg KG, beim Alkaloid-Rohextrakt lag die LD₅₀ bei 1,18 ± 0,1 g/kg KG. Wurde Matrin intravenös appliziert, fand man als halbmaximale letale Dosis 72,1 mg/kg KG. Dabei beobachtete man gastrointestinale Störungen, wie Magenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, sowie Verstopfung als beginnende negative Effekte (HUANG, 1993).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Chromatographische Untersuchungsmethoden

3.1.1 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Da man sich anfangs bei der Untersuchung von *Sophora flavescens* auf die Analytik der enthaltenen Alkaloide konzentrierte, gibt es in der Literatur fast ausschließlich Informationen zum dünnschichtchromatographischen Verhalten der stickstoffhaltigen Inhaltsstoffe. Dabei wurden die Prüfungen stets auf mit Natronlauge vorbehandelten Kieselgelplatten mit unterschiedlichen Fließmittelsystemen durchgeführt. Zur Detektion wurde standardmäßig Dragendorff's Reagenz verwendet. Cui *et al.* (1985a) und Cui *et al.* (1986b) analysierten Chloroformextrakte mit einem Fließmittelgemisch aus Benzol/Aceton/Methanol (8:3:0,5). Als Referenzsubstanzen wählten sie Matrin, Oxymatrin, Sophocarpin, Sophoridin und Oxysophocarpin. In einem chinesischen Dünnschichtchromatographieatlas (XIE, 1993), der in Anlehnung an das chinesische Arzneibuch DC-Untersuchungen von TCM-Drogen beinhaltet, werden ebenfalls Drogenextrakte mit enthaltenen Alkaloiden untersucht. Teilweise wurden die DC-Platten nach Probenaufgabe in zwei unterschiedlichen Trennsystemen nacheinander entwickelt. Dies diente der besseren Substanzauftrennung der strukturell nahe verwandten Inhaltsstoffe. Für den Nachweis von eher unpolaren Stoffen wie Matrin oder Sophoridin nahm man zunächst Benzol/Aceton/Methanol (8:3:0,5), anschließend die obere Phase des Systems Toluol/Ethylacetat/Methanol/Wasser in einem Verhältnis von 2:4:2:1. Für die eher polaren Substanzen, wie Oxymatrin und Oxysophocarpin eignete sich die untere Phase des Gemisches aus Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) in einer Zusammensetzung von 5:0,6:0,3. Außerdem war eine Differenzierung zwischen Extrakten von *Sophora flavescens* und *Sophora tonkinensis* möglich. Letztere enthält im Gegensatz zu Kushen kein Sophoridin (XIE, 1993).

Bei Lou *et al.* (1995) findet man dünnschichtchromatographische Nachweismethoden für die Flavonoide aus *Sophora flavescens*. Zuordnungen der in

Ethanolextrakten enthaltenen Substanzen wurden anhand von Anhydroicaritin, Isokurarinon und Norkurarinon als Vergleichssubstanzen gemacht. Als mobile Phase diente ein Fließmittelgemisch aus Chloroform/Methanol (95:5). Die Auswertung erfolgte im UV-Licht bei 365 nm.

Extrakte aus *Sophorae flavescentis radix* unterschiedlicher Polarität, die mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol als Extraktionsmittel hergestellt worden waren, sollten zunächst dünnschichtchromatographisch untersucht werden. Nach Experimenten mit verschiedenen Fließmittelsystemen stellte sich die untere Phase einer Mischung aus Chloroform/Methanol/Ammoniak (50:10:3) für die Analyse auf Kieselgelplatten als optimal heraus und wurde als Standardtrennsystem für alle dünnschichtchromatographischen Untersuchungen verwendet. Versuche, Chloroform durch Dichlormethan zu ersetzen, verschlechterten die chromatographische Trennleistung, der Wegfall von Ammoniak wirkte sich nachteilig auf die Schärfe der Substanzzonen aus. Mittels von uns isolierter Flavonoide konnten wichtige Zonen der Extrakte zugeordnet werden (Auswertung im Tageslicht), nachdem die DC-Platten mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz besprüht worden waren (Abb. 9). Die Vergleichssubstanzen Matrin, Oxymatrin und Sophoridin waren kommerziell erworben worden und dienten der Zuordnung der quantitativ dominierenden Chinolizidinalkaloide. Dabei erfolgte die Auswertung der Chromatogramme im VIS nach Detektion mit Dragendorff's Reagenz.

Beschreibung der Dünnschichtchromatogramme:

a) Vanillin-Schwefelsäure als Detektionsreagenz

Der dünnschichtchromatographische Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Lipophilie (*n*-Hexan-, Dichlormethan-, Methanolextrakt und Dekokt) ließ erkennen, dass der *n*-Hexanextrakt zwar unter anderem Fettsäuren, Maackiain und Isokurarinon enthielt, jedoch fehlten unter den Bedingungen der von uns entwickelten Analysenmethode vor allem die in Dichlormethan- und Methanolextrakten hauptsächlich enthaltenen Flavanone Sophoraflavanon G und Kurarinon. Maackiain war interessanter Weise in allen Extrakten enthalten. Weiterhin konnte in dem mit Wasser hergestellten Extrakt Kurarinon nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz visualisiert werden. Unter UV

365 nm zeigte sich bei der Direktauswertung im Dekokt und im DCM-Extrakt im mittleren R_f -Bereich (R_f 0,56) ein intensiv blau fluoreszierender Fleck, der ein Cumarinderivat darstellte. Weitere fluoreszierende Zonen wurden ebenfalls durch gestrichelte Markierungen auf der DC-Platte gekennzeichnet jedoch nicht weiter untersucht.

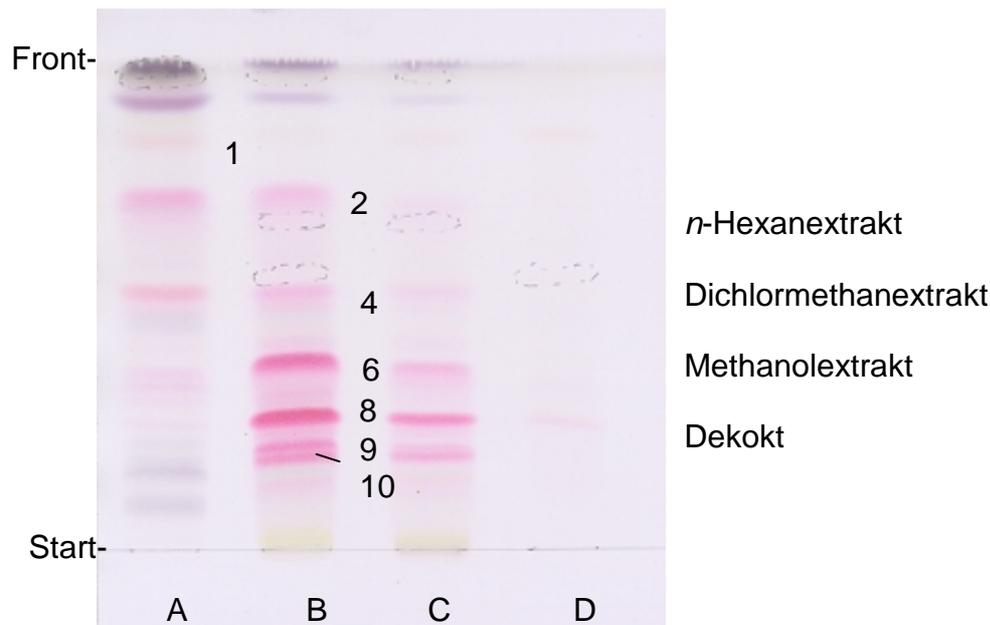


Abb. 9: DC-Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität von *Sophora flavescens*, Auswertung im VIS nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz; die der Nummerierung der Substanzzonen zugehörigen Inhaltsstoffe sind in Tab. 9 zu finden

Der Vergleich unterschiedlicher *Sophora flavescens* Chargen (**SF1** - **SF6**, Abb. 10) zeigte ein sehr einheitliches Inhaltsstoffmuster für alle Chargen. Diese Chargenkonformität bezüglich der Flavonoide in der Droge bestätigte die Untersuchungen von Lou *et al.* (1995). Violette Zonen bei R_f 0,87 und 0,98 wurden hauptsächlich durch Fettsäuren hervorgerufen. Die Prenylflavonoide färbten sich nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure und Erwärmung generell rot bzw. rotbraun an. Im oberen Drittel erschienen mit einem R_f -Wert von 0,76 und 0,64 Maackiain und Isokurarinon als rote Banden. Besonders kräftige Hauptzonen dominierten bei R_f 0,32 (Sophoraflavanon G) und bei R_f 0,22 (Kurarinon). Zwischen R_f 0,14 und R_f 0,5 zeigten sich zusätzliche Banden nach Besprühen und anschließendem Erhitzen, hier handelte es sich ebenfalls um Flavonoide. Die Charge **SF6** zeigte mit den intensivsten Zonen den höchsten Gehalt an Inhaltsstoffen.

Zusätzlich wurden die Inhaltsstoffmuster der möglichen Verfälschungen *Sophora tonkinensis* (**ST1**) und *Glycyrrhiza pallidiflora* (**GP1**) untersucht. Es zeigten sich große Unterschiede zu den Chargen von *Sophora flavescens* (**SF1** - **SF6**). Es waren deutlich weniger und andere Zonen sichtbar, so dass *Sophora flavescens* mittels dieser DC-Methode leicht von diesen unterschieden werden kann. Abgesehen von der Tatsache, dass alle Extrakte (**SF1** - **SF6**, **ST1**, **GP1**) violette Zonen zwischen Rf 0,87 und 0,98 zeigten, fanden sich nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz kaum rote Banden bei den Verfälschungschargen.

Tab. 5: Rf-Werte, Zuordnung und Detektionsverhalten von Inhaltsstoffen aus *Sophora flavescens*, die mit Vanillin-H₂SO₄ detektierbar sind

DC	Rf	Substanz	VS	UV _{254 nm}	VIS
1	0,76	Maackiain	braunviolett	löschend	
2	0,66	Isokurarinon	rot	löschend	
3	0,63	Kushenol A	graubraun	löschend	
4	0,51	2´Methoxykurarinon	rot	löschend	gelb
5	0,46	Kushenol E	rotbraun	löschend	
6	0,35	Sophoraflavanon G	rot	löschend	gelb
7	0,32	Kushenol M	graubraun	löschend	
8	0,24	Kurarinon	rot	löschend	gelb
9	0,17	Kushenol I	rotviolett	löschend	
10	0,14	Norkurarinol	rotbraun	löschend	

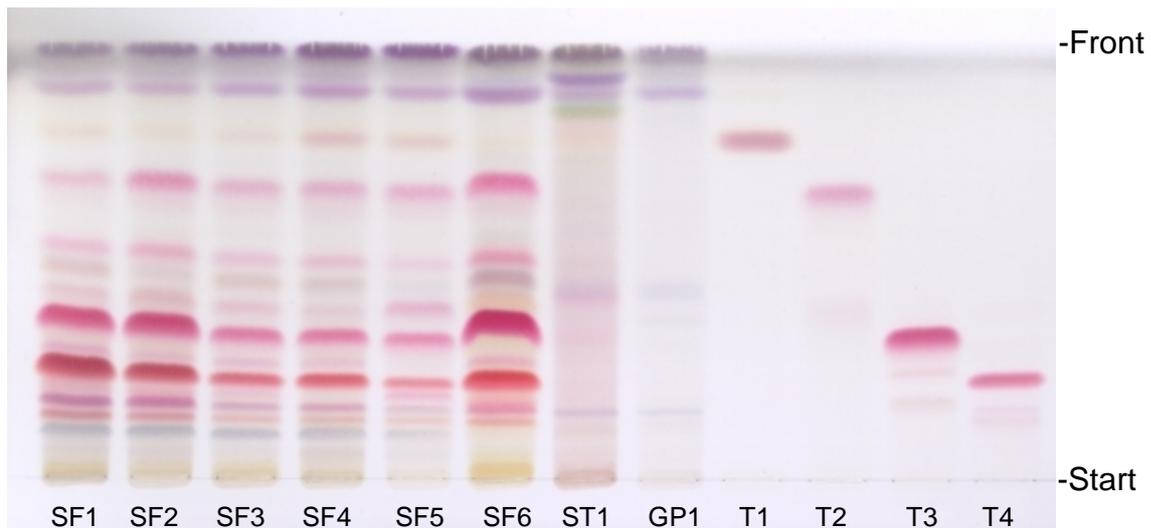


Abb. 10: DC-Vergleich einiger *Sophora flavescens*-Drogenmuster (**SF1 – SF6**), *Sophora tonkinensis* (ST1) und *Glycyrrhiza pallidiflora* (GP1), T1 – T4 stellen die Vergleichssubstanzen Maackiain, Isokurarinon, Sophoraflavanon G und Kurarinon dar; Auswertung im visuellen Bereich nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, (DC-Probenvorbereitung siehe *Exp. Teil S. 185*)

b) Detektion mit Dragendorff's Reagenz

Da laut Literatur (XIE, 1993, PHARMACOPOIEA OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, 2000) *Sophora tonkinensis* ein ähnliches Alkaloidmuster wie *Sophora flavescens* zeigt und die Inhaltsstoffe dieser Stoffklasse für die Identitätsnachweise der Drogen von Bedeutung sind, war es wichtig diesbezügliche dünnschichtchromatographische Untersuchungen anzustellen.

Nach dem Besprühen mit Dragendorff's Reagenz erfolgte die Auswertung im Tageslicht, wobei sich die Alkaloide orangebraun anfärbten. Dabei wurden zunächst Extrakte unterschiedlicher Lipophilie auf die Inhaltsstoffführung der Alkaloide untersucht (Abb. 11) um zu sehen, mit welchem Extraktionsmittel die stickstoffhaltigen Substanzen am besten extrahiert wurden.

Zusätzlich wurden Dekokte hergestellt, weil *Sophora flavescens* in der TCM in dieser Form verabreicht wird (Herstellung der wässrigen Extrakte siehe *Exp. Teil S. 196*). Zur Aufkonzentrierung lipophiler Inhaltsstoffe dieser Extrakte wurde vor der DC-Untersuchung mit Chloroform über Extrelut-Fertigsäulen extrahiert.

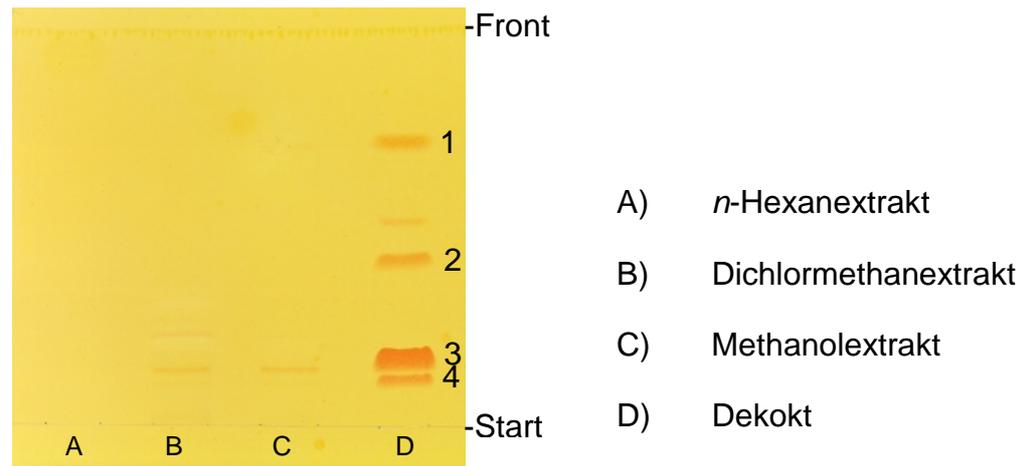


Abb. 11: DC-Vergleich von Extrakten unterschiedlicher Polarität von *Sophora flavescens*, Auswertung im VIS nach Detektion mit Dragendorff's-Reagenz

Tab. 6: Zuordnung der Hauptzonen des Dünnschichtchromatogramms (Abb. 11)

DC	R _f	Substanz
1	0,72	Matrin
2	0,42	Sophoridin
3	0,15	Oxymatrin
4	0,12	Oxysophocarpin

Beim DC-Vergleich der Extrakte (Abb. 11) zeigte sich, dass die Alkaloide im wässrigen Extrakt erhalten wurden und dass lediglich Oxymatrin in den Hexan-, Dichlormethan- und Methanolextrakten in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte.

Die Chinolizidinalkaloide zeigten bei der Direktauswertung weder Fluoreszenzlöschung bei UV 254 nm noch Eigenfluoreszenz bei UV 365 nm. Dies ist damit zu erklären, dass bei diesen Verbindungen kein konjugiertes π -System als Chromophor vorliegt. Zudem sind die Verbindungen nicht planar, was ebenfalls eine Voraussetzung für eine Eigenfluoreszenz bei UV 365 nm ist.

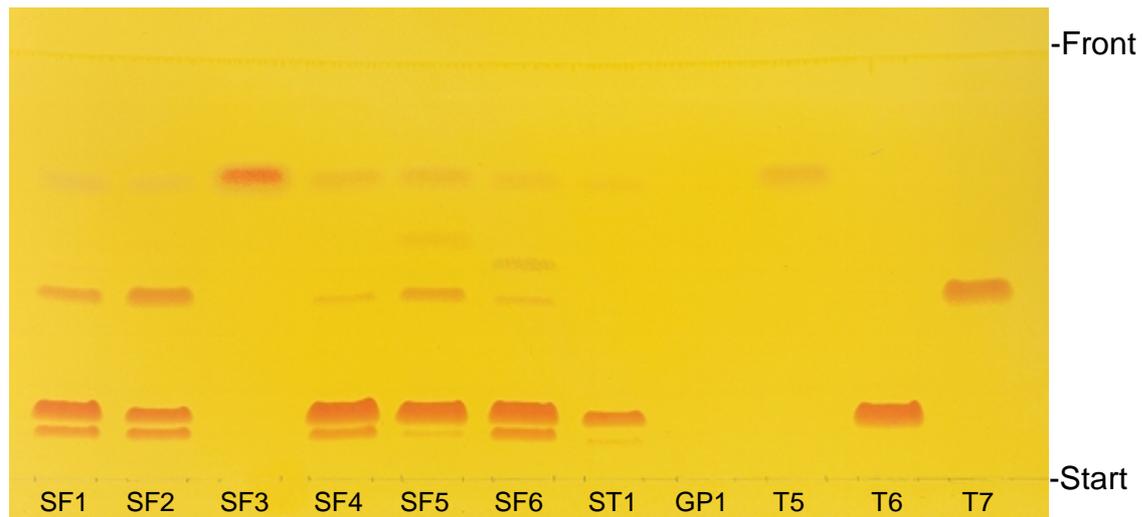


Abb. 12: DC-Prüfung auf Chargenkonformität und Vergleich des Alkaloidinhaltsstoffmusters mit den Verfälschungsdrogen *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora*, sowie Matrin, Oxymatrin und Sophoridin (T5 – T7), Auswertung im VIS nach vorheriger Detektion mit Dragendorff's Reagenz

Mit Ausnahme der Charge **SF3** fanden sich Matrin (T5) mit einem R_f -Wert von 0,72, Oxymatrin (T6) mit R_f 0,16 und Sophoridin (T7) mit R_f von 0,42 in allen *Sophora flavescens* Chargen, jedoch mit unterschiedlichem Gehalt. Die Zone mit R_f 0,12 wurde nach Vergleichen mit Literaturdaten als Oxysophocarpin identifiziert (Cui *et al.*, 1985a und 1986b). Die Drogencharge **SF3** (in Chinatown/Los Angeles gekauft) beinhaltete als einziges Alkaloid Matrin. Hier handelt es sich wahrscheinlich um eine Verfälschung oder andere Varietät von *Sophora flavescens*. Da bei der Prüfung auf Flavonoide keine Unterschiede von **SF3** zu anderen *Kushen*-Chargen aufgefallen waren, sollte bei der Identitätsprüfung auf jeden Fall das Inhaltsstoffmuster der Alkaloide überprüft werden. *Sophora tonkinensis* (**ST1**) unterschied sich von den *Sophora flavescens* Chargen durch das Fehlen von Sophoridin. Außerdem war der Gehalt an allen enthaltenen Alkaloiden geringer als bei *Kushen*. Dies war entsprechend der Literaturangaben (XIE, 1993) auch erwartet worden. Für die Unterscheidung zwischen den beiden *Sophora*-Arten ist daher nicht nur eine Untersuchung des Flavonoidmusters nötig, sondern auch die Prüfung auf Anwesenheit von Sophoridin. Bei *Glycyrrhiza pallidiflora* konnten keine Inhaltsstoffe nachgewiesen werden, die mit Dragendorff's Reagenz detektierbar sind. Somit wich diese Verfälschungsdroge sowohl vom Flavonoid- als auch

vom Alkaloidmuster eindeutig von *Sophora flavescens* ab und kann leicht detektiert werden (Abb. 12).

Aufgrund der Ergebnisse, dass die Chinolizidinalkaloide aus *Sophora flavescens* im Dekokt angereichert werden, sollte vorsichtig dosiert werden, da bei einer Überdosierung unerwünschte Nebenwirkungen, wie z.B. evtl. antiarrhythmische Wirkungen, auftreten können.

3.1.2 HPLC-Untersuchungen

Allgemeines

Während es zur HPLC-Analytik der in *Sophora flavescens* enthaltenen Flavonoide bisher noch keine Daten in der Literatur gab, lagen bereits analytische Methoden zum HPLC-Nachweis der Hauptalkaloide vor. So entwickelten Cui *et al.* (1985) eine Methode zur Detektion (UV 220 nm) von Matrin und Sophocarpin aus Chloroform-Extrakten, die mit NH_4OH versetzt worden waren mit Kieselgel als stationärer Phase und einem Methanol/Wasser Gemisch (100:32) mit Triethylamin (0,001 %) als mobiler Phase. Oxymatrin, Oxysophocarpin und Sophoridin konnten mit einem Gemisch aus Ethanol/Methanol/Hexan (12:3:4) versetzt mit konz. NH_3 (1,2 %) bei UV 220 nm detektiert werden. Für den ersten Fall stand Cinchonidin als interner Standard zur Verfügung, im letzteren wurde Atropin verwendet.

1994 wurde von einer japanischen Gruppe (JAMAMOTO *et al.*) eine Ionenpaar HPLC-Methode zur Simultanbestimmung von Matrin, Oxymatrin und Oxysophocarpin entwickelt. Dabei wurde Natriumperchlorat als Ionenpaar-Reagenz verwendet. Die mobile Phase war zusammengesetzt aus 0,05 M H_3PO_4 /Acetonitril/Methanol/ NaHClO_4 (940:50:10:20).

HPLC-Fingerprintanalyse von *Sophora flavescens*

Ein Hauptziel unserer Untersuchungen an *Sophora flavescens* war es, die Droge mittels einer zu entwickelnden HPLC-Methode zu charakterisieren und ihre Identifizierung gegenüber anderen Drogen eindeutig sicherzustellen. Hier wurde ein besonderes Augenmerk auf die Detektion der Flavonoide gelegt. Wir beschränkten uns auf die Entwicklung einer HPLC-Methode, die einfach und in kurzer Zeit Inhaltsstoffe detektierbar machen sollte. Gleichzeitig wurden online UV-Spektren von allen getrennten Peaks mittels DAD-Detektor aufgenommen. Für die Arbeiten standen mehrere Chargen von *Sophora flavescens* zur Verfügung, sowie ein *Sophora tonkinensis*- und ein *Glycyrrhiza pallidiflora*-Drogenmuster (zu Drogenherkünften siehe *Exp. Teil* S. 183).

Für die Trennungen bewährte sich Umkehrphasen-Material (RP-18) als stationäre Phase mit einem Fließmittelgradienten aus Acetonitril/Wasser als mobiler Phase. Standardmäßig wurden die Proben vor jeder Injektion durch eine Millipore® Filtereinheit vom Typ HV 0,45 µm (Porengröße) filtriert.

Zunächst wurden Chromatogramme von Extrakten unterschiedlicher Polarität verglichen, die zur Findung des optimalen Extraktionsmittels hergestellt worden waren (Abb. 13 und Abb. 145). Es konnte bereits bei der DC-Analyse festgestellt werden, dass der *n*-Hexanextrakt einen höheren Anteil an Fettsäuren enthielt, deren Zonen sich nach der Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz violett anfärbten (Abb. 9). Dies bestätigte auch die HPLC, da die UV-Spektren der Peaks mit $R_t < 26$ min nur Endabsorption aufwiesen. Wie schon bei der DC-Analyse festgestellt, waren die Inhaltsstoffmuster des Dichlormethan- und des Methanolextrakts nahezu identisch (Abb. 13 und 14). Ein Unterschied bestand lediglich darin, dass beim Methanolextrakt innerhalb der ersten drei Minuten mehrere hydrophile Substanzen eluiert wurden, die im DCM-Extrakt fehlten. Im Dekokt erschienen einige bereits in Dichlormethan- und Methanolextrakten gefundene Substanzen, jedoch quantitativ gesehen in sehr viel geringerer Menge. Die Substanzen, die zwischen 0-3 Minuten im Methanolextrakt eluiert worden waren, erschienen auch im Fingerprint des wässrigen Auszugs.

Da die untersuchten Chargen von *Sophora flavescens* einen recht einheitlichen Fingerprint bei der HPLC-Analytik zeigten, werden an dieser Stelle die

Chromatogramme der Drogencharge **SF1** beispielhaft gezeigt und erläutert. Weitere Chromatogramme anderer Drogenmuster sind im *Anhang* der Arbeit abgebildet (siehe S. 239).

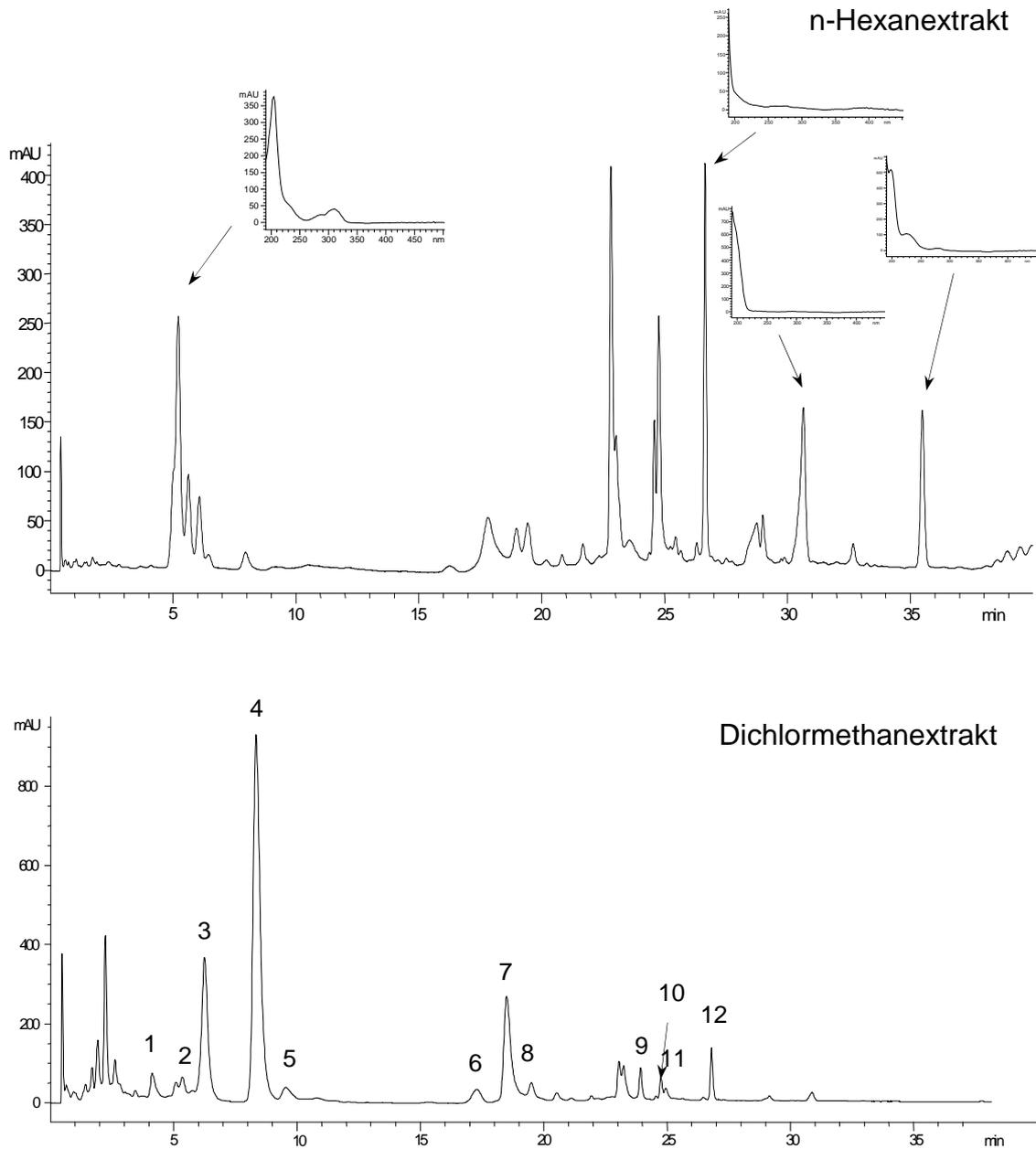


Abb. 13: HPLC-Chromatogramme von *Sophora flavescens* (Charge **SF1**) Extrakten unterschiedlicher Polarität, Detektion bei 210 nm (Konzentration 10 mg/ml Ethanol, Einspritzvolumen 10 μ l, Methode: LC1.m), für die Zuordnung der Substanzen zu den einzelnen Peaks siehe Tab. 7

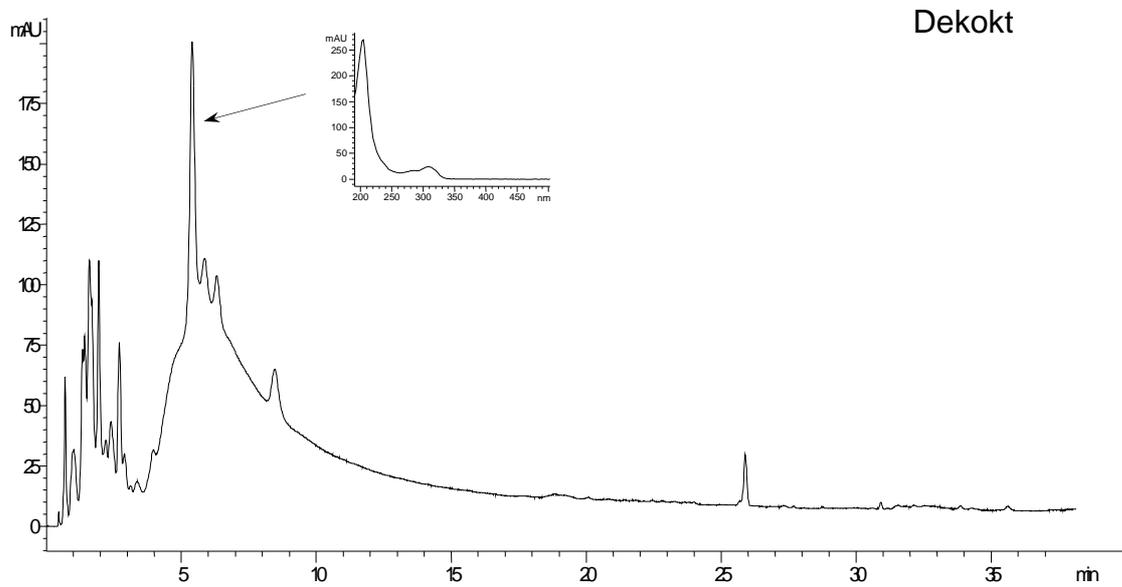
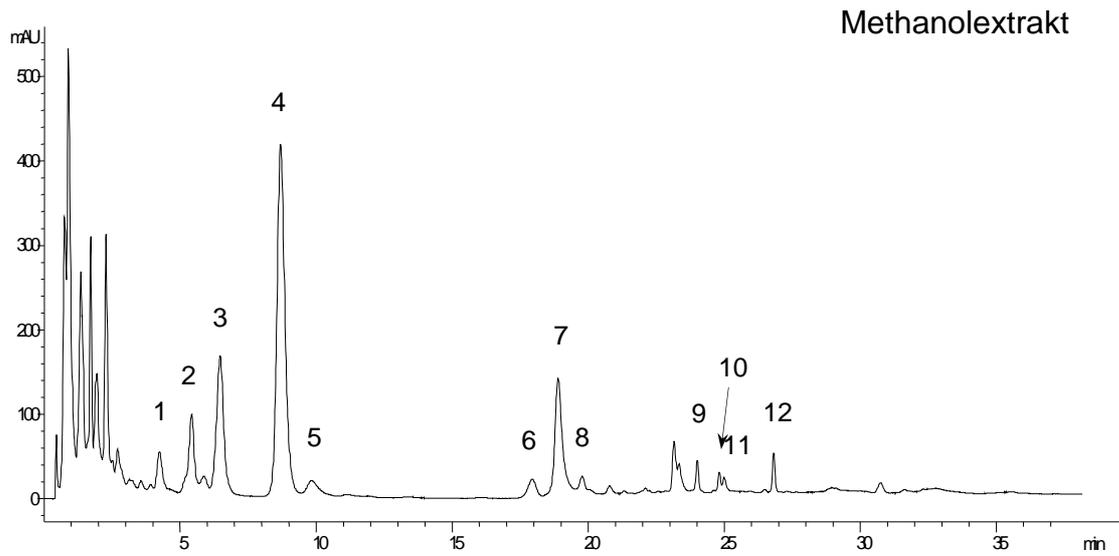


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme von Extrakten aus *Sophorae flavescens* radix (Charge **SF1**), Detektion bei 210 nm (Konzentration 10 mg/ml, Einspritzvolumen 10 μ l, Methode: LC1.m)

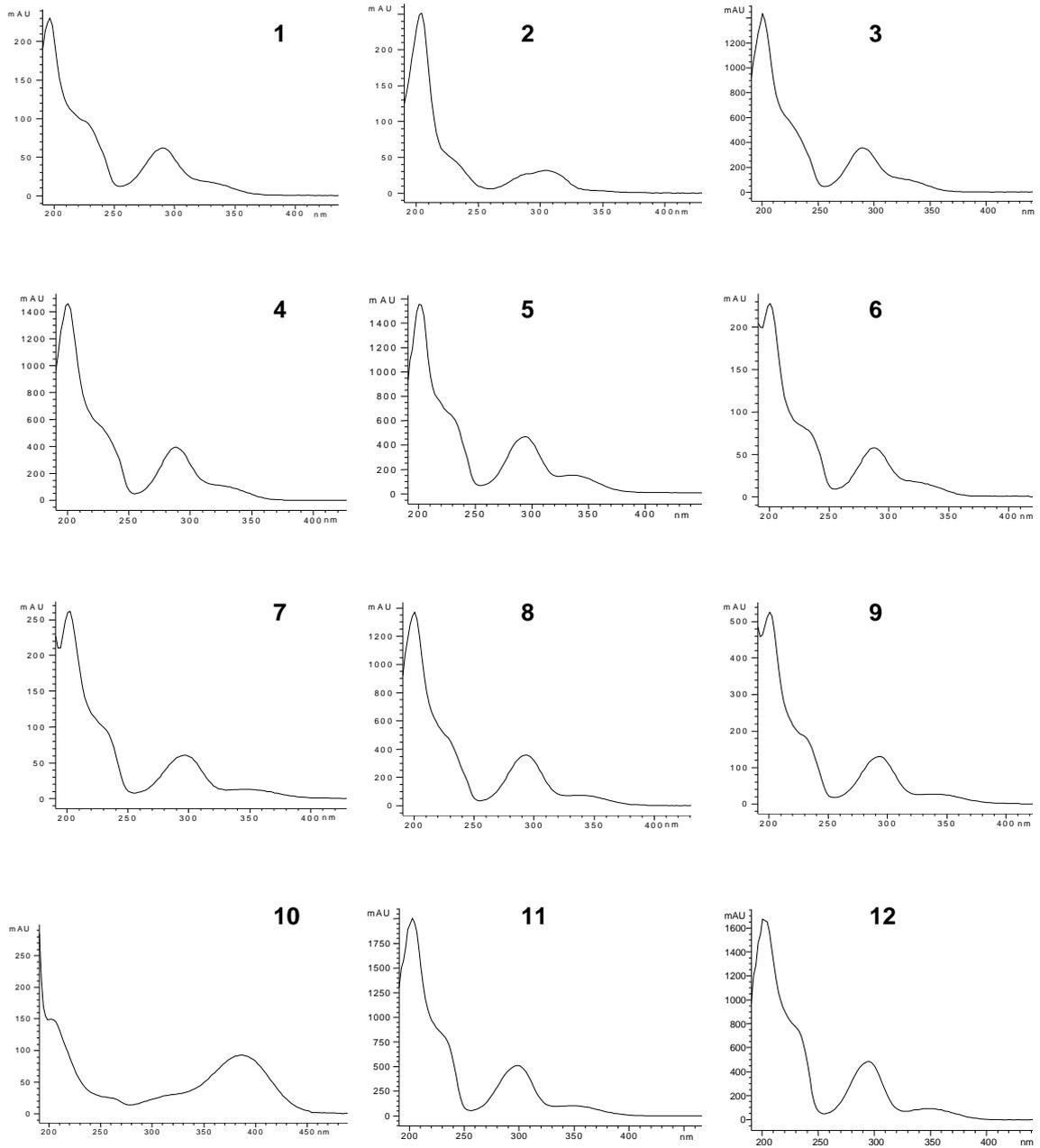


Abb. 15: Online aufgenommene DAD-UV-Spektren von Inhaltsstoffen des Dichlormethan- und Methanolextraktes aus *Sophora flavescens*

Tab. 7: Retentionszeiten (RT) der bei der HPLC-Analyse des DCM-Extraktes von *Sophora flavescens* zugeordneten Peaks der Hauptinhaltsstoffe

Peak	RT (min)	Inhaltsstoff
1	4,8	Norkurarinol
2	5,5	Maackiain
3	6,5	Kushenol I
4	8,7	Kurarinon
5	9,9	Sophoraflavanon B
6	18,1	2'-Methoxykurarinon
7	19,0	Sophoraflavanon G
8	19,9	nicht identifiziert
9	23,2	Isokurarinon
10	24,1	Kuraridin
11	24,9	Kushenol A
12	26,9	Kushenol B

Aus den erhaltenen Fingerprint-Chromatogrammen des Dichlormethan- und Methanolextraktes war ersichtlich, dass Kurarinon (Peak 4) als Hauptinhaltsstoff dominierte. Daneben waren vor allem Kushenol I und Sophoraflavanon G (Peak 3 und 7) als weitere Hauptkomponenten vertreten. Unterschiede zwischen den untersuchten Chargen fanden sich lediglich in quantitativer Hinsicht. (siehe Anhang S. 239-240) Anhand der per DAD aufgenommenen UV-Spektren der eluierten Substanzen (Abb.15) handelt es sich bei den Haupt- sowie bei den meisten anderen Nebensubstanzen um Flavanonderivate (MABRY, 1970).

Die Identifizierung aller Peaks erfolgte durch die Retentionszeit, per Cochromatographie mit isolierten und strukturell aufgeklärten Reinsubstanzen als auch durch Vergleiche der mittels DAD online aufgenommenen UV-Spektren.

Vergleichende HPLC-Untersuchungen von *S. tonkinensis* und *G. pallidiflora*-Chargen

Da die Wurzeln von *Sophora flavescens* mit denen von *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora* verwechselt werden, wurden auch mit diesen beiden Spezies entsprechende HPLC-Untersuchungen angestellt (Abb. 16). Die Chromatogramme der Verfälschungsdrogen zeigten deutliche Unterschiede zum Fingerprint von *Sophora flavescens*. Flavanonderivate oder Chalkone waren – in Übereinstimmung mit vorangegangenen Ergebnissen dünnschichtchromatographischer Untersuchungen – nicht enthalten. Dies konnte ebenfalls anhand der online aufgenommenen UV-Spektren ausgeschlossen werden. Die für Flavanone typischen Maxima bei 205 und 295 nm, sowie für Chalkone bei 205 und 395 nm waren in den UV-Spektren der anderen Drogen *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora* nicht zu finden. Somit kann *Sophora flavescens* von den anderen beiden Spezies auch mittels der HPLC-Analyse eindeutig abgegrenzt werden.

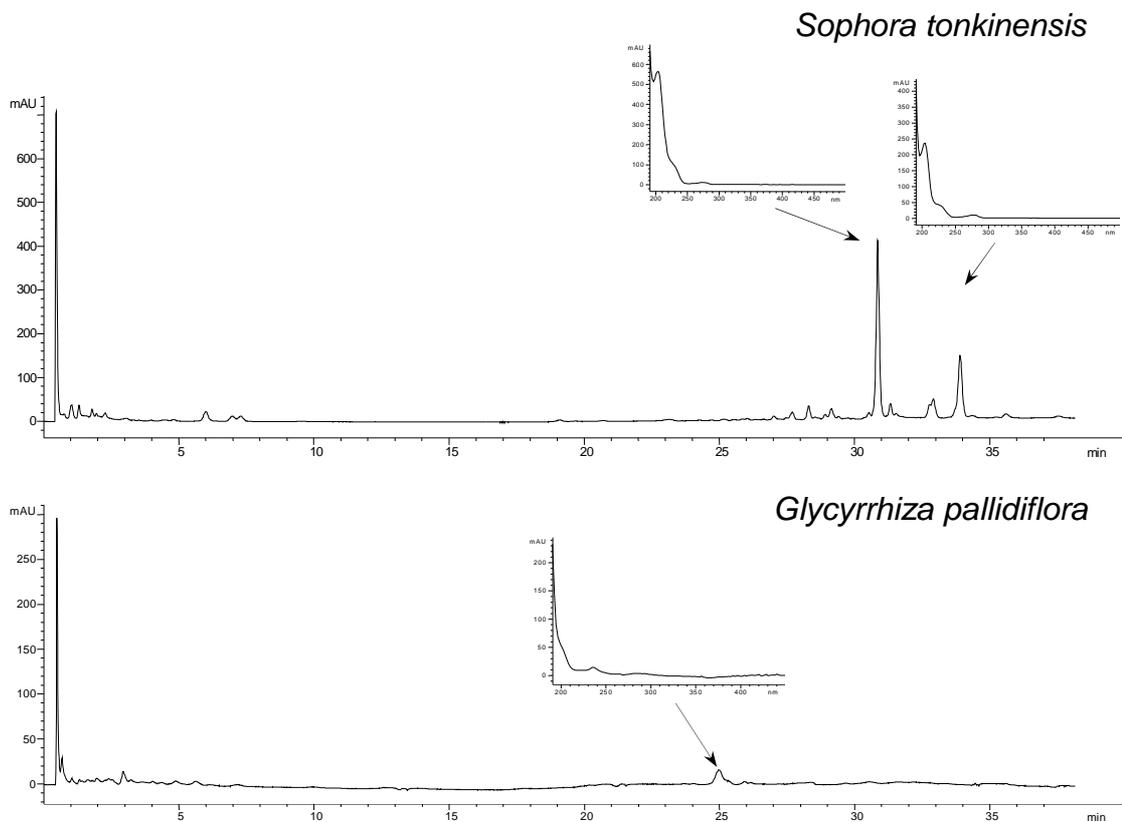


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme von DCM-Extrakten aus *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora* Drogenmustern (Konzentration 10 mg/ml Ethanol, Einspritzvolumen 10 μ l, Detektion bei 210 nm, Methode: LC1.m) mit online aufgenommenen UV-Spektren

3.2 Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe von *Sophora flavescens*

Um die Relevanz der einzelnen Inhaltsstoffe für die Wirkung der Extrakte abschätzen zu können wurden die Hauptinhaltsstoffe quantifiziert. Die Gehaltsbestimmung von Norkurarinol, Kushenol I, Kurarinon, 2'-Methoxykurarinon und Sophoraflavanon G wurde mittels HPLC-Analyse durchgeführt. Dabei erfolgte die Quantifizierung der Inhaltsstoffe in den Dichlormethanextrakten mit externem Standard. Die Eichgeraden der einzelnen Inhaltsstoffe wurden erstellt, indem fünf bzw. sechs verschiedene Konzentrationen pro isoliertem Reinstoff jeweils zweimal in die HPLC eingespritzt wurden. Anschließend wurde aus den jeweiligen Mittelwerten der eingespritzten Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den entsprechenden Peakflächen (mAUs) mittels linearer Regression eine Eichgerade erzeugt, deren Steigung den jeweiligen stoffspezifischen Eichfaktor darstellte. Der Korrelationskoeffizient drückte aus, wie weit die einzelnen Messpunkte von der Geraden abweichen.

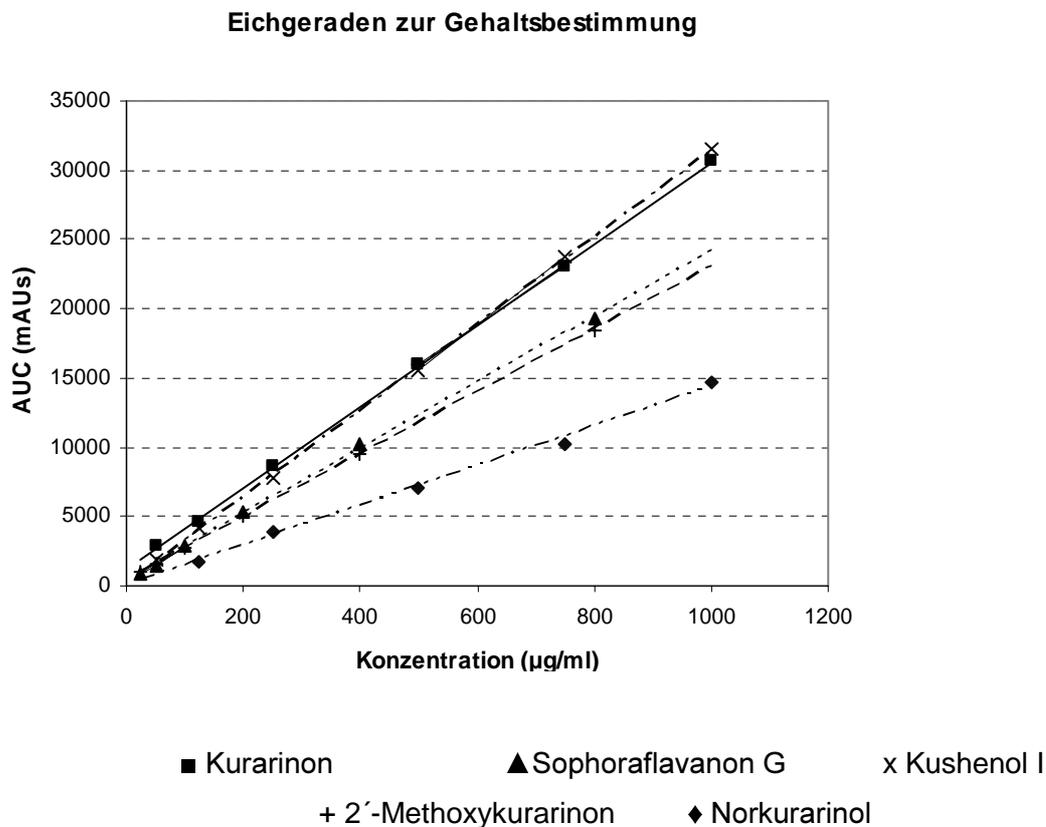


Abb. 17: Eichgeraden der Hauptinhaltsstoffe zur Bestimmung der jeweiligen substanzspezifischen Eichfaktoren

Tab. 8: Eichfaktoren und Korrelationskoeffizienten der zu Gehaltsbestimmungen herangezogenen Inhaltsstoffe

Inhaltsstoff	Eichfaktor	Korrelationskoeffizient
Norkurarinol	14,3	0,9947
2'-Methoxykurarinon	22,5	0,9999
Sophoraflavanon G	23,0	0,9992
Kurarinon	29,4	0,9997
Kushenol I	31,3	0,9997

Von jedem Drogenmuster wurden zwei Dichlormethanextrakte hergestellt (siehe *Exp. Teil* S. 196), die unter gleichen Bedingungen wie die Reinstoffe per HPLC analysiert wurden. Abb. 18 und Tab. 9 zeigt den Gehalt der fünf Hauptinhaltsstoffe in den jeweiligen Drogenmustern.

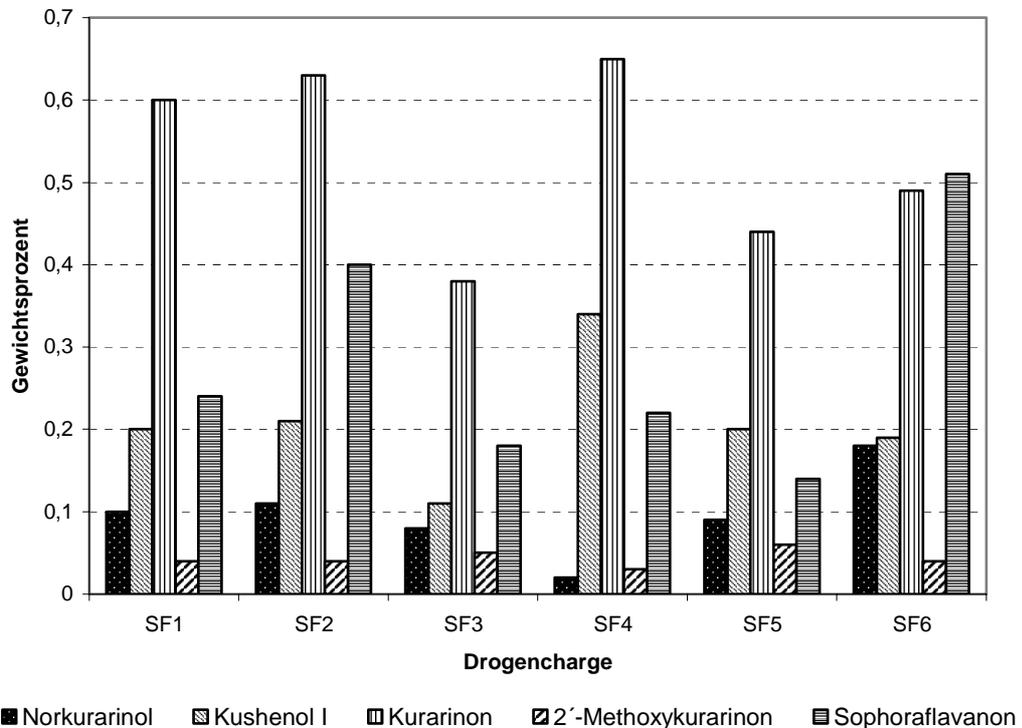


Abb. 18: Gehalt der Hauptinhaltsstoffe in den einzelnen Drogenchargen (SF1 – SF6) in Gewichtsprozent bezogen auf die getrocknete Droge

Tab. 9: Gehalt der Hauptinhaltsstoffe in den einzelnen Drogenchargen (**SF1** – **SF6**) in Gewichtsprozent bezogen auf die getrocknete Droge

Inhaltsstoff	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	Mittelwert
Norkurarinol	0,10	0,11	0,08	0,02	0,09	0,18	0,097±0,08
Kushenol I	0,20	0,21	0,11	0,34	0,20	0,19	0,21±0,13
Kurarinon	0,60	0,63	0,38	0,65	0,44	0,49	0,53±0,12
2'-Methoxykurarinon	0,04	0,04	0,05	0,03	0,06	0,04	0,04±0,003
Sophoraflavanon G	0,24	0,40	0,18	0,22	0,14	0,51	0,28±0,23

Der Hauptinhaltsstoff Kurarinon dominierte in allen untersuchten Drogenmustern mit einem Gehalt von durchschnittlich 0,53 % ± 0,12 % (Abb. 18). Dies bestätigte die Ergebnisse der qualitativen DC-Analysen. Die übrigen untersuchten Inhaltsstoffe schwankten mehr oder weniger stark in ihren Gehalten. Diese Unterschiede waren am deutlichsten bei Norkurarinol. Während **SF6** einen Gehalt von 0,18 % Norkurarinol aufwies, konnten bei **SF4** lediglich 0,02 % nachgewiesen werden. Auch das quantitative Vorkommen von Kushenol I variierte in den unterschiedlichen Drogenchargen. Die Drogenmuster **SF4** und **SF5** (beide über die TCM-Klinik in Kötzting bezogen) enthielten im Gegensatz zu den von chinesischen Quellen erhaltenen Chargen mehr Kushenol I als Sophoraflavanon G. Sophoraflavanon G stellte sogar die Hauptsubstanz in **SF6** dar. In den Extrakten von **SF1** – **SF3** dominierte der Inhaltsstoff Kurarinon. Der Gehalt von 2'-Methoxykurarinon war in allen untersuchten Drogenchargen nahezu gleich.

Das Droge/Extrakt-Verhältnis (DEV) der Dichlormethanauszüge lag durchschnittlich bei 30,3:1 (g:g) (Tab. 10). Die berechneten Werte bezogen sich dabei auf die getrocknete Droge.

Tab. 10: DEV der DCM-Extrakte unterschiedlicher Drogenmuster (**SF1**–**SF6**)

Charge	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6
DEV	32,7:1	22,8:1	33,6:1	33,3:1	42,4:1	24,9:1

Damit ergaben sich für die getrockneten Dichlormethanextrakte Gehaltswerte für Kurarinon zwischen 9,19 % (**SF6**) und 22,7 % (**SF1**), im Falle von Sophoraflavanon G von 4,41 % (**SF6**) bis 9,77 % (**SF2**). Der mengenmäßige Anteil von 2'-Methoxykurarinon lag zwischen 1,02 % (**SF1**) und 1,51 % (**SF2**). Norkurarinol und Kushenol I waren in den Extrakten mit 2,15 % \pm 1,18 % bzw. 5,73 % \pm 3,29 % vertreten.

4. Pharmakologische Untersuchungen

4.1 Auswahlkriterien von *Sophora flavescens* als 5-Lipoxygenase Inhibitor

In einem breit angelegten Screening wurden 58 Drogen, die in der traditionellen chinesischen Medizin bei entzündlichen Erkrankungen der Gelenke und/oder der Atemwege angewendet werden, bezüglich ihrer Hemmung auf die Leukotrienbiosynthese getestet.

Von jeder Droge wurden *n*-Hexan- und Dichlormethanextrakte hergestellt und bei einer Screeningkonzentration von 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml im pharmakologischen Testsystem eingesetzt (Paulus, 1999). Unter den getesteten Drogen fiel *Sophora flavescens* durch starke Hemmwirkung auf, so dass eine weitere Untersuchung der Droge aussichtsreich erschien.

4.2 Eingesetzte Testsysteme

Die Hemmwirkung sämtlicher im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Extrakte von *Sophora flavescens* wurde in einem routinemäßig durchgeführten 5-LOX-Assay getestet. Wie schon in Kap. 1.1. (S. 2) beschrieben, dienten die Ergebnisse dieses Assays als Orientierung für die Auswahl geeigneter Extrakte und für die Isolierung von Inhaltsstoffen. Zudem wurde eine Vielzahl der isolierten Reinsubstanzen auf eine Hemmung der Cyclooxygenasen-1/-2 getestet. Sowohl die Lipoxygenase als auch die Cyclooxygenasen nehmen eine Schlüsselposition beim Metabolismus von Arachidonsäure zu den Leukotrienen und Prostaglandinen ein und haben somit Einfluss auf die Symptome von Asthma und anderen entzündlichen Erkrankungen. Die eingesetzten Testsysteme beruhten auf Messungen der Umsetzungsrate von Arachidonsäure durch quantitative Erfassungen des gebildeten Leukotriens B₄ bzw. Prostaglandins E₂. Dies erfolgte mittels spektralphotometrisch auswertbarer Enzym-Immuno-Assays (EIA).

Der 5-LOX-Assay wurde erst im Verlauf dieser Arbeit als ELISA-Testsystem (Methode B) etabliert (Paulus, 1999). Deshalb wurden die zu Beginn der Arbeit

getesteten Extrakte noch in einem Testsystem mit radioaktiv markierter ^{14}C -Arachidonsäure (Methode A) nach Fessler (1988) getestet. Der Vorteil der Methode B besteht darin, dass nunmehr auf den Einsatz von radioaktivem Material verzichtet werden kann. Zudem ist schon allein mit der Testdurchführung im Mikrotitermaßstab eine extreme Einsparung an Lösungsmitteln verbunden. Neben einer Erhöhung des Probendurchsatzes erfordert die Testdurchführung erheblich weniger Arbeitszeit und ist automatisierbar.

Bei allen eingesetzten Testsystemen handelt es sich um *in vitro* Systeme. Für den 5-Lipoxygenase-Test wurden Zellsuspensionen eingesetzt, die Untersuchungen zur COX-1/-2-Inhibition fanden an isolierten Reinenzymen statt.

4.3 Die Hemmung der Leukotrienbiosynthese

Im Gegensatz zu den COX-Tests wurde beim 5-Lipoxygenasetest mit frischen intakten Schweineleukozyten gearbeitet. Der Verlauf der Umsetzung in diesen tierischen Zellen ist ähnlich zu dem im menschlichen Organismus. Der Vorteil des Einsatzes lebender Zellen besteht darin, dass lediglich Substanzen, die in der Lage sind, durch die Zellmembran zu penetrieren, eine Wirkung hervorrufen können (zur genauen Testbeschreibung siehe *Exp. Teil* S. 214 ff.). Der Reaktionsansatz enthielt neben der Zellsuspension Ca^{2+} -Ionen, Calciumionophor und ETYA (5,8,11,14-Eicosatetraensäure). Die Ca^{2+} -Ionen (in Form von CaCl_2) und Calciumionophor waren als Cofaktoren für die Aktivierung der cytosolischen 5-Lipoxygenase, für ihre Translokation an die Zellmembran und die Bindung an das FLAP (**F**ive **L**ipoxygenase **A**ctivating **P**rotein, ein Transmembranprotein) notwendig. ETYA dient der Hemmung der vorhandenen 12-Lipoxygenase und führt damit zu einer verminderten Bildung von Arachidonsäuremetaboliten (Sun *et al.*, 1981 und Corey *et al.*, 1984). Die Umsetzungsreaktion wurde durch Zugabe von Arachidonsäure gestartet.

Für die Bestimmung der Hemmung der Leukotrienbiosynthese standen zwei Methoden (Methode A und B) zur Verfügung.

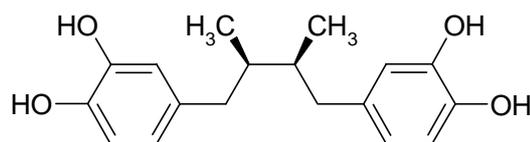
Bei der Methode A mit dem Einsatz von ^{14}C -Arachidonsäure als Substrat wurden im Anschluss an die Inkubation das Substrat und die Metabolite mit Hilfe von Ethylacetat aus dem Reaktionsansatz extrahiert. Die Detektion erfolgte mittels RP-HPLC-Untersuchung. Dazu wurde bei jeder Probe das

Lösungsmittel (Ethylacetat) eliminiert und die Probe mit einer definierten Menge Ethanol aufgenommen.

Beim Mikrotiteransatz (Methode B) wurde mit „kalter“ Arachidonsäure gearbeitet, nach 10 Minuten die Reaktion mit Ameisensäure gestoppt, zelluläre Bestandteile durch Zentrifugation der Mikrotiterplatte entfernt und die gebildete Menge an LTB₄ mittels EIA bestimmt.

Der verwendete 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 Antikörpern konkurriert. Die resultierenden Antikörper-LTB₄-Komplexe reagieren mit fixierten Antikörpern. Nach einer vorgegebenen Zeit werden ungebundene Bestandteile durch Waschen entfernt und das Verhältnis LTB₄/markiertes LTB₄ durch eine enzymatische Farbreaktion (mit Nitrophenol als Substrat) photometrisch bestimmt. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur LTB₄-Konzentration.

Neben dem Kontrollansatz ohne Inhibitor wurde zusätzlich ein bekannter Hemmstoff (Nordihydroguaijarsäure, NDGA, IC₅₀ = 0,5 µM) als Positivkontrolle mitgetestet.



Nordihydroguaijarsäure

Abb. 18: Strukturformel von NDGA, der Positivkontrolle im eingesetzten 5-LOX-Test

4.3.1 Vergleichende Untersuchungen von Extrakten aus den Wurzeln von *Sophora flavescens* mit unterschiedlicher Polarität

Zur Auswahl eines unter pharmakologischen Gesichtspunkten am besten geeigneten Extraktionsmittels wurden zunächst sukzessiv hergestellte Extrakte unterschiedlicher Polarität mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol hergestellt und hinsichtlich ihrer Hemmung im 5-Lipoxygenasetest untersucht.

5-LOX-Hemmung von sukzessiv hergestellten Extrakten

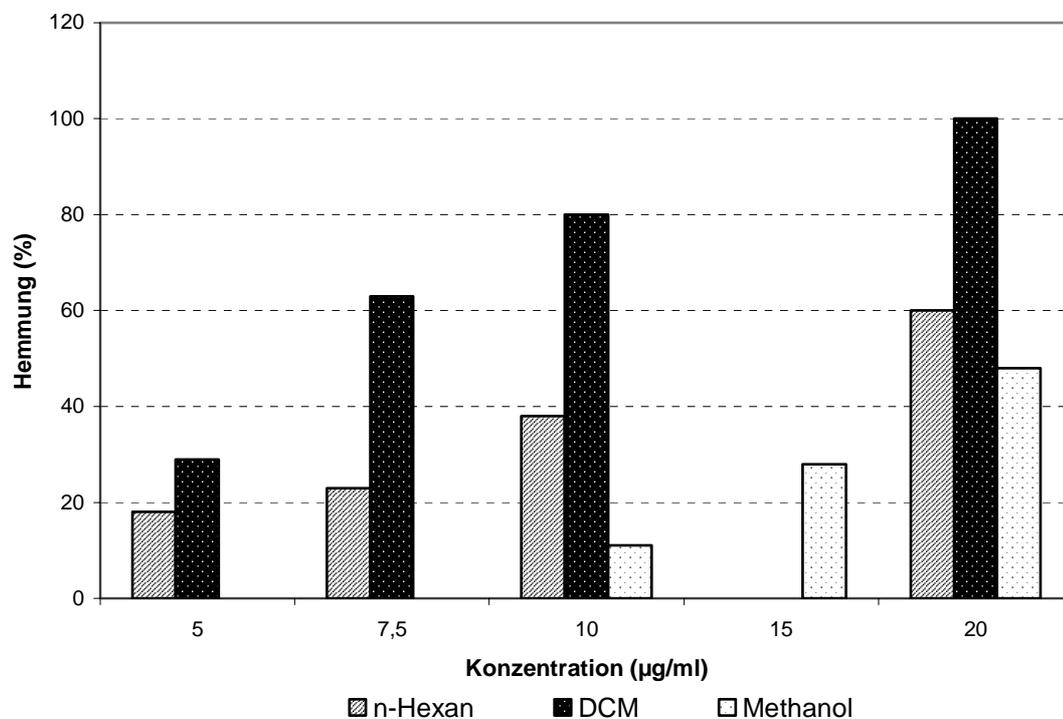


Abb. 19 und Tab. 11: 5-LOX-Inhibition von sukzessiv hergestellten Extrakten; angegeben ist die Hemmung in % bei den jeweils getesteten Konzentrationen (µg/ml Testansatz); n.g.= nicht getestet

eingesetzte Testkonzentration

Extrakt	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
n-Hexan	18 ± 8	23 ± 5	38 ± 7	n.g.	60 ± 11	15,0
DCM	29 ± 6	63 ± 9	80 ± 9	n.g.	100	6,5
Methanol	n.g.	n.g.	11 ± 8	28 ± 2	48 ± 6	21,5

Die Testergebnisse ergaben, dass der mit Dichlormethan hergestellte Extrakt die beste Wirksamkeit bezüglich der Hemmung der Leukotrienbildung zeigte. Der halbmaximale Hemmwert (IC_{50}) betrug 6,5 $\mu\text{g/ml}$ Testansatz. Auch der *n*-Hexanextrakt war mit einem IC_{50} -Wert von 15 $\mu\text{g/ml}$ sehr gut wirksam, jedoch deutlich schwächer als der DCM-Extrakt. Beim Methanolextrakt war erst bei einer höheren Konzentration eine inhibitorische Aktivität festzustellen.

Aus den Testergebnissen resultierte, dass der Dichlormethanextrakt zur weiteren Bearbeitung der Droge herangezogen werden sollte.

4.3.2 Zur Wirkung der einzelnen Fraktionen des Dichlormethanextraktes

Zur wirkungsorientierten Fraktionierung der Wurzel Droge von *Sophora flavescens* wurde der Dichlormethanextrakt mittels Vakuumflüssigchromatographie mit *n*-Hexan/Ethylacetat an Kieselgel zunächst in einundzwanzig Grobfraktionen aufgetrennt, die jeweils zur Testung eingesetzt wurden. Die Fraktionen 1-7 wiesen keine oder nur schwache Hemmeigenschaften auf (die Fraktionen 1-6 zeigten keine Hemmung bei einer Testkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Testansatz, Fraktion 7 hemmte lediglich mit 42,7 % bei einer eingesetzten Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$), daher wurde in diesen Fällen kein IC_{50} -Wert bestimmt. Bei allen anderen Fraktionen wurde die halbmaximale Hemmkonzentration mit computergestützter Auswertung über die beiden Parameter Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden bestimmt. Die Geraden wurden aus den ermittelten Hemmkonzentrationen im eingesetzten Testsystem erstellt (Tab. 12).

Nachdem die einzelnen Fraktionen (1-21) phytochemisch per DC und HPLC untersucht worden waren, wurden sie zu acht Grobfraktionen (I-VIII) vereinigt.

Bei der Testung der einzelnen Fraktionen fiel die starke Hemmung durch die Grobfraktionen V, VI und VIII auf. Diese Fraktionen mussten also besonders potente Inhaltsstoffe enthalten.

Tab. 12: Hemmungen [%] der Leukotrienbiosynthese durch die Fraktionen nach VLC-Trennung des Dichlormethanextraktes, sowie dazu berechnete IC₅₀-Werte in µg/ml Testansatz

Grobfrakt.	Fraktion	eingesetzte Testkonzentration (µg/ml)						IC ₅₀ (µg/ml)
		25	15	10	8,3	7,5	5	
I	1-6	ohne						
	7	42,7						
II	8	59,4	29,4	14,3				21,2
III	9	76,6	22,9	18,9				18,3
IV	10	96,5	80,7	52,8	33,0			10,0
V	11		95,5		81,7	66,3	31,9	5,9
	12	93,1		69,2	64,7	52,8	45,8	5,7
VI	13		88,2	78,3		46,6	28,0	7,3
	14		79,6	72,5	64,4		37,7	6,3
VII	15	73,2	57,0	50,1	49,5	47,1		9,2
	16		69,5	57,0	47,0	38,6	35,3	8,7
	17	87,3	74,4	63,2	49,8			7,4
VIII	18		94,6		70,0	65,3	50,2	5,1
	19	88,2	79,6	61,4	52,7			7,1
	20		82,3	74,7		35,0		8,4
	21		76,2	48,9		30,6		10,1

4.3.3 Die Wirkung der aus *Sophora flavescens* isolierten Reinsubstanzen

Alle aus *Sophora flavescens* isolierten Reinstoffe wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf die Leukotrienbiosynthese untersucht. Die Ergebnisse der jeweils getesteten Konzentrationen eines Hemmstoffes wurden gemittelt und sind in Abb. 20 bis Abb. 23 graphisch dargestellt. In der Regel wurden Testwerte von vier unterschiedlichen Konzentrationen zur Erstellung der Graphen herangezogen. Nach semilogarithmischer Auftragung der jeweiligen Hemmkonzentrationen wurde eine Regressionsgerade durch die Punkte gelegt. Anschließend konnte der entsprechende IC₅₀-Wert berechnet werden.

Testung der Pterocarpanderivate

Bei der Untersuchung der Pterocarpanderivate zeigten sich selbst bei einer Konzentration von 50 µmol/ml Testansatz nur moderate Hemmstärken, was

auch durch IC_{50} -Werte von 32,8 - 48,6 μM ausgedrückt wird (Tab. 13). In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Substanzen alle in Grobfractionen II und III fanden, also in Fractionen, die nicht zu den potentesten des Dichlormethan-extraktes gehörten, war es nicht verwunderlich, dass stärker wirksame Inhibitoren noch zu finden waren, denen dann auch die Extraktwirkung zugeschrieben werden konnte. Die isolierten Pterocarpane trugen aber sicherlich zur Extraktwirkung bei.

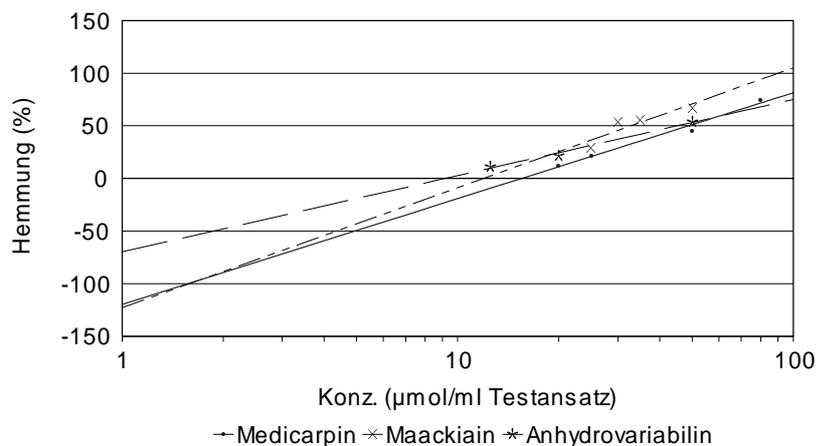


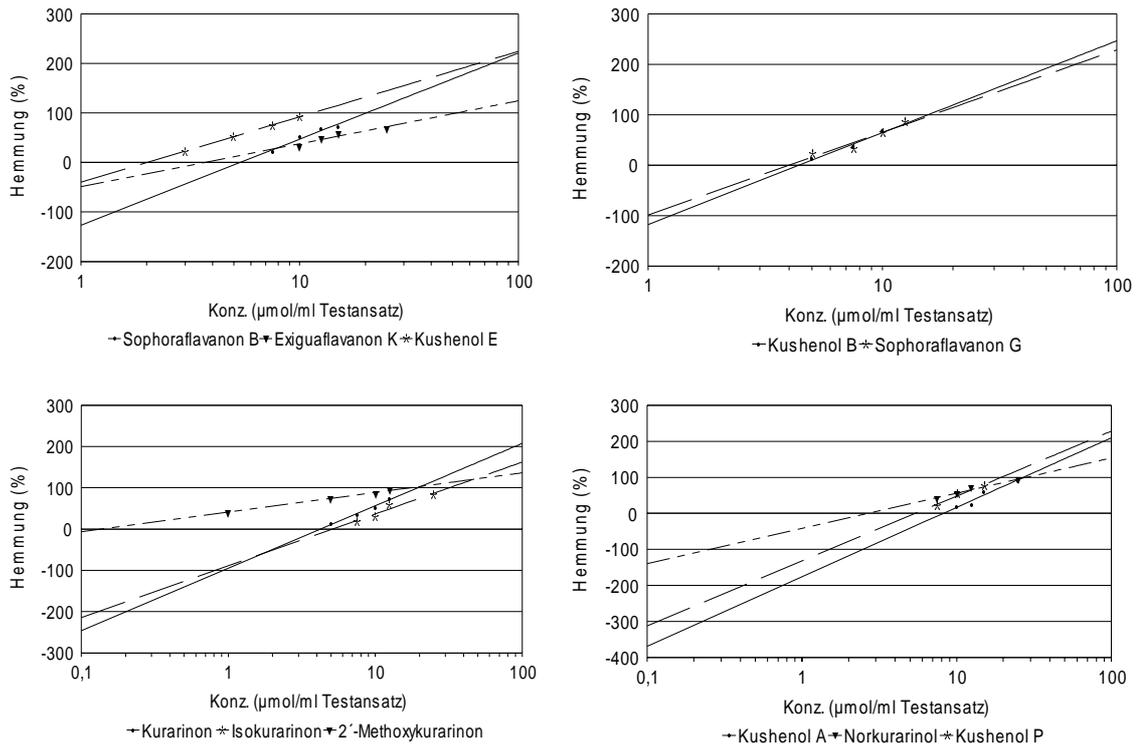
Abb. 20: Graphen zur IC_{50} -Wertbestimmung von Pterocarpanen

Tab. 13: IC_{50} -Werte der isolierten Pterocarpanderivate aus *Sophora flavescens*

Hemmstoff	IC_{50} -Wert (μM)
Maackiain (PT1)	32,8
Medicarpin (PT2)	48,6
Anhydrovariabilin (PT3)	45,0

Wirkungen der Flavanonderivate

Die größte Gruppe der isolierten Substanzen stellten Flavanonderivate (FL1 - FL11). Wie aus den graphischen Darstellungen in Abb. 21 und Tab. 14 zu entnehmen ist, zeigten diese Inhaltsstoffe sehr starke Hemmwirkungen, die stets im unteren mikromolaren Bereich lagen.

Abb. 21: Graphen zur IC_{50} -Bestimmung von FlavanonenTab. 14: IC_{50} -Werte der isolierten Flavanonderivate aus *Sophora flavescens*

Hemmstoff	IC_{50} (μM)	Hemmstoff	IC_{50} (μM)
Sophoraflavanon B (FL1)	10,4	Isokurarinon (FL7)	12,8
Exiguaflavanon K (FL2)	13,9	2'-Methoxykurarinon (FL8)	1,5
Kushenol E (FL3)	4,8	Kushenol A (FL9)	14,8
Kushenol B (FL4)	8,3	Norkurarinol (FL10)	8,7
Sophoraflavanon G (FL5)	8,1	Kushenol P (FL11)	10,2
Kurarinon (FL6)	9,2		

Mit einem IC_{50} -Wert von 1,5 μM war 2'-Methoxykurarinon (FL8) die aktivste Verbindung nicht nur unter den Flavanonen, sondern auch von allen aus *Sophora flavescens* isolierten Inhaltsstoffen. Die Hemmwirkung dieses Flavanonderivates lag damit in der Größenordnung der jeweils mit eingesetzten Positivkontrolle Nordihydroguaiaretsäure ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$). 2'-Methoxykurarinon wurde aus der Grobfraktion VIII isoliert. Schaut man sich die Hemmwirkung der Fraktion an, lässt sich feststellen, dass es sich hierbei um eine der aktivsten

Fraktionen des DCM-Extraktes handelt. Daher liegt nahe, dass 2'-Methoxykurarinon einen entscheidenden Beitrag zur Wirkung dieser Fraktion und damit auch des Extraktes im 5-LOX-Assay leistet.

Darüber hinaus zeichneten sich auch die Hauptinhaltsstoffe des DCM-Extraktes, Sophoraflavanon G und Kurarinon, als sehr potente Inhibitoren der Leukotrienbiosynthese aus, mit IC_{50} -Werten von 10,4 μ M bzw. 9,2 μ M. Sophoraflavanon G wurde aus der Grobfraktion V isoliert, die mit einem IC_{50} -Wert von 5,9 μ g/ml Testansatz im eingesetzten Assay sehr stark wirksam war. Auch diese Substanz ist damit wesentlich für die sehr gute Hemmwirkung der Grobfraktion verantwortlich, nicht zuletzt durch die Tatsache, dass die Verbindung auch mit Abstand den Hauptinhaltsstoff der Fraktion stellte. Diese Tatsache konnte anhand eines HPLC-Chromatogramms, das von der Fraktion V aufgenommen worden war, erkannt werden. Ähnlich verhielt es sich mit Kurarinon, dem quantitativ dominierenden Inhaltsstoff des Dichlormethanextraktes. Auch dessen sehr gute Wirkung im 5-LOX-Test ist sicherlich nicht nur für die Wirkung der Grobfraktion, sondern auch wesentlich für die Extraktwirkung mitverantwortlich.

Die anderen Flavanonderivate zeigten mit IC_{50} -Werten von 4,8 μ M - 14,8 μ M ebenfalls sehr starke Hemmwirkungen und waren an der Wirkung der jeweiligen Fraktionen und des Gesamtextraktes beteiligt. Allerdings war deren Einfluss auf die Extraktwirkungen im Vergleich zu den Hauptsubstanzen schon allein aufgrund des niedrigeren Gehaltes geringer.

Testung der Flavanonderivate

Etwa genauso gut wirksam wie die Flavanone waren die beiden isolierten Flavanone Kushenol I und Kushenol M. Im eingesetzten Assay wurden beinahe identische IC_{50} -Werte von 9,3 μ M und 8,4 μ M ermittelt. Somit hat die zusätzlich vorhandene Hydroxylgruppe im Ring C (an C-3) weder einen wirkungssteigernden Effekt noch konnte ein Wirkungsverlust festgestellt werden. Da auch Kushenol I eine der Hauptkomponenten des Dichlormethanextraktes darstellt, ist auch bei dieser Substanz von einer Beteiligung an der Gesamtwirkung auszugehen.

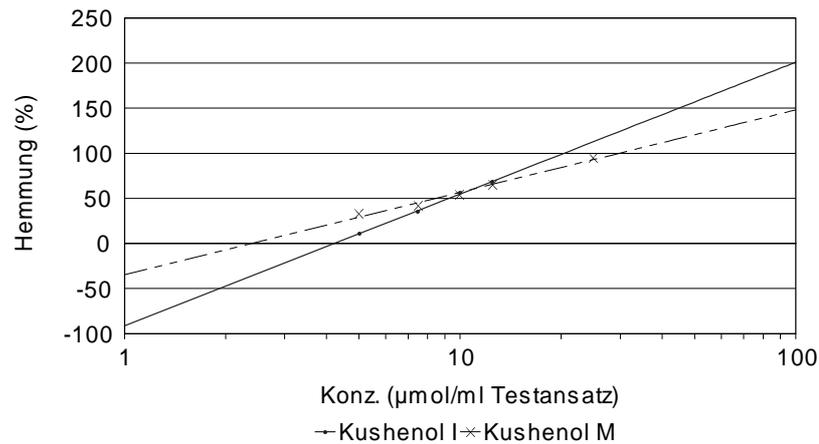


Abb. 22: Graphen zur IC_{50} -Wertbestimmung von Flavanonolen

Tab. 15: IC_{50} -Werte der isolierten Flavanonolderivate aus *Sophora flavescens*

Hemmstoff	IC_{50} (µM)
Kushenol I (FL12)	9,3
Kushenol M (FL13)	8,4

Testung der Chalkonderivate

Etwas schwächer wirksam als die Flavanon- und Flavanonolderivate waren die getesteten Chalkone. Hier ergaben sich IC_{50} -Werte von 22,3 µM - 29,4 µM. Die der Berechnung der halbmaximalen Hemmkonzentration zugrunde gelegten Testergebnisse zeigten in den jeweils eingesetzten Konzentrationen höhere Schwankungen als bei den anderen getesteten Substanzen, so dass mindestens fünf oder sechs Werte zur Mittelwertfindung nötig waren (Testergebnisse der Hemmungen bei den jeweils eingesetzten Konzentrationen siehe Anhang der Arbeit).

Aufgrund der Hemmwerte (IC_{50} -Werte zwischen 22,3 µM und 29,4 µM) haben die Chalkone wohl eher einen geringen Effekt bei der Wirkung des Gesamtextraktes.

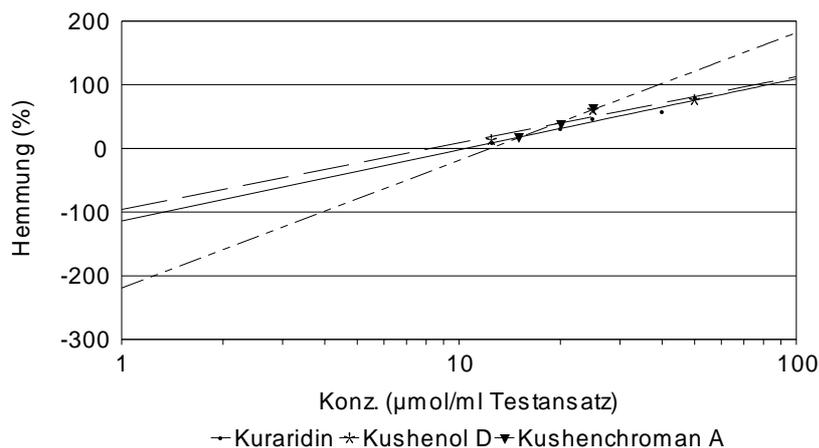


Abb. 23: Graphen zur IC_{50} -Wertbestimmung von Chalkonderivaten

Tab. 16: IC_{50} -Werte der isolierten Chalkonderivate aus *Sophora flavescens*

Hemmstoff	IC_{50} (μM)
Kushenol D (CH1)	25,0
Kuraridin (CH2)	29,4
Kushenchroman A (CH3)	22,3

4.3.4 Hemmwirkungen weiterer Inhaltsstoffe, die aus *Sophora flavescens* isoliert wurden

Die weiteren Inhaltsstoffe, die aus der Wurzeldroge von *Sophora flavescens* isoliert werden konnten, waren zum einen das Isoflavon Biochanin A, zum anderen das Cumarinderivat 3,6-Dihydroxycumarin.

Nach der Testung von Biochanin A konnte ein IC_{50} -Wert von 17,7 μM berechnet werden. Da der Inhaltsstoff nur in sehr geringer Menge im Extrakt enthalten war (es wurden lediglich 1,1 mg isoliert), kann man davon ausgehen, dass Biochanin A nur einen sehr geringen Beitrag zur Extraktwirkung leistet. Zudem zählt die Substanz nicht zu den aktivsten Verbindungen, die isoliert wurden.

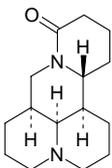
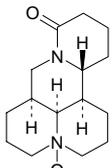
3,6-Dihydroxycumarin fiel bei der Isolierung von 2'-Methoxykurarinon mit an, war also nicht gezielt wirkungsorientiert isoliert worden. Bei einer Testkonzentration von 25 μM zeigte das Cumarinderivat keine inhibitorischen Eigenschaften, dürfte also auf die hemmende Aktivität der Grobfraction VII oder

des DCM-Extraktes keinen direkten Einfluss haben. Andere Cumarine, wie z. B. Umbelliferon, Osthol oder Osthenol waren bereits früher im Arbeitskreis getestet worden. Dabei zeigten nur solche eine inhibitorische Aktivität, die in Position C-8 alkyliert waren (z.B. Osthol und Osthenol; Liu *et al.*, 1998). Damit wurde das Ergebnis von Liu *et al.* bestätigt.

4.3.5 Hemmwirkungen von Alkaloiden aus *Sophora flavescens*

In der Literatur finden sich zahlreiche pharmakologische Untersuchungen zu den Alkaloiden Matrin und Oxymatrin, die in *Sophora flavescens* vorkommen. Wie bereits im *Allgemeinen Teil* der Arbeit beschrieben, wurden diese Alkaloide unter anderem auch auf ihre antiasthmatische Aktivität untersucht (Xie *et al.*, 1983; Xie *et al.*, 1981; Massey *et al.*, 1984). Somit war es von Interesse zu prüfen, ob diese antiasthmatische Wirkung im Zusammenhang mit der Hemmung der Leukotrienbiosynthese steht.

Tab. 17: IC₅₀-Werte der Chinolizidinalkaloide aus *Sophora flavescens*

Hemmstoff	IC ₅₀ (µM)
 Matrin	23,7
 Oxymatrin	70,9

Die beiden untersuchten Chinolizidinalkaloide (Tab. 17) sind als moderate (Matrin) bis schwache (Oxymatrin) Inhibitoren einzustufen. Dabei zeigte Matrin im eingesetzten Testsystem eine höhere Aktivität als Oxymatrin. Das Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten, die in der Literatur beschrieben wurden. Auch dort wurden dem Matrin im Gegensatz zu Oxymatrin positive Effekte zugeschrieben. Da Matrin mit einem IC₅₀-Wert von 23,7 µM aber keine starke

Hemmwirkung zeigte, ist anzunehmen, dass die antiasthmatische Wirksamkeit des Inhaltsstoffes, die in der Literatur beschrieben wurde, neben einer Hemmung der Leukotrienbiosynthese auf anderen Wirkungsmechanismen beruht.

4.3.6 Testung chemisch synthetisch hergestellter Pterocarpanderivate

Nachdem die aus *Sophora flavescens* isolierten Pterocarpanderivate im 5-LOX-Test untersucht worden waren, wurden neun weitere chemisch synthetisierte Derivate mit gleichem Kohlenstoffskelett (Abb. 24), die wir von Prof. Antus, Debrecen, erhielten, im Testsystem eingesetzt und deren Hemmeigenschaften

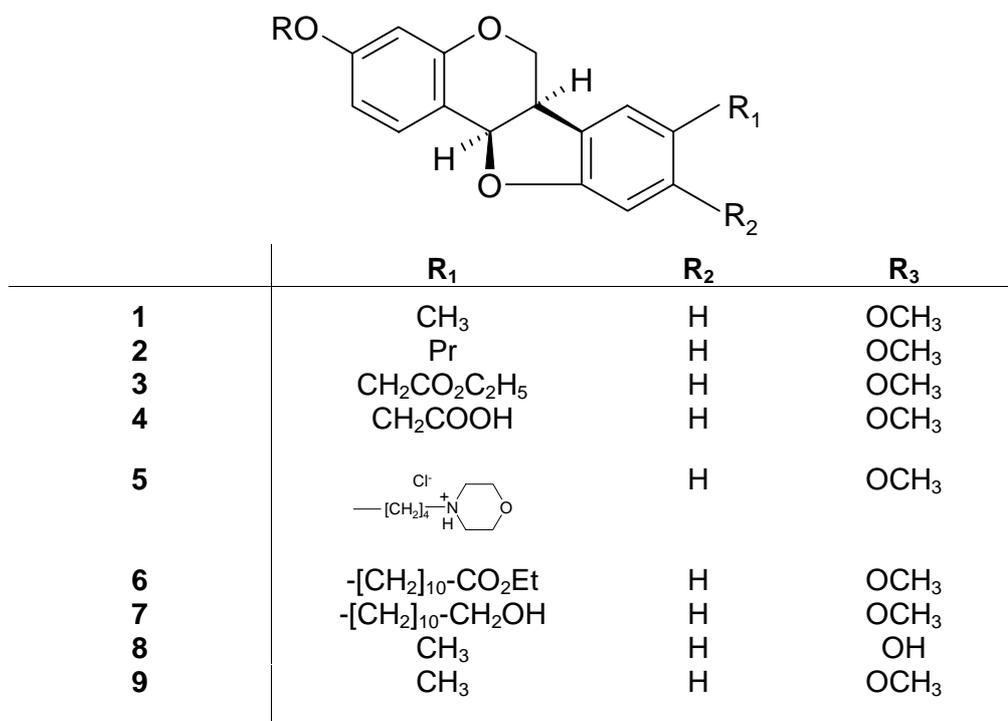


Abb. 24: Strukturformeln der getesteten Pterocarpanderivate

geprüft. Die Substanzen wiesen bei einer Testkonzentration von 25 µM moderate Wirkungen auf und hemmten die 5-LOX bis auf die Substanzen **2**, **8** und **9** mit weniger als 60 % (Abb. 25). Von den drei am besten wirksamen Substanzen (**2**, **8** und **9**) wurden IC₅₀-Werte bestimmt.

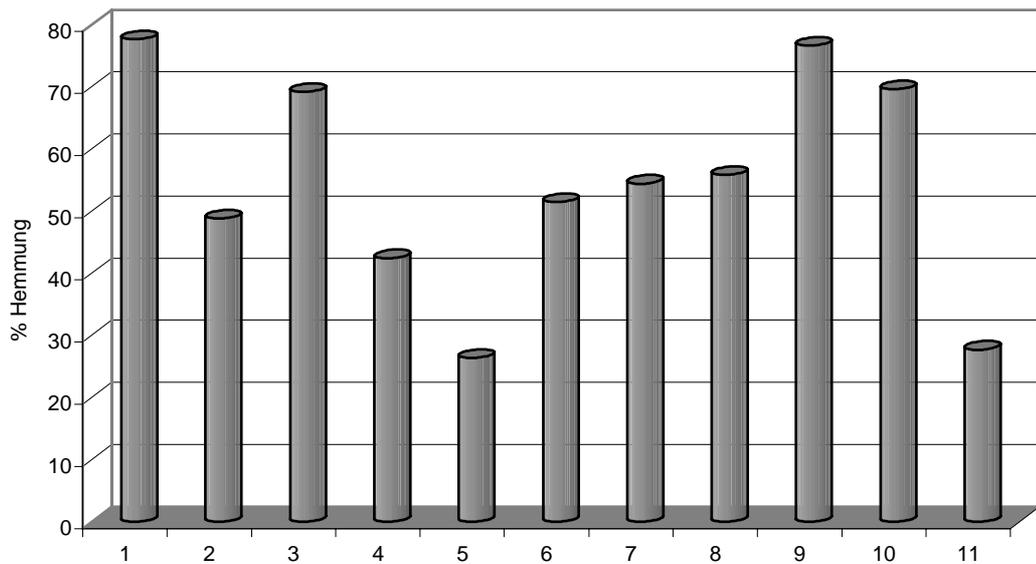


Abb. 25 Hemmwirkung [%] von synthetisch hergestellten Pterocarpderivaten (1-9) auf die Leukotrienbiosynthese bei einer eingesetzten Konzentration von 25 µg/ml

Tab. 18: IC₅₀-Werte von chemisch synthetisierten Pterocarpderivaten

Substanz	eingesetzte Testkonzentration			IC ₅₀ (µM)
	25 µmol/ml	15 µmol/ml	10 µmol/ml	
2	69,2 ± 10,5	36,8 ± 7,1	17,5 ± 8,6	18,2
8	76,7 ± 8,9	54,9 ± 4,2	38,8 ± 7,0	13,2
9	69,6 ± 11,3	42,2 ± 9,8	19,2 ± 5,8	17,9

4.3.7 Zytotoxizität der im 5-LOX-Test aktiven Verbindungen

Um die Verfälschung der Testergebnisse (Vortäuschung einer Leukotrienbiosynthesehemmung) durch eine mögliche unspezifische zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen auf die verwendeten Schweineleukozyten auszuschließen, wurden die aktivsten Substanzen mit IC₅₀ < 10 µM einem Zytotoxizitätstest unterzogen. Die Leukozytensuspension wurde mit der Testlösung (Konzentration im Bereich der IC₅₀) inkubiert und anschließend eine Vitalitätsprüfung

der Zellen durchgeführt (die Testdurchführung erfolgte genauso wie die Zellvitalitätsprüfung beim 5-LOX-Assay; siehe *Exp. Teil* S. 216).

Die Untersuchungen ergaben, dass keine der eingesetzten Substanzen zytotoxische Wirkungen gegenüber den Leukozyten hatte. Somit ist davon auszugehen, dass ein direkter Eingriff der Verbindungen in die Leukotrienbiosynthese stattfindet.

4.4 Die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese

Ähnlich wie der 5-Lipoxygenasetest wurde auch der COX-Assay nach einer Methode von Reininger (2001) durchgeführt. Das Testsystem wurde mit einem EIA ausgewertet. Die Hemmung wurde an isolierten Reinenzymen getestet, welche aus Schaf-Plazenten (Cotyledonen; COX-2) oder aus Schafsamenblasen (COX-1) stammten und von der Firma Cayman Chemical bezogen wurden (Johnson *et al.*, 1995). Da isolierte Enzyme vorlagen, konnte im Falle einer Hemmwirkung von unmittelbar inhibitorischen Effekten auf die Cyclooxygenasen ausgegangen werden.

Der Inkubationsansatz enthielt als Inhibitor die in Ethanol gelösten Proben, das gereinigte Enzym (je nach Testung COX-1- bzw. COX-2), die Cofaktoren Adrenalinhydrogentartrat, Na-EDTA (nur bei COX-2-Untersuchungen) und Hämatin (Hydroxy-[protoporphyrinato]-Eisen III). Adrenalin diente als Elektronendonator für die Peroxidasereaktion und schützte das Enzym vor Inaktivierung durch Fettsäurehydroperoxide (Markey *et al.*, 1987). Im Gegensatz zum COX-1-Enzym (Reinheit ≥ 95 %) hatte das COX-2-Enzym nur eine Reinheit von ≥ 70 %. Deshalb musste EDTA zur Komplexierung von Metallproteasen bei der COX-2-Bestimmung eingesetzt werden (Lands *et al.*, 1971). Hämatin stellt die prosthetische Gruppe der Häm-abhängigen Enzyme. Beim Aufreinigungsprozess geht das Apoenzym verloren, so dass durch die Zugabe des Hämatins die Enzymaktivität wiederhergestellt wird (Reininger, 2001).

Nach fünfminütiger Vorinkubationszeit wurde dem Testansatz Arachidonsäure zugesetzt und der Ansatz weitere 20 Minuten inkubiert, bevor die Reaktion mit Ameisensäure gestoppt wurde.

Die Testauswertung erfolgte mit einem kompetitiven EIA, bei dem PGE₂ mittels spezifischer PGE₂-Antikörper erfasst wurde. In einer enzymgekoppelten Detektionsreaktion wird in Abhängigkeit von der im Ansatz befindlichen PGE₂-Konzentration ein Farbstoff gebildet, der photometrisch quantifiziert werden kann.

Als Positivkontrollen wurden der duale Hemmstoff Indometacin ($IC_{50} = 0,9 \mu\text{M}$ für COX-1; $IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ für COX-2), sowie die bekannten spezifischen COX-2-Hemmstoffe Nimesulid ($IC_{50} = 36,4 \mu\text{M}$ für COX-2) und NS-398 ($IC_{50} = 2,6 \mu\text{M}$ für COX-2) bei jedem Test mit eingesetzt (Abb. 26).

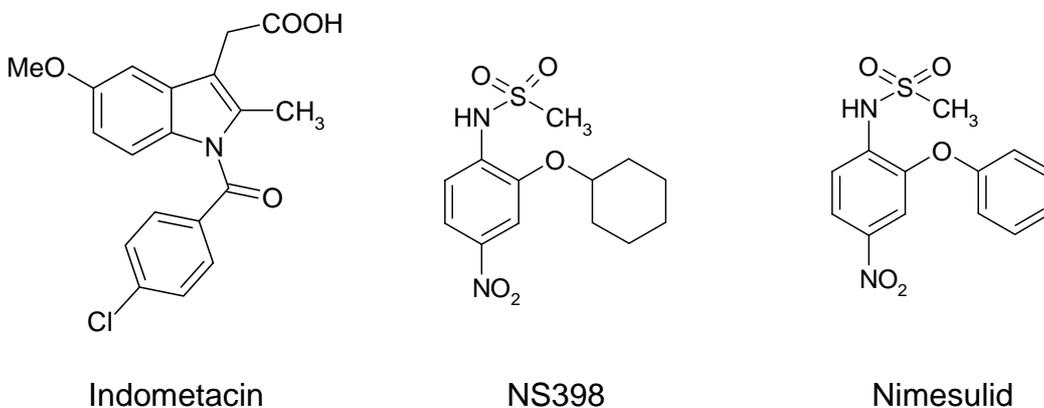


Abb. 26: Strukturformeln der eingesetzten Referenzsubstanzen in COX-Tests

4.4.1 Hemmwirkungen von isolierten Reinstoffen

Neben der Testung auf die 5-LOX-Hemmung wurden die meisten der isolierten Reinsubstanzen sowie Matrin und Oxymatrin zusätzlich auf eine Hemmung der Cyclooxygenasen untersucht. Von den nicht getesteten Isolaten stand entweder keine Substanz mehr zur Verfügung oder die Verbindung hatte sich zersetzt, wie es im Fall von Anhydrovariabilin eingetreten war.

Mit der Testung auf die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese sollten eine 5-LOX-Selektivität oder duale Hemmeigenschaften der Verbindungen festgestellt werden.

Tab. 19: Hemmung der Prostaglandinbiosynthese durch isolierte Reinsubstanzen bei einer Testkonzentration von 25 µmol/ml Testansatz

Substanz	COX-1 Hemmung (%)	COX-2 Hemmung (%)
Maackiain (PT1)	27,8 ± 5,1	0
Exiguaflavanon K (FL2)	23,9 ± 13,9	14,7 ± 2,8
Kushenol E (FL3)	59,1 ± 14,6	26,2 ± 9,8
Kushenol B (FL4)	24,1 ± 12,6	23,0 ± 12,3
Sophoraflavanon G (FL5)	100	100
Kurarion (FL6)	41,5 ± 12,4	31,2 ± 6,3
Isokurarion (FL7)	100	23,5 ± 6,6
2'-Methoxykurarion (FL8)	11,9 ± 4,2	0
Kushenol A (FL9)	49,5 ± 8,5	14,9 ± 5,9
Norkurarion (FL10)	39,3 ± 15,7	28,2 ± 3,9
Kushenol P (FL11)	14,2 ± 9,1	4,2 ± 2,1
Kushenol I (FL12)	24,3 ± 2,4	7,6 ± 1,1
Kushenol M (FL13)	51,7 ± 7,1	29,3 ± 10,2
Biochanin A (FL14)*	0	0
Kushenol D (CH1)	69,3 ± 8,1	58,8 ± 4,9
Kuraridin (CH2)	55,6 ± 3,9	26,2 ± 8,3
Kushenchroman A (CH3)	67,2 ± 9,8	46,1 ± 12,4
Matrin	0	0
Oxymatrin	0	0

* Von Biochanin A wurde die kommerziell erworbene Substanz eingesetzt, da die Menge an isolierter Reinsubstanz zu gering war.

Generell zeigten die gestesteten Inhaltsstoffe eine deutliche Präferenz der COX-1-Hemmung gegenüber der COX-2-Inhibition. Dies bestätigte die Ergebnisse der Untersuchungen an Dichlormethanextrakten, die bereits zuvor von Reiningger (2001) im Rahmen eines Drogenscreenings durchgeführt worden waren. Danach hatte der DCM-Extrakt bei einer eingesetzten Testkonzentration von 50 µg/ml Testansatz eine durchschnittliche Hemmung von 76,2 % ± 9,6 % auf die COX-1 und 33,6 % ± 8,8 % auf die COX-2.

Die Hemmwerte der untersuchten Flavonoide waren bezüglich der COX-1-Hemmung als moderat einzustufen. Ausnahmen bildeten Isokurarion und Sophoraflavanon G, so dass es in diesen Fällen sinnvoll erschien die halbmaximalen Hemmkonzentrationen zu bestimmen (Tab. 20). Sophoraflavanon G

zeigte auf beide COX-Enzyme etwa die gleiche Hemmwirkung wie die Referenzsubstanz Indometacin, dessen IC_{50} -Werte wie bereits erwähnt bei $0,9 \mu\text{M}$ (COX-1) und $0,8 \mu\text{M}$ (COX-2) lagen. Sophoraflavanon G wies eine stärkere Inhibition gegenüber der COX-1 als zur COX-2 auf. Da diese Substanz und Isokurarinon bei weitem aktiver waren als die anderen getesteten Verbindungen, dürfte die COX-1-Hemmung des Extraktes vor allem auf die Wirkungen der beiden Substanzen zurückzuführen sein, zumal Sophoraflavanon G zu den Hauptsubstanzen des Extraktes zählt. Die anderen Verbindungen tragen wahrscheinlich nur untergeordnet zur Extraktwirkung bei. Betrachtet man die COX-2-Hemmwerte, fällt auf, dass lediglich Sophoraflavanon G eine signifikante Wirkung aufweist. Die Hemmwerte aller anderen isolierten Inhaltsstoffe lagen unter 60 % Hemmung bei einer eingesetzten Konzentration von $25 \mu\text{mol/ml}$ Testansatz.

Tab. 20: IC_{50} -Werte der aktivsten Inhaltsstoffe in Bezug auf Cyclooxygenasehemmung

Substanz	COX-1 (μM)	COX-2 (μM)
Sophoraflavanon G (FL5)	0,43	1,82
Isokurarinon (FL7)	6,59	n. b.*

*n.b. = nicht berechnet, da die COX-2-Hemmung bei $25 \mu\text{mol/ml}$ Testansatz lediglich bei 23,5 % im Durchschnitt lag

Die getesteten Alkaloide (Matrin und Oxymatrin) zeigten ebenso wie das Isoflavon Biochanin A keine signifikante Hemmwirkung gegenüber beiden COX-Isoenzymen. Testergebnisse bezüglich der Hemmungen der PGE_2 -Synthese durch Isoflavonderivate, wie z.B. Genistein ($IC_{50} = 15 \mu\text{M}$) oder Daidzein ($IC_{50} > 30 \mu\text{M}$) wurden bereits von Yamaki *et al.* (2002) publiziert.

4.5 Testungen einiger Inhaltsstoffe aus *Sophora flavescens* bezüglich ihrer antioxidativen Eigenschaften

4.5.1 Dünnschichtchromatographischer Test auf radikalfangende Eigenschaften mittels DPPH-Reagenz

In Gegenwart von radikalfangenden Reagenzien wird das tiefviolett gefärbte DPPH-(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)-Radikal entfärbt und ist daher sehr gut geeignet für *in vitro* Screening-Untersuchungen auf antioxidative Eigenschaften von Substanzen. Es kann als Sprühreagenz in Abwandlung von der quantitativen UV-Bestimmung von Yamasaki *et al.* für einen schnellen und ohne apparativen Aufwand durchführbaren dünnschichtchromatographischen Test benutzt werden. Dabei wird die unspezifische Radikalfängerwirkung der eingesetzten Testsubstanzen qualitativ visuell detektiert (Yamasaki *et al.*, 1994 und Lobitz *et al.*, 1998).

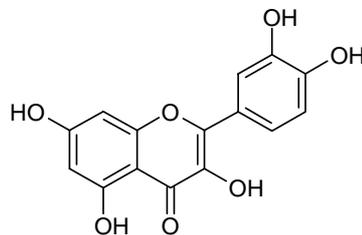
4.5.2 Testsystem mit polymorphkernigen Granulozyten

Bei physiologischen und pathophysiologischen Abwehrreaktionen des Körpers als Antwort auf entzündliche Erkrankungen werden unter anderem reaktive Sauerstoffradikale durch Monozyten, Makrophagen und polymorphkernige Granulozyten vermehrt gebildet. Dies ist der Fall während der Phagozytose von Fremdkörpern, wie z.B. von opsonisierten Bakterien.

Im eingesetzten Testsystem wird der Anstieg der Sauerstoffradikalbildung („oxidative burst“) an isolierten polymorphkernigen Granulozyten geprüft. Durch die Zugabe des chemotaktischen Faktors FMLP (*N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin), einem synthetischen Derivat des NH₂-Endes von Bakterienproteinen, wurde der „oxidative burst“ an den isolierten Zellen nachgeahmt (Fantone und Ward, 1982). An der Phagozytenmembran bindet FMLP an einen spezifischen Rezeptor, wodurch kaskadenartig verschiedene Enzyme aktiviert werden (G-Protein und Phospholipase C). Letztlich wird so eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt. Es kommt im Anschluss daran zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Dadurch wird schließlich die NADPH-Oxidase zur Bildung von Superoxidanionradikalen angeregt. Im neutralen Milieu

können diese in Anwesenheit von Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden, das die Ausgangsverbindung bei der Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies ist. In Gegenwart von Eisen (als Katalysator) kann ein Hydroxylradikal gebildet werden. Sind z.B. Chloridionen gegenwärtig, ist eine Umsetzung mittels Myeloperoxidase zu Hypochlorit möglich. Zudem entsteht reaktiver Singulett-Sauerstoff, bei dessen Zerfall zu molekularem Sauerstoff Energie u.a. in Form von Lichtenergie frei wird. Dieser Mechanismus wird als Ursache für die bei der Aktivierung von Phagozytosezellen beobachtete Chemilumineszenz angesehen.

Von den im Testsystem eingesetzten Flavonoiden wurden jeweils Konzentrationen von 0,5 - 20 µg/ml Testansatz untersucht. Durch Zugabe von FMLP wurde die Reaktion gestartet. Die Messung der Lichtemission erfolgte bei 37°C in einem Bioluminaten über einen Zeitraum von 15 min. Gleichzeitig dazu wurde ein Test ohne phenolische Verbindung unter gleichen Bedingungen als Blindwert durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Quercetin, das zuvor unter identischen Bedingungen untersucht worden war (Heilmann *et al.*, 1995).



Quercetin

Abb. 27: Strukturformel von Quercetin, der Positivkontrolle im eingesetzten Chemilumineszenz-Test

4.5.3 Wirkungen von ausgewählten Inhaltsstoffen in den eingesetzten Testsystemen auf antioxidative Eigenschaften

Bereits der dünnschichtchromatographische Test mit DPPH-Reagenz deutete auf die Fähigkeiten der Substanzen auf unspezifischen Radikalfang hin. Die Zonen der aufgetragenen Inhaltsstoffe entfärbten ebenso wie die Zone von Quercetin als Referenzsubstanz das durch Besprühen auf die DC-Platte aufgetragene DPPH-Reagenz. Somit erschien es aussichtsreich die einzelnen

Substanzen im Chemilumineszenz-Test mit polymorphkernigen Granulozyten zu untersuchen. Aufgrund von Mangel an Testkapazitäten konnten lediglich drei Verbindungen (FL5, FL6 und FL12) in dem Test eingesetzt werden.

Die Testergebnisse der eingesetzten Substanzen zeigten bei der Untersuchung an polymorphkernigen Granulozyten mittelstarke Aktivität im Vergleich zu Quercetin. Dabei wiesen die untersuchten Verbindungen alle ähnliche IC_{50} -Werte im Bereich von 4,8 μ M bis 6,5 μ M auf.

Tab. 21: IC_{50} -Werte (μ M) einiger getesteter Verbindungen und Quercetin als Positivkontrolle beim Chemilumineszenz-Test und dem zellfreien DC-Test auf radikalfangende Eigenschaften mit DPPH-Reagenz im Vergleich zu IC_{50} -Werten (μ M), die im 5-LOX-Test erzielt wurden

Substanz	PMN (FMLP)	5-LOX	zellfrei DPPH
Kushenol E (FL3)	n.g.**	4,8	+*
Sophoraflavanon G (FL5)	4,8	8,1	+*
Kurarion (FL6)	6,5	9,3	+*
2'-Methoxykurarinon (FL8)	n.g.**	1,5	+*
Kushenol I (FL12)	5,1	9,2	+*
Quercetin (Vergleich)	0,4	n.g.**	+*

*+ = Entfärbung des DPPH auf der DC-Platte; **n.g. = nicht getestet

Beim Vergleich der einzelnen Hemmwerte in den jeweils eingesetzten Konzentrationen wurde festgestellt, dass Quercetin bis zu einer Testkonzentration von 15 μ mol/ml Testansatz stets stärker wirksam war als die aus *Sophora flavescens* isolierten Substanzen. Bei einer Testkonzentration von 20 μ mol/ml Testansatz zeigen alle eingesetzten Testsubstanzen in etwa gleiche Hemmaktivitäten (Abb. 28).

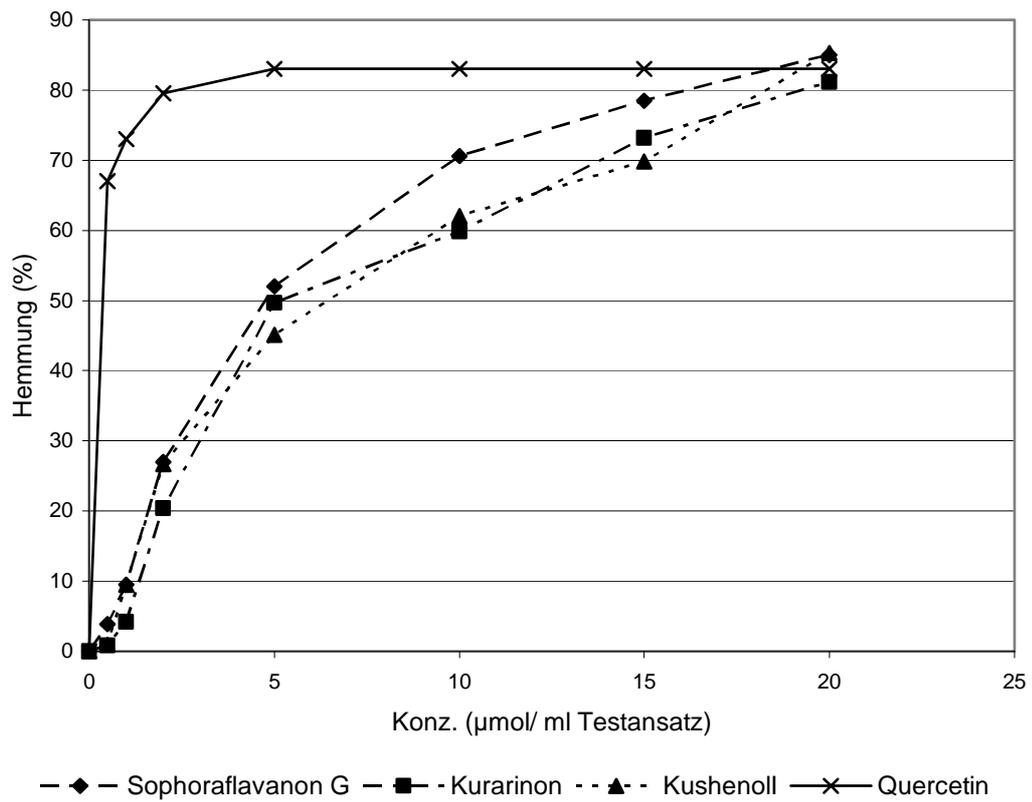


Abb. 28: Reduktion der Chemilumineszenz im Test mit polymorphkernigen Granulozyten durch Sophoraflavanon G (FL5), Kurarinon (FL6) und Kushenoll I (FL12) im Vergleich zu Quercetin als Referenzsubstanz

5. Isolierung und Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen aus *Sophora flavescens*

5.1 Dichlormethan als Extraktionsmittel

Für die Suche nach dem am besten geeigneten Extraktionsmittel für weitere phytochemische Untersuchungen zur Auffindung des Wirkprinzips der Wurzeln von *Sophora flavescens* wurden Drogenextrakte unterschiedlicher Polarität (mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol als Extraktionsmittel) hergestellt und ihre inhibitorische Aktivität im 5-LOX-Screening-Assay getestet. Wir entschieden uns für Dichlormethan als Lösungsmittel, da die 5-Lipoxygenasehemmung des DCM-Extraktes am stärksten war und zudem die Extraktausbeuten (im Durchschnitt 3,3 % berechnet auf die getrocknete Droge) der zum pharmakologischen Screening hergestellten Auszüge mit Dichlormethan wesentlich höher waren. Beim Methanolextrakt konnte eine ähnlich hohe Ausbeute wie bei Dichlormethanauszug erzielt werden, jedoch war der Extrakt im pharmakologischen Testsystem viel schwächer wirksam (Abb. 19 und Tab. 11).

Tab. 22: Vergleich der Extraktausbeuten von **SF1** bei der Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel (Drogeneinwage 5g)

Extrakt	Extraktausbeute (%)
<i>n</i>-Hexan	1,48
Dichlormethan	3,06
Methanol	4,37

5.2 Extraktionen und wirkungsorientierte Fraktionierungen

Nachdem die pulverisierte Radixdroge von *Sophora flavescens* im Soxhlet-Verfahren erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert worden war, schloss sich eine wirkungsorientierte Fraktionierung an. Dabei wurden alle Fraktionen eines

Trennungsschrittes bezüglich ihrer Leukotrienbiosynthesehemmung in einer Konzentration von 10 µg Trockenextrakt/ml getestet. So erfolgte auch die weitere Auftrennung bis hin zur Reinstoffisolierung. Von den isolierten Inhaltsstoffen wurde stets die halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) im 5-LOX-Test (s. *Pharmakologische Untersuchungen*) bestimmt. Zudem wurden die erhaltenen Reinstoffe in den Fällen, in denen noch genügend Menge an isolierter Substanz vorhanden war, auf COX-1- und COX-2-Hemmwirkung getestet.

Der Dichlormethanextrakt wurde zunächst an Kieselgel mittels Vakuumchromatographie (VLC) mit *n*-Hexan/Ethylacetat-Mischungen schrittweise nach steigender Polarität in 20 Fraktionen aufgetrennt. Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung der Fraktionen konnten einige von ihnen wegen ähnlicher Inhaltsstoffführung zusammengefasst werden, so dass acht Grobfraktionen resultierten. Im 5-LOX-Testsystem zeigten die Grobfraktionen II-VIII deutliche Hemmaktivitäten, so dass eine weitere phytochemische Untersuchung aussichtsreich erschien. Für die Bearbeitung dieser Fraktionen wurden problemabhängig unterschiedliche Verfahren zur Isolierung der Reinsubstanzen eingesetzt.

Bis auf die Grobfraktion VI wurden alle anderen zunächst per MPLC, was sich als zügiges Trennverfahren erwies, an RP-18-Material weiter aufgetrennt. Dafür wurden Acetonitril-Wasser-Gradientenprogramme speziell für die jeweils anstehenden Trennungen entwickelt. Der Einsatz von Lösungsmittelgradienten mit einem kontinuierlich ansteigenden Acetonitrilanteil hatte eine Erhöhung der Trennleistung zur Folge, was ein weiterer Vorteil des eingesetzten Verfahrens war. Die Güte der stattgefundenen Trennungen wurde per DC- und HPLC-Analyse untersucht. Verhielten sich die zu isolierenden Stoffe auf RP-18-Material oder Kieselgel nahezu gleich (die Retentionszeiten der Stoffe unterschieden sich mit weniger als einer Minute im HPLC-Chromatogramm und die R_f -Werte der Substanzzonen auf der DC-Platte unterschieden sich kaum), wurde die Trennung mittels semipräparativer HPLC durchgeführt.

Als weiteres Trennverfahren wurde die offene Säulenchromatographie mit Kieselgel eingesetzt. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf Kieselgelplatten hatten ergeben, dass sich Fraktion VI auch an Normalphasenmaterial auftrennen ließ. Als Eluentengemisch stellte sich Dichlormethan/-

Methanol als günstig heraus, nachdem im Vorfeld einige unterschiedliche Standardfließmittelsysteme getestet worden waren. Bei der Isolierung von FL3, FL4 und FL7 war die Trennleistung der Normalphase der Umkehrphase sogar überlegen, so dass erneut die SC verwendet wurde. Bei der Isolierung von FL2, FL10 und FL14 wurde die präparative DC als Trennmethode eingesetzt, weil auch hier eine bessere Auftrennung an Kieselgel stattfand. Zudem war nur eine geringe Substanzmenge aufzutrennen.

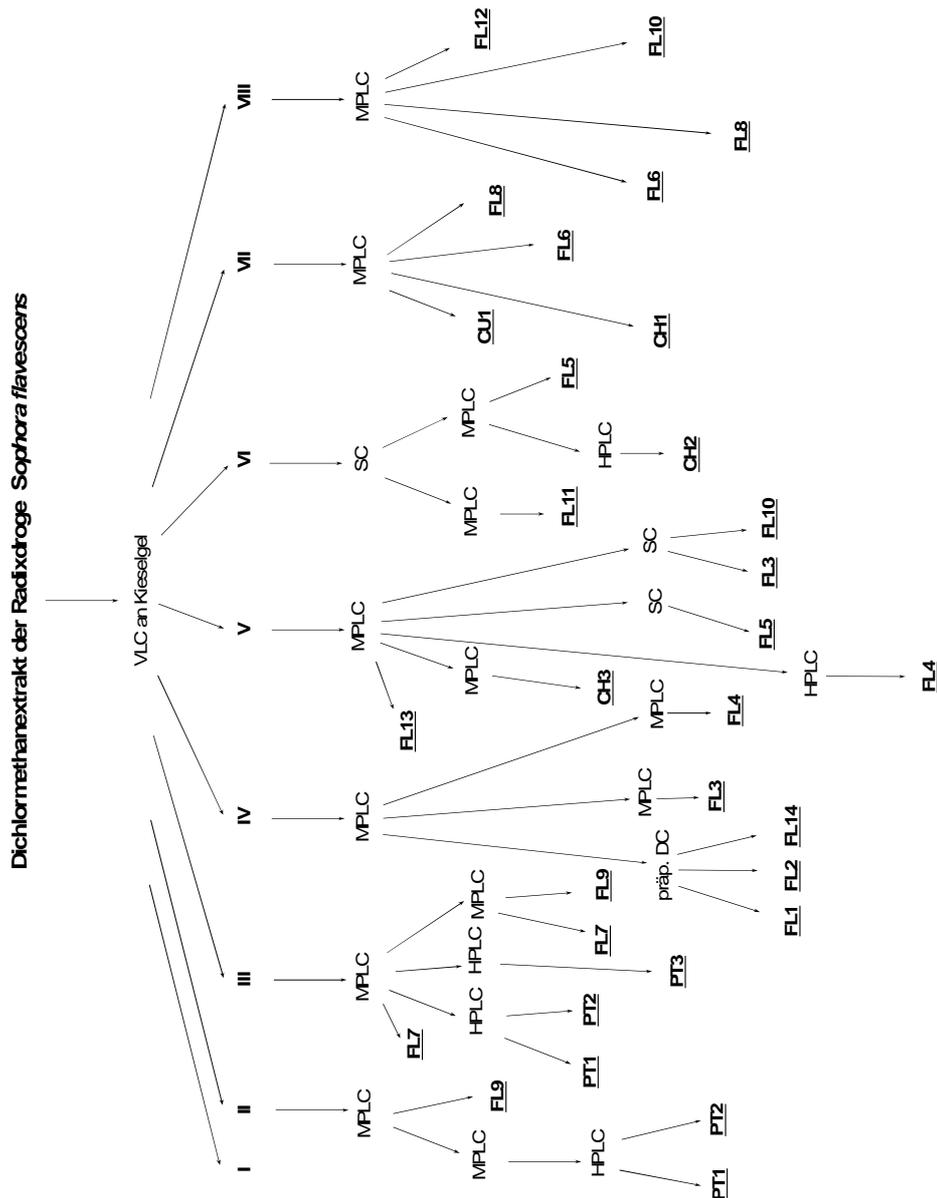
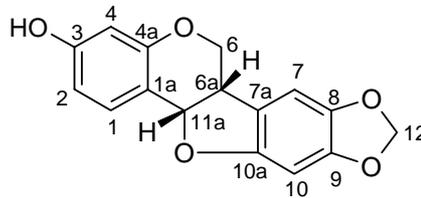


Abb. 29: Isolierungsschema der Inhaltsstoffe aus *Sophora flavescens*; SC-Trennungen erfolgten an Kieselgel, HPLC- und MPLC-Trennungen an RP-18-Material; PT: Pterocarpanderivat, FL: Flavanon- bzw. Flavanonolderivat, FS: Fettsäurederivat, CH: Chalkonderivat

5.2.1 Isolierung und Strukturaufklärung von Pterocarpanderivaten

Identifizierung von Maackiain (PT1)

(3-Hydroxy-8',9-methylenedioxypterocarpan)



Die Substanz wurde aus der Grobfraction II mit einer Ausbeute von 42,7 mg als weißes Pulver isoliert.

Die Reinheit der Substanz wurde und dünnschichtchromatographisch mittels HPLC-Methode überprüft, parallel dazu wurde ein UV-Spektrum (Abb. 30) online aufgenommen. Das Spektrum zeigte Maxima bei 215, 281, 287 und 310 nm. Nach Literaturvergleich mit einem Spektrum von SHIBATA *et al.* (1963) stimmten die gefundenen Werte genau mit zuvor beschriebenen (281, 287 und 310 nm in Ethanol aufgenommen) überein. Da das UV-Spektrum von SHIBATA erst ab einer Wellenlänge von 225 nm aufgenommen worden war, konnte das Maximum bei 215 nm von ihm in der Publikation nicht beschrieben werden.

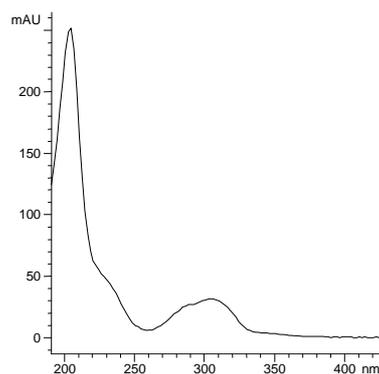


Abb. 30: UV-Spektrum von PT1

Im Gegensatz zu später isolierten Flavanonderivaten war PT3 GC-gängig, so dass mittels GC-MS ein EI-Massenspektrum aufgenommen werden konnte (Abb. 31). Dabei trat der Molekülpeak m/z 284 als Basispeak hervor. Das

Molekulargewicht wurde zusätzlich belegt durch die Aufnahme eines mit NH_3 aufgenommenen CI-Spektrums. Es traten kaum mengenmäßig dominierende Fragmente auf, was ein typisches Merkmal für MS-Spektren von Pterocarpanderivaten ist. Die Grundgerüste dieser Verbindungen sind recht stabil. Die bei Flavonoiden vorherrschende Retro-Diels-Alder-Fragmentierung findet bei Pterocarpanen nicht statt (PELTER, 1965).

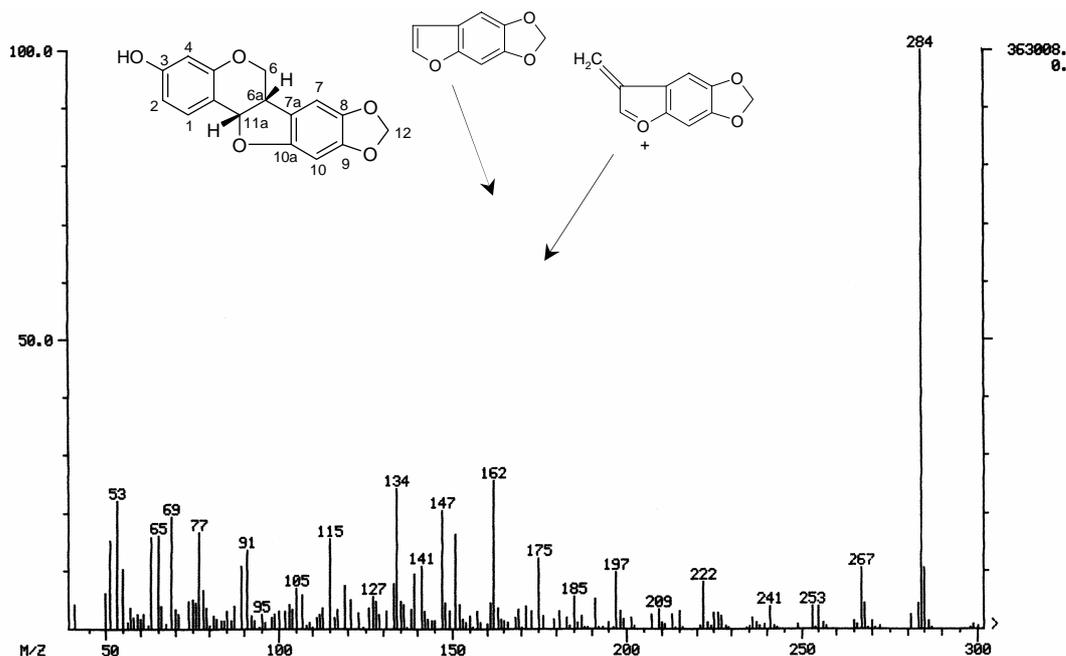


Abb. 31: GC-MS-Spektrum von PT1

Das Protonen-NMR-Spektrum (Abb.32) zeigt die für Maackiain zu erwartenden Signale, deren chemische Verschiebungen mit Literaturdaten verglichen wurden (Tab. 23). Abweichungen ergaben sich lediglich aufgrund des Einsatzes von unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Das zum Duplett aufgespaltete Signal bei 5,90 ppm besaß eine Kopplungskonstante von 14 Hz und wurde den Protonen der Methylendioxygruppe zugeordnet. Die aromatischen Protonen H-1, H-2 und H-4 zeigten erwartungsgemäß die Aufspaltung eines ABC-Spinsystems. Die restlichen aromatischen Protonen H-7 und H-10 traten als Singulett bei 6,84 und 6,34 ppm auf. Komplizierter verhielten sich die Aufspaltungsmuster der übrigen Protonen. Während das Proton 11a (Duplett) bei 5,48 ppm mit H-6a bei 3,55 ppm in Wechselwirkung

stand ($J = 6,9$ Hz), erschien dieses als Duplett vom Doppelduplett aufgrund einer weiteren Kopplung zu den Protonen H-6ax und H-6eq (3,61 und 4,26 ppm). Die Kopplungskonstante von 10,1 Hz drückt eine diachziale Wechselwirkung zwischen H-6a und H-6ax aus, was bedeutet, dass beide Kopplungspartner in axialer Stellung angeordnet sind (HESSE, 1991).

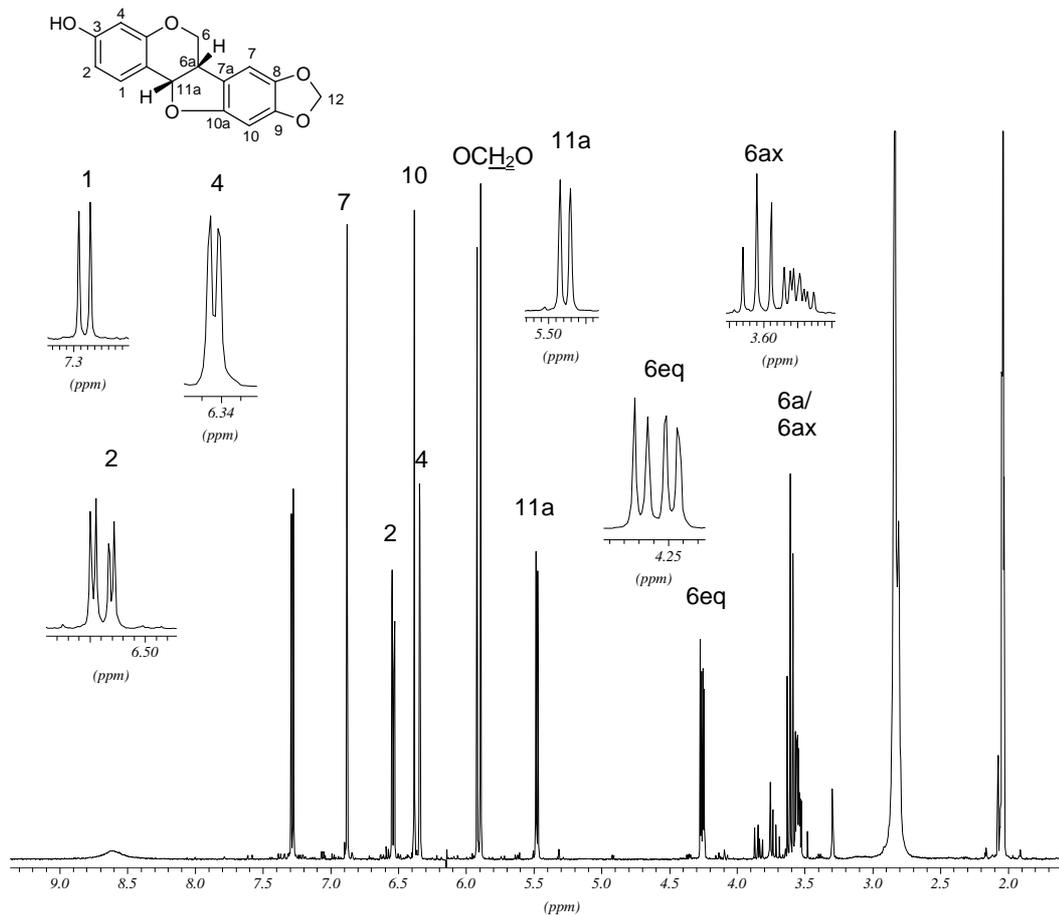


Abb. 32: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PT1 (500 MHz, in Aceton-d_6)

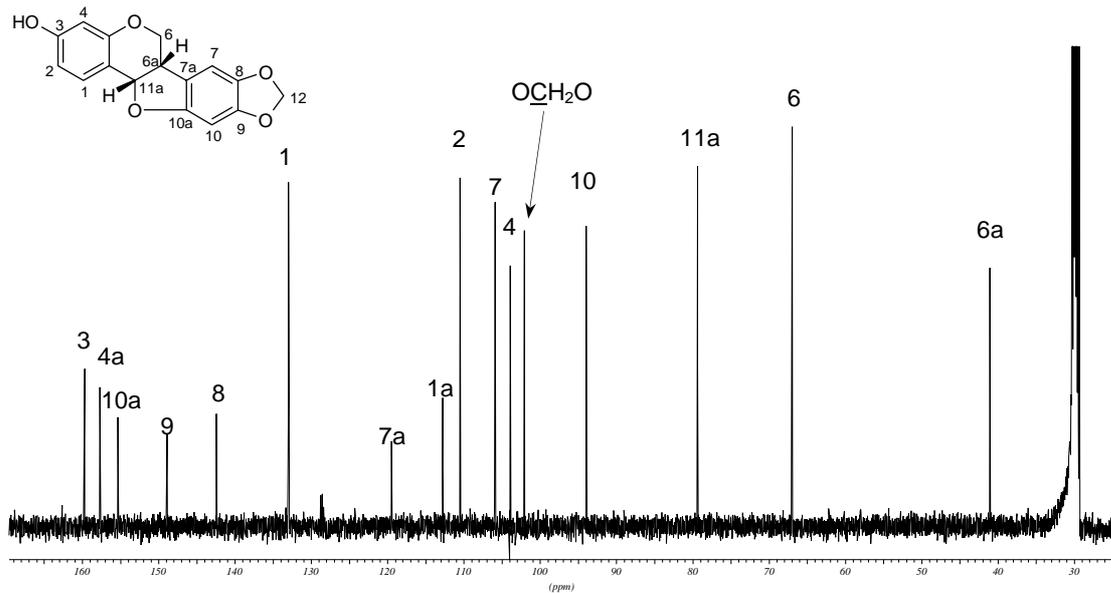


Abb. 33: ^{13}C -NMR-Spektrum von PT1 (125 MHz, in Aceton- d_6)

Im ^{13}C -Spektrum von PT1 (Abb. 33 und Tab. 23) erschienen 16 Signale. Davon konnten für die beiden sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffkerne (C-6 und C-12) nach der Aufnahme eines DEPT-Spektrums (Abb.34) jeweils CH_2 -Gruppen zugeordnet werden. Durch die höhere Entschirmung der beiden benachbarten Sauerstoffkerne kam der C-12-Kern im tieferen Feld als das Kohlenstoffatom C-6 zur Resonanz. Bei den übrigen im DEPT-Spektrum erschienenen Signalen handelte es sich jeweils um CH-Gruppen. Die beiden im höchsten Feld erschienenen Signale wurden den sp^3 -Zentren (C-6a und C-11a) zugeordnet.

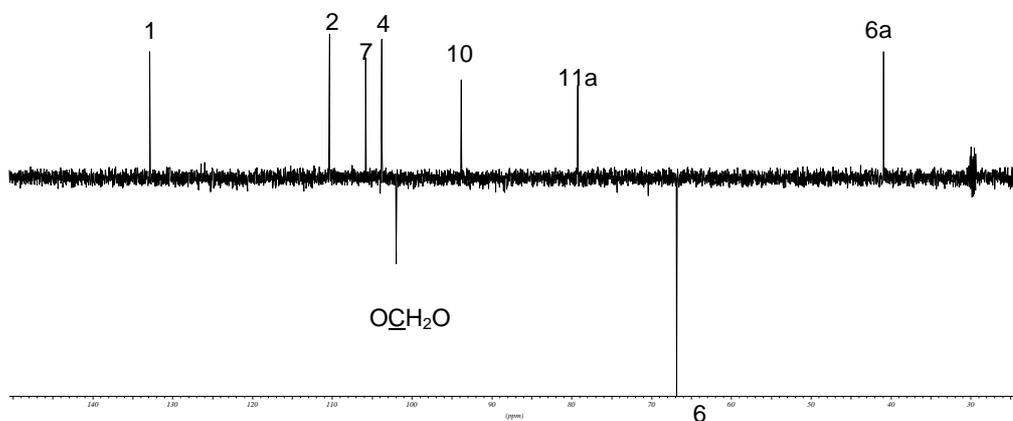


Abb. 34: DEPT-Spektrum von PT1 (125 MHz, in Aceton- d_6)

Tab. 23: ^{13}C -NMR-Daten von PT1 (Maackiain) (250 MHz, in Aceton- d_6) und

Maackiain; Lit.1 von CHAUDHURI *et al.*(1995) wurden in CDCl_3 bei einer Frequenz von 62,5 MHz aufgenommen; Daten von Lit.2 (BEDIR *et al.*,1999) in Methanol- d_4 (600 MHz); δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.1)	^{13}C (Lit.2)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.1)	^{13}C (Lit.2)
1	133,0	132,1	132,2	7	105,9	104,7	104,8
1a	112,8	112,5	112,6	7a	119,5	117,9	118,0
2	110,5	109,8	109,8	8	142,4	141,7	141,8
3	159,7	157,1	159,7	9	148,9	148,1	148,2
4	103,9	103,6	103,8	10	93,9	93,8	93,9
4a	157,7	156,6	157,2	10a	155,3	154,2	154,3
6	67,0	66,4	66,6	11a	79,4	78,5	78,6
6a	41,0	40,1	40,2	OCH₂O	102,1	101,3	101,4

Tab. 24: ^1H -NMR-Daten von PT1 (Maackiain) (500 MHz, in Aceton- d_6); Lit.1(CHAUDHURI *et al.*, 1995) wurden in CDCl_3 (250 MHz) aufgenommen; Daten von Lit.2 (BEDIR *et al.*, 1999) wurden in Methanol- d_4 (600 MHz) aufgenommen; δ in [ppm], J in[Hz] in Klammern

H-Atom	^1H	^1H (Lit.1)	^1H (Lit.2)
1	7,28 d (8,3)	7,35 d (8,5)	7,32 d (8,5)
2	6,54 dd (2,2; 8,3)	6,54dd (2,5; 8,5)	6,54 dd (8,5;2,0)
4	6,34 d (2,2)	6,40 d (2,5)	6,42 d (2,0)
6a	3,55 ddd (4,5; 6,9; 10,3)	3,45 ddd (5,0; 7,0; 11,0)	3,47 ddd (5,3; 6,0)
6ax	3,61 t (10,3)	3,64 t (11,0)	3,64 t (11,4)
6eq	4,26 dd (4,5; 10,3)	4,21 dd (5,0; 11,0)	4,21 dd (5,3; 11,4)
7	6,88 s	6,72 s	6,72 s
10	6,38 s	6,43 s	6,44 s
11a	5,48 d (6,9)	5,47 d (7,0)	5,46 d (6,0)
OCH₂O	5,90 d (13,2)	5,91 d (14,0)	5,89 s; 5,92 s

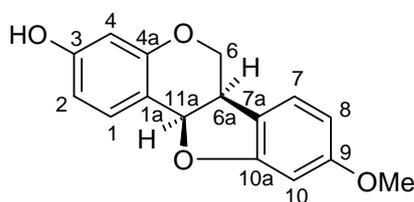
Der Nachweis der Methylendioxygruppe wurde zusätzlich nasschemisch mittels einer Farbreaktion mit Chromotropsäure/konz. Schwefelsäure erbracht. Dabei wird durch die starke Säure intermediär Formaldehyd abgespalten, der anschließend mit Chromotropsäure reagieren kann. Das gefärbte Kondensationsprodukt ist wahrscheinlich ein durch Mesomerie stabilisiertes 3,4,5,6-Dibenzoxanthylum-Kation (DAB 10).

Nach Auswertung aller abgebildeten Spektren, Chromatogramme, der Nachweisreaktion und Literaturvergleich handelte es sich bei der isolierten Substanz eindeutig um L-(-)-Maackiain. Sie besitzt die synonymen Namen Demethylpterocarpin und Inermin.

Diese Verbindung wurde erstmals von SUGINOME *et al.* im Jahre 1962 aus *Maackia amurensis* isoliert. Weiterhin wurde ihr Vorkommen 1968 in *Sophora flavescens* von FURUYA *et al.*, HONDA *et al.* (1982) und KANG *et al.*, (2000), in *Sophora tonkinensis* (SHIBATA *et al.*, 1963), *Sophora moorcroftiana* (SHIRATAKI *et al.*, 1988), *Swartzia madagascariensis* (HARPER *et al.*, 1969), *Trifolium pratense* (DEWICK, 1977), *Petalostemon purpureus* (CHAUDHURI *et al.*, 1995), *Ulex parviflorus* (MAXIMO *et al.*, 1998), *Ononis viscosa* spp. *breviflora* (BARRERO *et al.*, 1998) nachgewiesen.

Identifizierung von PT2 (Medicarpin)

(3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)



Die Verbindung PT2 wurde mit einer Ausbeute von 8 mg als farbloses amorphes Pulver aus den Grobfractionen II und III isoliert. Die UV-Absorptionsmaxima lagen bei 210, 230 und 286 nm. Bereits nach Betrachtung des UV-Spektrums konnte man vermuten, dass es sich erneut um ein Pterocarpanderivat handeln musste, da es Ähnlichkeit mit dem von Maackiin (PT1) hatte. Auch im DC zeigten PT1 und PT2 ähnliche Fließeigenschaften. Die R_f -Werte unterschieden sich kaum, die Färbung nach der Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure war gleich (altrosa). Im Unterschied zu PT1 fiel die Farbreaktion mit Chromotropsäure bei PT2 negativ aus.

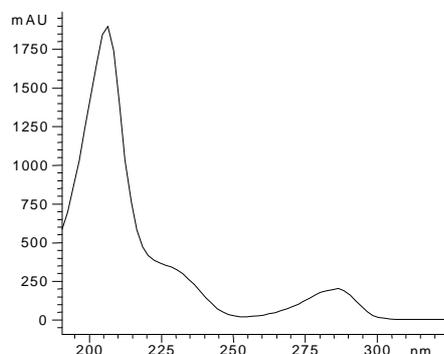


Abb. 35: UV-Spektrum von PT2

Im Gegensatz zu PT1 war die Substanz nicht GC-gängig. Daher wurden die Hydroxylgruppen der Verbindung mit Bismethylsilyltrifluoroacetamid (BSTFA) silyliert. Nach 10 Stunden konnte ein GC-MS-Spektrum aufgenommen werden, das bei m/z 342 einen Molekülpeak des silylierten Reaktionsproduktes zeigte (Abb. 36). Ein ebenfalls aufgenommenes CI-Massenspektrum (Abb. 37) zeigte ein Quasimolekülion ($[M+1]^+$) bei m/z 271, das die Molmasse von 270 g/mol bestätigte.

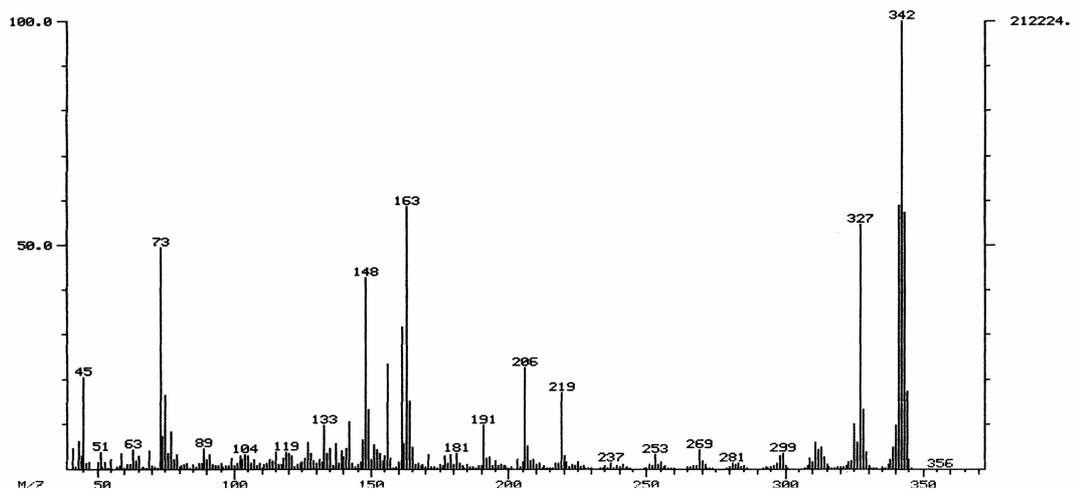


Abb. 36: GC-MS-Spektrum von PT2 nach Silylierung

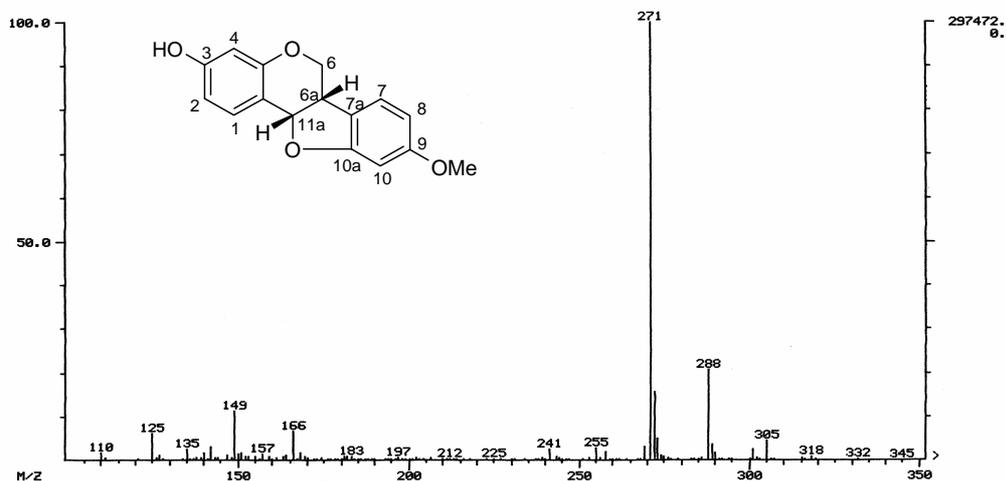


Abb. 37: CI-(NH₃)-Massenspektrum von PT2

Im ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 38) fanden sich nahezu die gleichen Signale wie bereits zuvor beim Maackiain. Allerdings erschien das Proton an C-7 nun mit einer ortho-Kopplung von 8,8 Hz zum H-8 und war zum Dublett aufgespalten,

welches zusätzlich eine weitere meta-Kopplung von 2,5 Hz zu H-10 aufwies. Die Signale der restlichen aromatischen Protonen H-1, H-2 und H-4 waren mit denen von Maackiain identisch. Bei der Verbindung PT2 lagen somit zwei Aromaten jeweils mit einem ABC-Spinsystem vor. Das Singulett mit einer chemischen Verschiebung bei $\delta = 3,70$ ppm besaß ein Integral, das drei Protonen entsprach und wurde auch aufgrund der Signallage einer Methoxygruppe zugeordnet.

Die Protonen an C-6, C-6a, sowie C-11a zeigten ähnliche Shiftwerte und Aufspaltungsmuster wie die von PT1 (Abb. 32) und sind bereits dort erläutert worden.

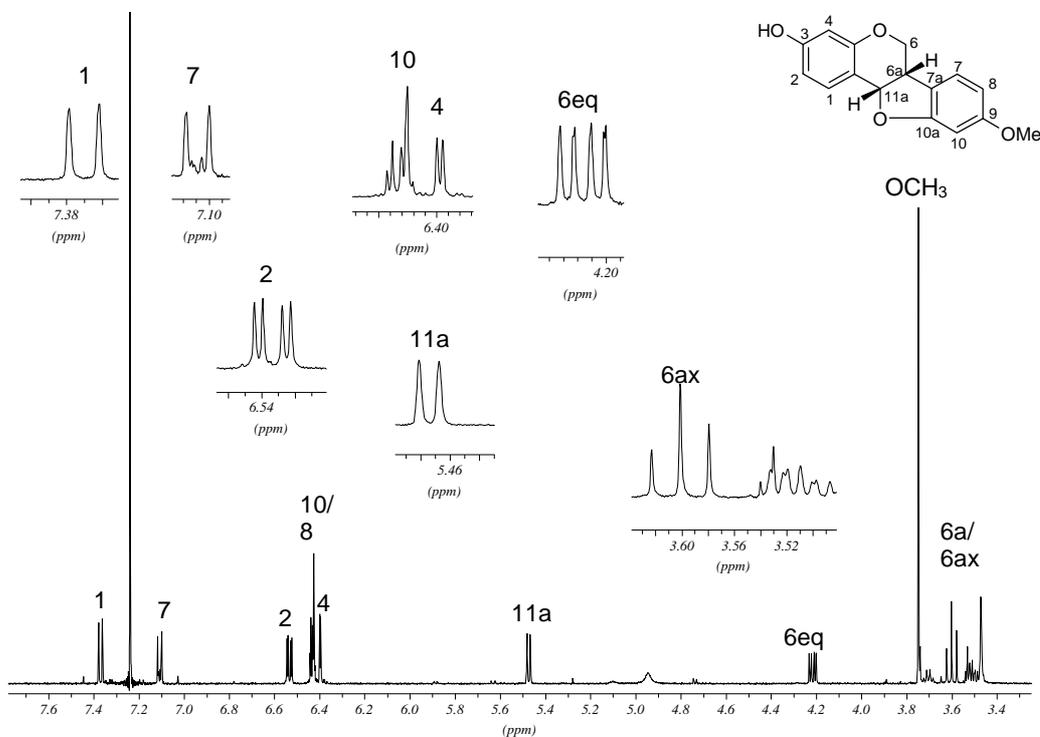


Abb. 38: ¹H-NMR-Spektrum von PT2 (500 MHz, in CDCl₃)

Das ¹³C-NMR-Spektrum (Abb. 39 und Tab. 25) und der Vergleich mit Literaturdaten bestätigten das Vorliegen von Medicarpin, das auch unter dem Synonym Demethylhomopterocarpin bekannt ist.

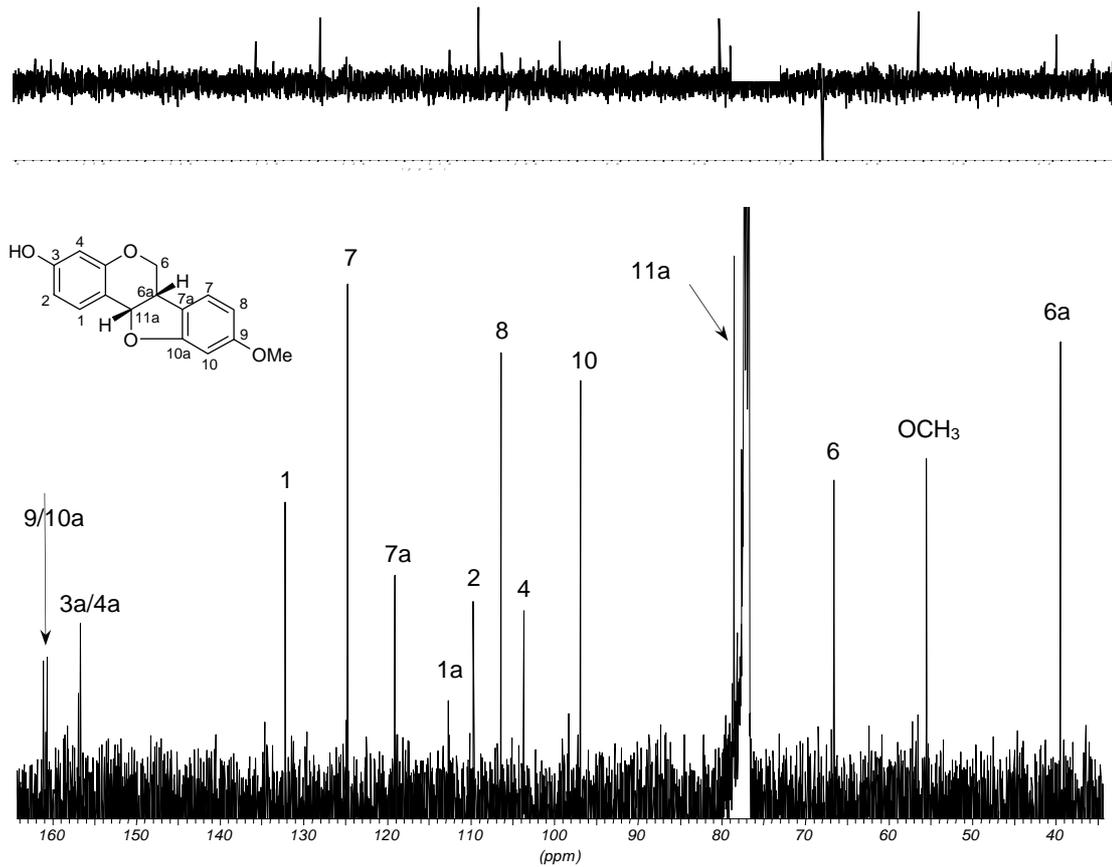


Abb. 39: ^{13}C -NMR- und zugehöriges DEPT-Spektrum der Substanz PT2 (125 MHz, in CDCl_3)

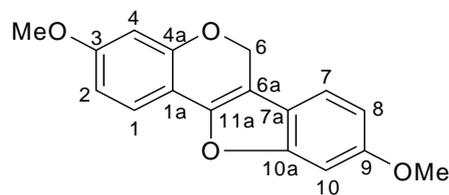
Tab. 25: NMR-Daten von PT2 (500 bzw. 250 MHz, in CDCl_3) im Vergleich Medicarpin; Lit.1 nach McMURRY *et al.*, 1972 (60 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$); Lit.2 nach CHALMERS *et al.*, 1977 (20 MHz, DMSO-d_6); δ [ppm], J [Hz] (in Klammern)

H-Atom	^1H	^1H (Lit.1)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.2)
1	7,37 d (8,4)	7,35 d (8,0)	1	132,2	132,0
2	6,53 dd (8,4; 2,5)	6,4-6,7 m	1a	112,0	111,3
4	6,40 d (2,5)	6,4-6,7 m	2	109,7	109,7
6a	3,51 ddd (5,0 ;6,95; 11,0)	3,6 m	3	156,7	158,7
6ax	3,60 t (11,0)	3,6 m	4	103,7	102,9
6eq	4,22 dd (5,0; 11,0)	4,25 m	4a	156,7	156,4
7	7,11 d (8,8)	7,18 d (8,0)	6	66,6	65,5
8	6,44 dd (2,5; 8,8)	6,4-6,7 m	6a	39,5	39,3
10	6,43 d (2,5)	6,4-6,7 m	7	124,7	125,0
11a	5,47 d (6,95)	5,55 br d (7,0)	7a	119,1	119,4
OCH ₃	3,75 s	3,77 s	8	106,4	106,0
			9	161,2	160,6
			10	96,9	96,3
			10a	160,7	160,4
			11a	78,5	78,1
			OCH ₃	55,5	55,3

Medicarpin hat bei den Leguminosen neben Maackiain als Phytoalexin eine antifungale Wirkfunktion und ist weit verbreitet in dieser Familie. Medicarpin ist im Jahre 1969 von HARPER *et al.* aus *Swartzia madagascariensis* zum ersten Mal isoliert worden und wurde auch in *Dalbergia variabilis* (KUROSAWA *et al.*, 1978), *Gliricidia sepium* (HERATH *et al.*, 1998) und *Ononis viscosa* spp. *breviflora* (BARRERO *et al.*, 1998) gefunden. Für das Vorkommen in *Sophora flavescens* existierte vor den eigenen Untersuchungen noch kein Nachweis in der Literatur.

Identifizierung von PT3 (Anhydrovariabilin)

(3,9-Dimethoxy-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopyran)



Die Verbindung PT3 wurde aus der Teilfraktion II mit einer Ausbeute von 6,5 mg als farbloses amorphes Pulver erhalten. Das UV-Spektrum unterschied sich stark von allen anderen in dieser Art gefundenen Inhaltsstoffen und wies Maxima bei 215, 234, 250, 290, 340 und 356 nm auf. Im Gegensatz zu PT1 und PT2 konnte aufgrund der UV-Maxima bei 340 und 356 nm festgestellt werden, dass ein erweitertes konjugiertes π -System vorliegen musste. Im DC zeigte sich nach Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure eine intensive orange Färbung. Der R_f-Wert betrug 0,95.

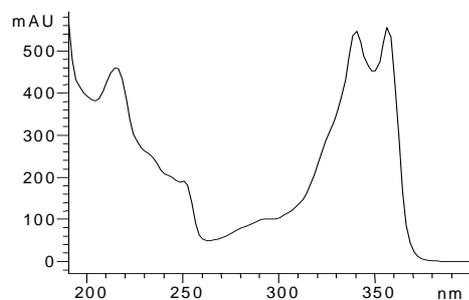


Abb. 40: UV-Spektrum von PT3

Das mittels GC-MS aufgenommene EI-Massenspektrum von PT3 (Abb. 41) zeigte den Molpeak bei m/z 282, was durch die Aufnahme eines $\text{Cl}-(\text{NH}_3)$ -

Spektrums bestätigt wurde. Das Fragment bei m/z 267 entstand aus der Abspaltung einer Methylgruppe und deutete das Vorliegen einer Methoxygruppe an. Dies konnte durch die NMR-Untersuchungen belegt werden (Abb. 42). Zusätzlich wurde das Massenspektrum mit dem von Anhydrovariabilin, das sich in einer Massenspektren-Datenbank befand, verglichen und zeigte deutliche Übereinstimmungen.

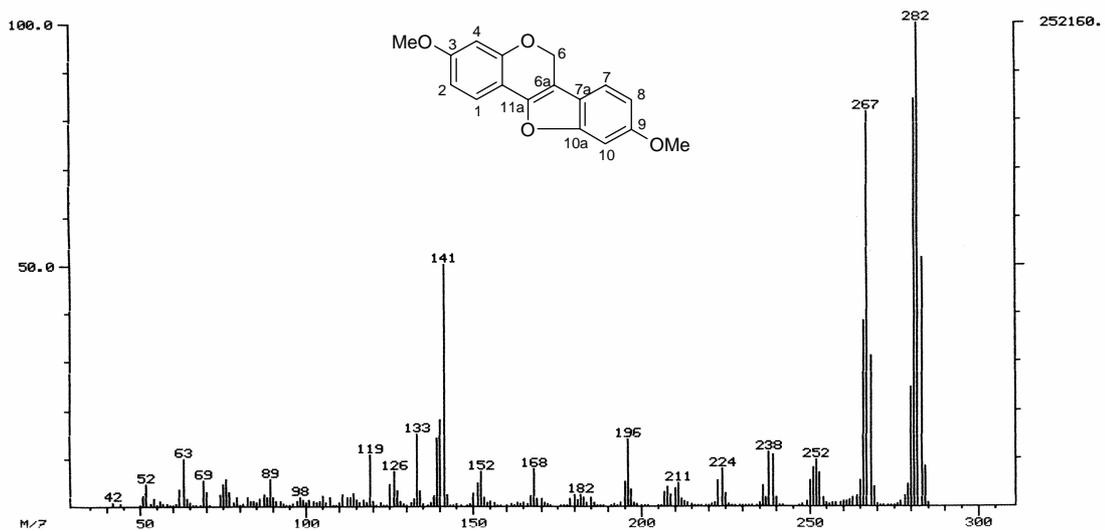
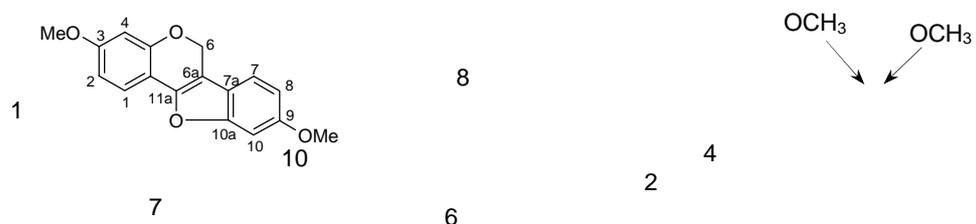


Abb. 41: GC-EI-MS-Spektrum von PT3

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PT3 fanden sich im Bereich zwischen 3,7-3,9 ppm zwei 3-Protonen-Singulets für jeweils eine Methoxygruppe. Ein weiteres Singulett trat bei 5,55 ppm mit einem Integral für zwei Protonen auf, welche am C-6 lokalisiert sein sollten. Im Bereich von 6,4-7,4 ppm erschienen die Signale der sechs aromatischen Protonen. Je drei von ihnen gehörten einem ABC-Spinsystem an. Dies konnte aus dem $^1\text{H}/^1\text{H-COSY}$ -Spektrum mit entsprechenden Korrelationspeaks und aufgrund der Kopplungskonstanten von 8,4 und 2,4 Hz bzw. 8,5 und 2,2 Hz entnommen werden. Anhand des COSY-Spektrums wurde auch die Zuordnung zu den Spinsystemen festgelegt. Daraus konnten für die Verbindung zwei 1,2,4-trisubstituierte Benzolringe abgeleitet werden.

In den Detailvergrößerungen der einzelnen Signale des Protonenspektrums waren sogar zusätzliche Aufspaltungen erkennbar, die durch para-Kopplungen mit 0,95 bzw. 1,1 Hz hervorgerufen wurden.



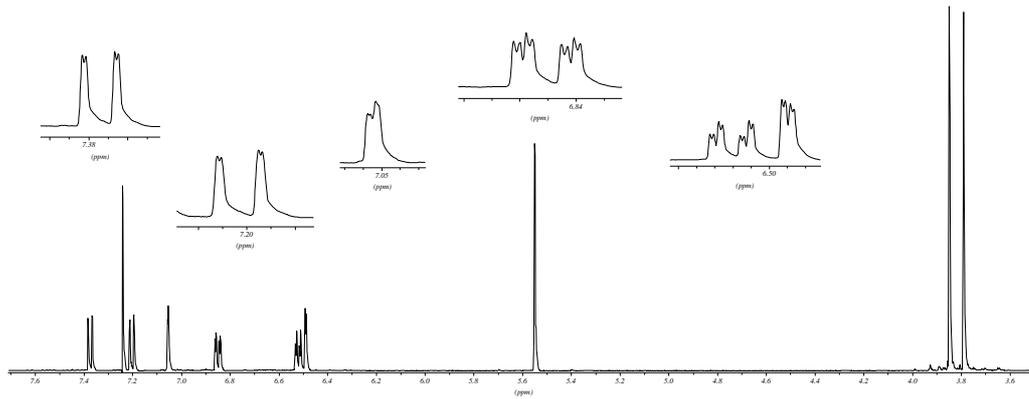


Abb. 42: ^1H -NMR-Spektrum von PT3 (500 MHz, in CDCl_3)

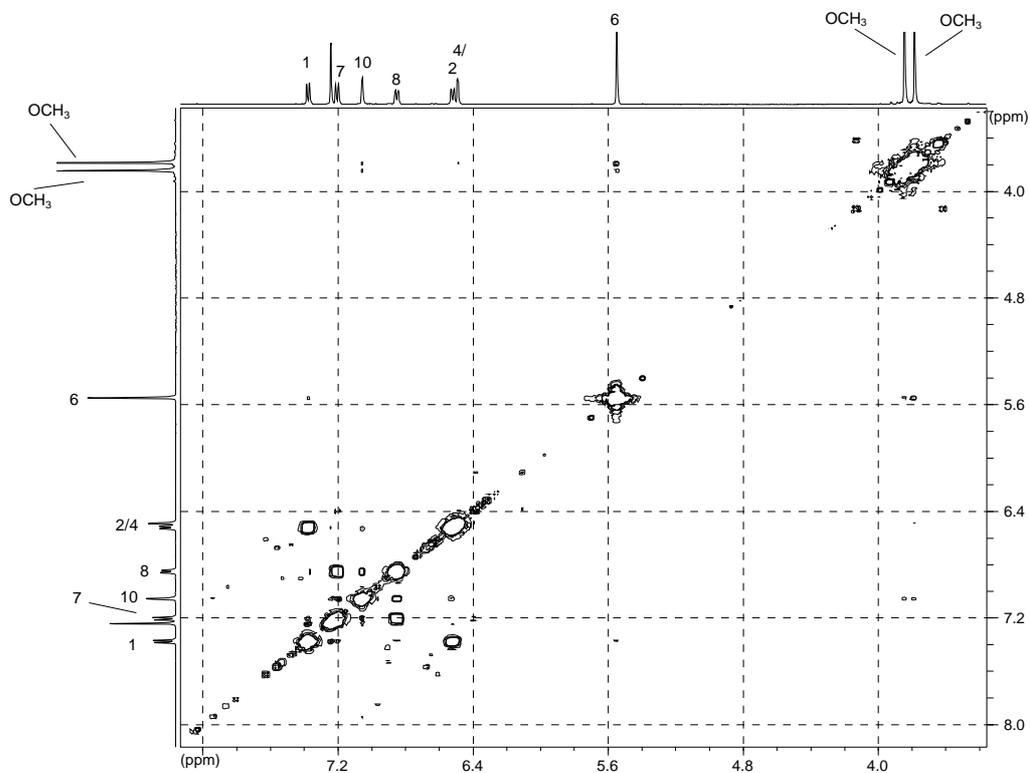


Abb. 43: $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum von PT3 (125 MHz, in CDCl_3)

Im ^{13}C -Spektrum fallen auf den ersten Blick 15 Signale für 17 Kohlenstoffatome auf (dabei überlagerten sich die der beiden Methoxygruppen nahezu), sowie auch die Signale von C-10a und C-4a (Abb. 44). Da bisher für Anhydrovariabilin noch keine ^{13}C -Daten existierten, wurden die gemessenen Daten mit denen des 9-Hydroxy-3-methoxypterocarp-6a-ens verglichen (MIYASE *et al.*, 1980). Der Unterschied der beiden Verbindungen besteht lediglich in der zusätzlichen

Methylierung des Anhydrovariabilins am C-3. Daraus resultieren geringfügige Abweichungen beim Vergleich mit den Literaturdaten (Tab. 26).

Die Frage, an welcher Position sich die beiden Methoxygruppen befinden, ließ sich in sofern klären, als dass C-4 und C-10 zwischen zwei Sauerstoffatomen lokalisiert waren. Dies hatte zur Folge, dass ihre chemischen Verschiebungen bei $\delta=102,4$ bzw. $96,7$ ppm erschienen. Wenn die OCH_3 -Gruppen an C-2 bzw. C-8 gebunden gewesen wären, hätten die Aromaten jeweils als p-Phenole vorgelegen, und die Shiftwerte von C-2 und C-4 wären bei ca. 110-115 ppm zu finden gewesen.

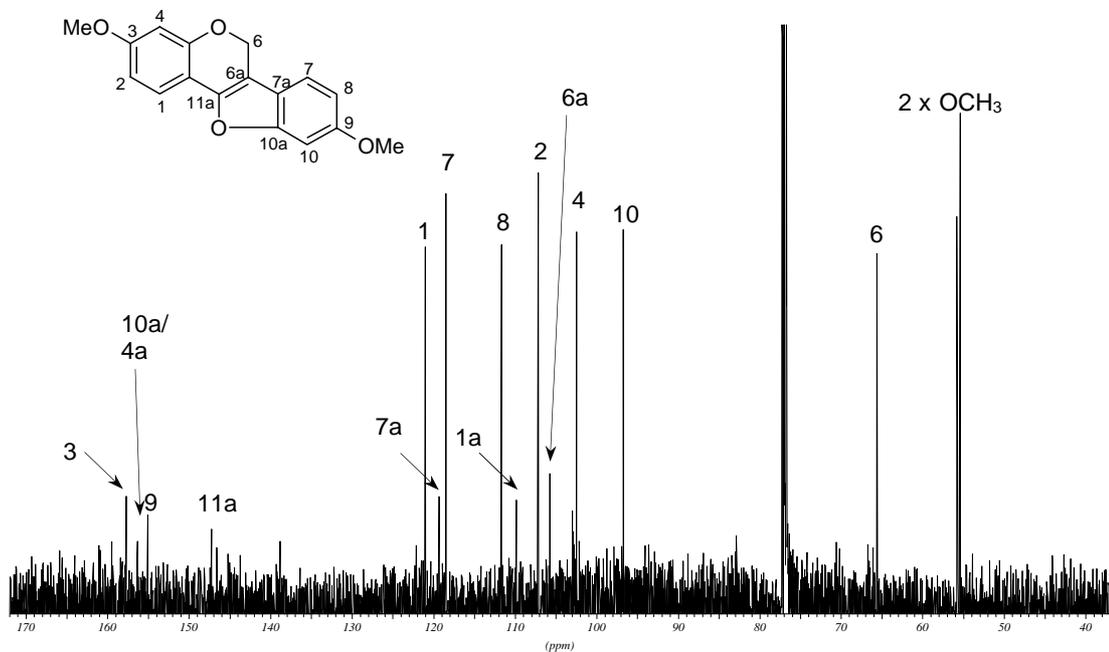


Abb. 44: ^{13}C -NMR-Spektrum von PT3 (125 MHz, in CDCl_3)

Tab. 26: ¹H- und ¹³C-Daten von PT 3 (Anhydrovariabilin) (500 MHz bzw. 125 MHz, in CDCl₃) im Vergleich mit NMR-Daten von HARPER (Lit.1; 60 MHz, CDCl₃) und MIYASE (Lit.2, 400 bzw. 100 MHz, in Aceton-d₆; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend; n.a.= nicht angegeben

H-Atom	PT3	Lit.1	Lit.2	C-Atom	PT3	Lit.2
1	7,37 dd (8,4; 0,95)	7,36 d (8,5)	7,35 d (8,5)	1	121,0	121,5
2	6,52 ddd (8,4; 2,4; 0,95)	6,49 s	6,57 dd (8,5; 2,5)	1a	109,9	110,6
4	6,49 dd (2,4; 0,95)	6,47 d (2,0)	6,49 d (2,5)	2	107,1	107,9
6	5,55 s	n.a.	5,57 s	3	157,7	162,0
7	7,20 dd (8,5; 1,1)	7,19 d (8,5)	7,29 d (8,5)	4	102,4	103,3
8	6,85 ddd (8,5; 2,2; 1,1)	6,81 s	6,84 dd (8,5; 2,5)	4a	156,3	156,0
10	7,05 dd (2,2; 1,1)	7,03 d (2,0)	7,02 d (2,5)	6	65,6	66,1
OCH ₃	3,79 s 3,85 s (6H)	3,77 s 3,82 s (6H)	3,80 s (6H)	6a	105,7	106,9
				7	118,5	119,9
				7a	119,3	119,3
				8	111,7	113,2
				9	155,1	156,5
				10	96,7	99,2
				10a	156,3	157,4
				11a	147,3	147,5
				OCH ₃	55,8	55,7
					55,4	

Auf der Basis aller spektralen Daten konnte PT3 eindeutig als Anhydrovariabilin identifiziert werden. Bisher wurde das Vorkommen von Anhydrovariabilin (als Synonym wird 3,9-Dimethoxypterocarp-6a-en genannt) als Naturstoff nur in *Swartzia madagascariensis* von HARPER *et al.* (1969), in *Ononis viscosa* spp. *breviflora* von BARREO *et al.* (1998) und in *Lespedeza cytobotrya* von MIYASE *et al.* (1999) beschrieben. Das Vorkommen dieser Substanz ist neu für *Sophora flavescens*.

5.2.2 Isolierung und Identifizierung der Flavanone

Allgemeines

Die **UV-Spektren** von Flavanonen zeigen zwei Hauptbanden im Bereich zwischen 200 und 400 nm. Während die längerwellige Bande (280 - 400 nm) dem B-Ring als Chromophor zugeschrieben wird (auch Bande 1 genannt), wird

die kürzerwellige Bande (200 - 280 nm; auch als Bande 2 bezeichnet) durch den A-Ring verursacht (MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982).

Auch die **Massenspektroskopie** bietet wichtige Hinweise zur Struktur- aufklärung von Flavonoiden. Als charakteristische Fragmente treten insbesondere die Bruchstücke des A-Ringes und B-Ringes, sowie deren Folgeprodukte hervor. Sie entstehen zum einen durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA) auf dem Weg 1, der die Bruchstücke $[A]^+$ und $[B_1]^+$ liefert, während auf dem konkurrierenden Weg 2 das $[B_2]^+$ Fragment gebildet wird. Die Spaltprodukte $[A]^+$, $[B_1]^+$, $[B_2]^+$ und ihre Folgeprodukte geben Aufschluss über Art und Anzahl der Substituenten an den jeweiligen Ringen.

Bei Anwesenheit einer Lavandulylgruppe am Flavonoidgerüst findet sich das Fragment $[M-123]^+$, was die Abspaltung dieser Seitenkette in Benzylstellung ausdrückt (WU *et al.*, 1985). Im Fall der Anwesenheit einer Isopentenyl-Seitenkette tritt das Fragment $[M-55]^+$ auf (KUROYANAGI *et al.*, 1999).

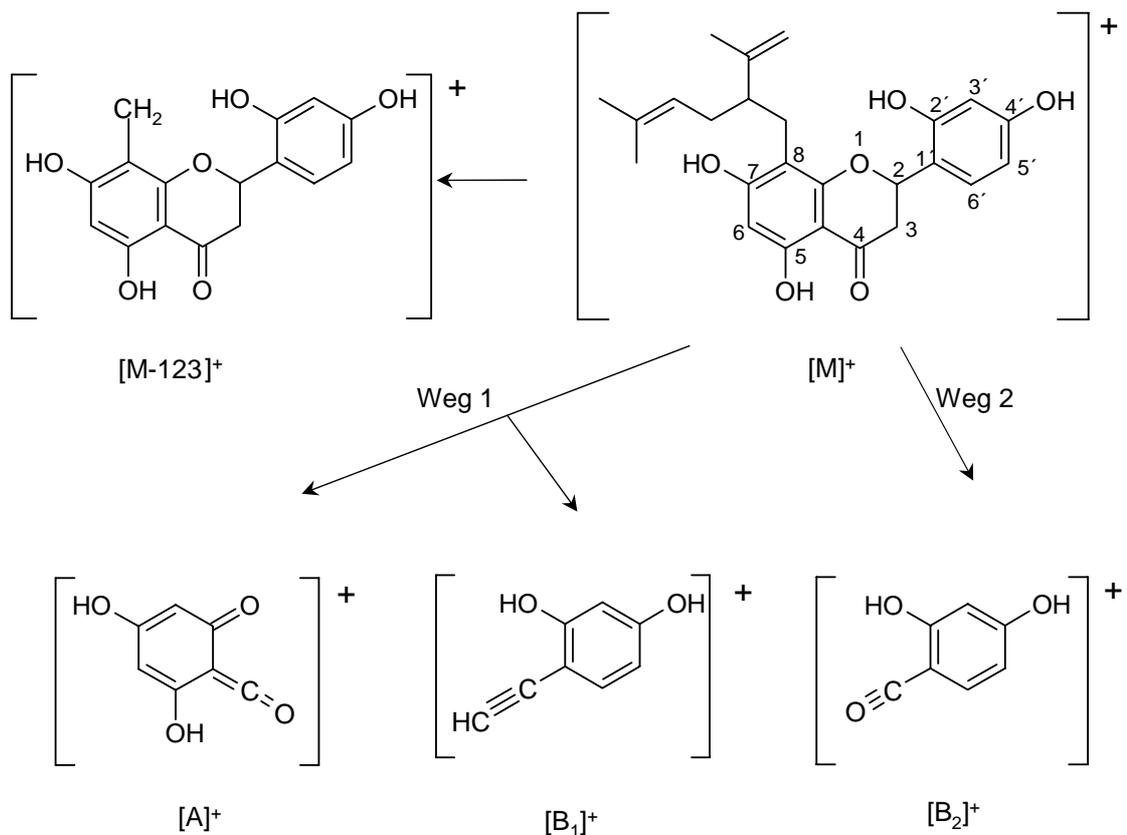


Abb. 45: MS-Fragmentierung von Flavanonen am Beispiel von Sophoraflavanon G

Die Massenspektroskopischen Untersuchungen der im folgenden Teil der Arbeit diskutierten Stoffe wurden mangels GC-Gängigkeit der Substanzen mittels einer Direkteinlass-Methode oder der FAB-Spektroskopie durchgeführt.

Die **NMR-Spektroskopie** spielt ebenfalls eine große Rolle bei der Strukturaufklärung der Flavonoide. Dabei erscheinen die Protonen des A-Ringes in ^1H -Spektren bei höherem Feld (ca. 6 ppm) als die des B-Ringes (ca. 6,5-7,5 ppm). Im Falle einer Hydroxylierung an C-5 ist das Proton der OH-Gruppe stets als scharfes Singulett aufgrund einer Wasserstoffbrückenbildung zur Carbonylgruppe bei ca. 12 ppm zu finden (MABRY *et al.*, 1970).

Die Verschiebungen der Kohlenstoffatome erscheinen für C-2 bei ca. 75-80 ppm, das Signal des C-4 fand sich in der Regel bei 190-200 ppm. Signale bei ca. 55 ppm können in den ^{13}C -Spektren den Methoxygruppen zugeordnet werden (AGRAWAL, 1989).

Zusätzlich aufgenommene **HMBC**-Spektren oder in einem Fall auch ein **ROESY**-Spektrum waren hilfreich bei der Lokalisierung der Substituenten an den Aromaten.

Die absolute Konfiguration (2S-Konfiguration am C-2-Kohlenstoffzentrum) wurde mittels **CD-Spektroskopie** (Circular Dichroismus) bestimmt. Wenn eine enantiomerenreine Probe mit linear polarisiertem Licht bestrahlt wird, wird die Ebene des austretenden Lichts um den Winkel α gedreht, vorausgesetzt, zwischen dem eingestrahnten Photon und den Probenmolekülen treten nur elastische Stöße auf. Strahlt man im Bereich einer UV-Absorptionsbande ein, tritt zusätzlich eine unterschiedlich starke Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht auf (Cotton- oder CD-Effekt) (GAFFIELD, 1970; SNATZKE, 1968 und 1981). Abb. 46 zeigt beispielhaft für alle anderen isolierten Flavanone ein aufgenommenes Spektrum.

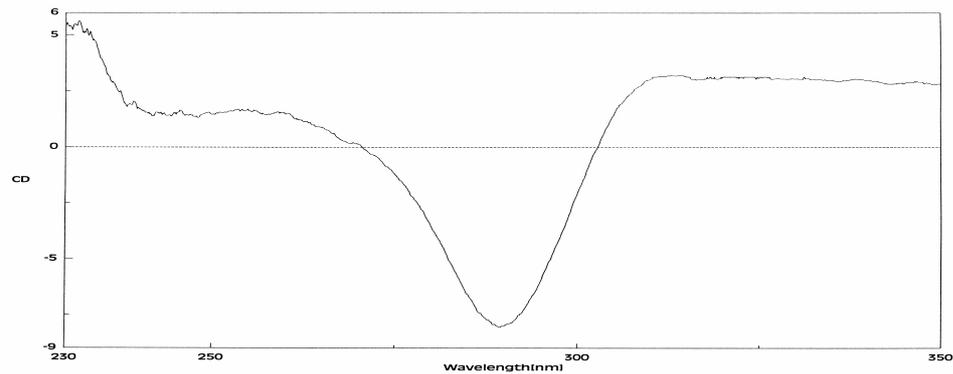
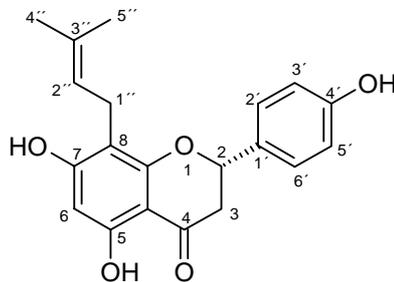


Abb. 46: CD-Spektrum am Beispiel von Kushenol P

Das Spektrum zeigt einen positiven Cotton-Effekt bei 314 nm, was einem $n \rightarrow \pi^*$ Elektronenübergang zuzuordnen ist. Bei 290 nm erkennt man einen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang als negativen Cotton-Effekt, der im Spektrum am stärksten ausgeprägt ist.

Identifizierung von FL1 (Sophoraflavanon B)

(4',5,7-Trihydroxy-8-prenylflavanon)



In der Teilfraktion III fand sich unter anderem die Substanz FL1, die schließlich als schwachgelbes amorphes Pulver nach semipräparativer DC rein mit 3 mg isoliert werden konnte. Das für Flavanone charakteristische UV-Spektrum zeigte Maxima bei 195, 295 und 336 nm, sowie eine Schulter bei 224 nm.

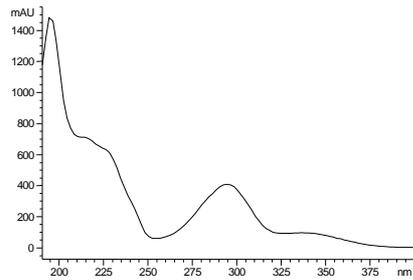


Abb. 47: UV-Spektrum von FL1

Im EI-Massenspektrum von FL1 (Abb. 48) erschien das Molek lion bei m/z 340. Durch Eliminierung einer Methylgruppe der Seitenkette entstand das Fragment m/z 325. Weitere Schl sselbruchst cke, die für die Anwesenheit einer Dimethylallylkette sprechen, stellten die Abspaltungen von 43 und 55 Masseneinheiten vom Molek lion bzw. vom Retro-Diels-Alder-Fragment A, das sich bei m/z 220 im Spektrum zeigte, dar. Das durch Allylsplaltung entstandene kationische Isoprenbruchst ck der Prenylseitenkette erschien bei m/z 69.

Daneben fanden sich weitere typische Fragmente einer Retro-Diels-Alder-Splaltung (RDA), wie die bei m/z 120 oder 165 (McCORMICK *et al.*, 1985 und TAHARA *et al.*, 1994).

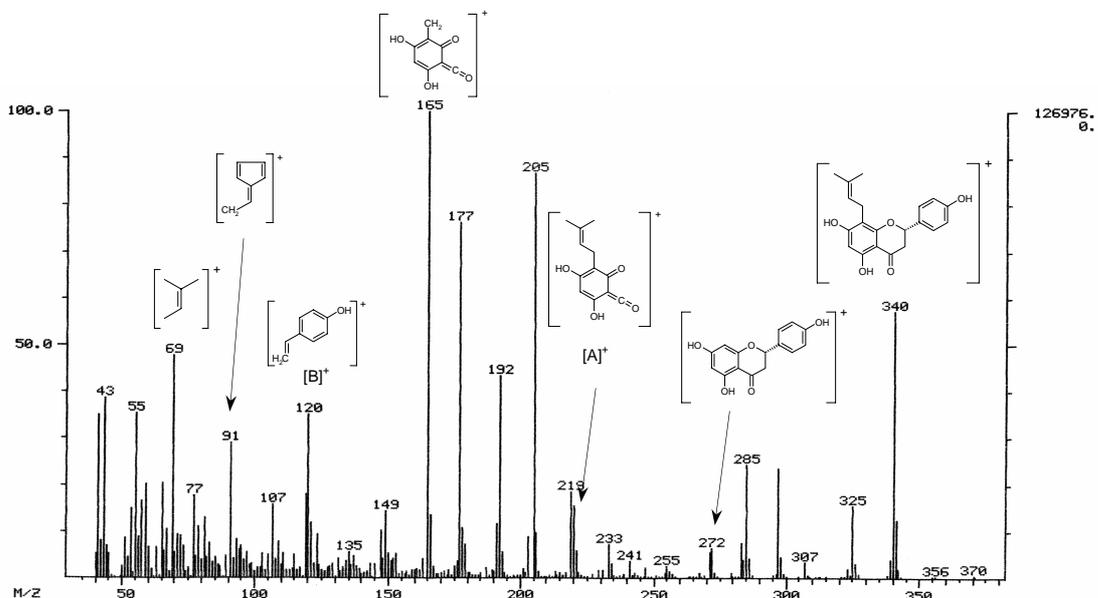


Abb. 48: EI-MS-Spektrum von FL1

Die bisherigen Informationen aus den UV- und MS-Spektren ließen sich sehr gut mit den Protonen-NMR-Messungen in Einklang bringen. Im tiefen Feld kamen die erwarteten aromatischen Protonen zur Resonanz. Die Monosubstitution des B-Ringes an C-4' wurde durch zwei typische symmetrische Dubletts (jeweils mit Integralen für zwei Protonen) für ein aromatisches AA'BB'-System bestätigt. Zudem wiesen die Signale einen Dacheffekt auf, was ebenfalls charakteristisch für das Vorliegen einer solchen paraphenolischen Substitution ist. Daneben trat ein Singulett bei 5,93 ppm auf, das dem H-6 des A-Ringes zuzuordnen war. Die beiden meta-ständigen OH-Gruppen am A-Ring in C-5 und C-7-Position erschienen bei 12,1 bzw. 9,56 ppm als Singuletts. Das Signal an C-5 war besonders auffällig und im Spektrum gut sichtbar, da diese OH-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur Ketogruppe an C-4 eingeht. Dadurch wird der Austausch des Protons so stark zurückgedrängt, dass ein recht scharfes Singulett resultiert.

Die drei Protonen des C-Ringes, eines an C-2 bei 5,39 ppm als Dublett vom Dublett, zwei an C-3 (2,7 bzw. 3,1 ppm) wiesen typische Signallagen von Flavanonen auf. Hier zeigte sich das Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems. Wegen der Tieffeldlage musste das Doppelduplett bei 5,4 ppm dem Proton H-2 (X-Teil) zugeordnet werden, da es eine trans-diaxiale Kopplung von 12,6 Hz mit dem Proton H-3 eq (AB-Teil) und eine kleinere Kopplung von 3,15 Hz mit dem äquatorial stehenden H-3 ax (AB-Teil) zeigte. Neben der Kopplung mit H-2 wiesen H-3 eq und H-3 ax eine geminale Kopplung von 17,1 Hz auf.

Die restlichen vier Signale im Spektrum waren der Prenyl-Seitenkette zuzuordnen. Im Hochfeld fanden sich bei 1,53 bzw. 1,57 ppm jeweils die endständigen Methylgruppen. Die Methylengruppe als breites Dublett bei 3,06 ppm an C-1'' koppelte mit dem Proton an C-2'', was als breites Triplett auftrat.

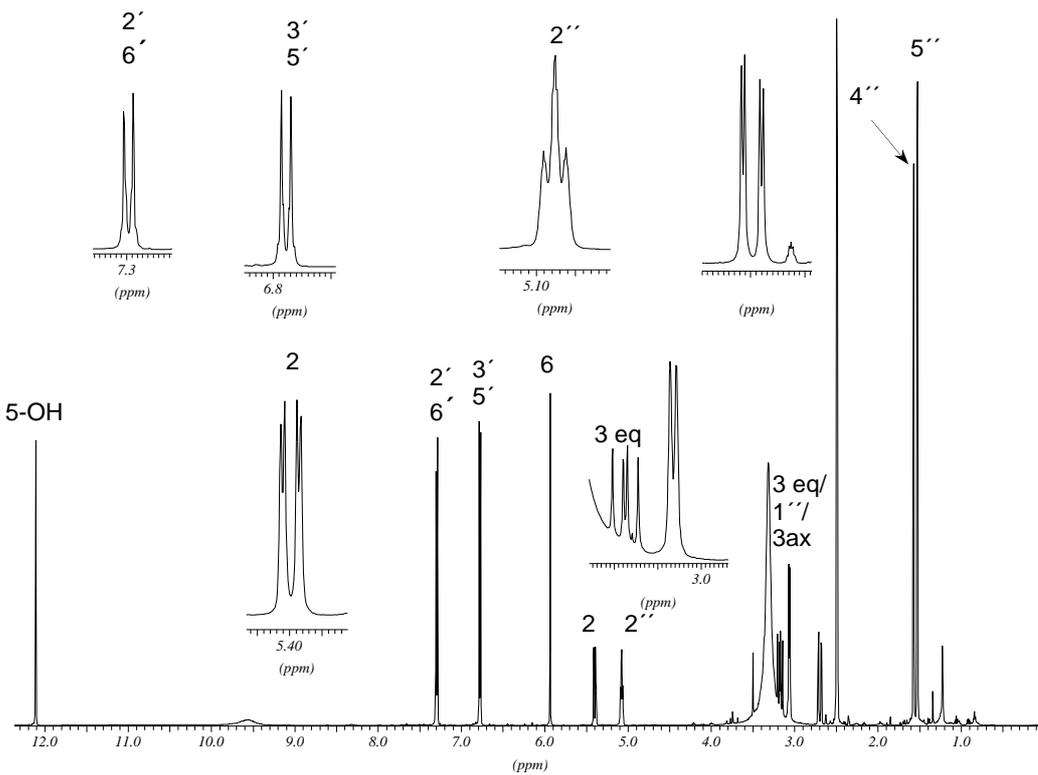


Abb. 49: ^1H -NMR-Spektrum von FL1 (500 MHz, in DMSO-d_6)

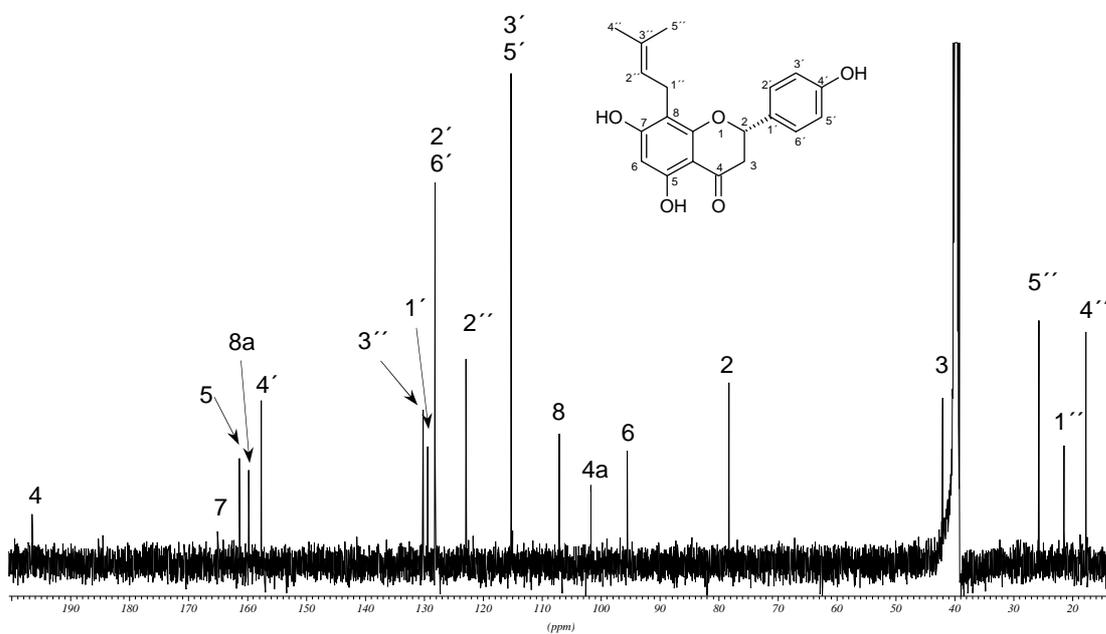


Abb. 50: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL1 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Die beiden intensivsten Signale des ^{13}C -NMR-Spektrums bei 115,3 ppm und 128,2 ppm wurden den C-2'/6'- bzw. C-3'/5'-Atomen zugeordnet. Aufgrund der

para-Substitution des B-Ringes ragten die Signale bedingt durch deren Zusammenfallen mit einer höheren Intensität heraus.

Tab. 27: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von FL1 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆) im Vergleich zu entsprechenden Werten von Sophoraflavanon B (100 MHz bzw. 25 MHz, in DMSO-d₆); Literaturwerte (Lit.) stammten von KOMATSU *et al.*, 1978; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend; n.a.= nicht angegeben

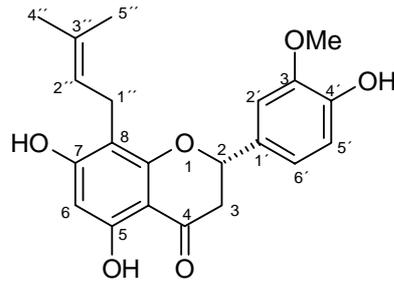
H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
2	5,39 dd (12,6; 3,2)	5,45 dd (12,1; 3,5)	2	78,3	78,3	2'	128,2	128,3
3ax	2,7 dd (17,1; 3,2)	2,6-3,13 m	3	42,1	42,0	3'	115,3	115,4
3eq	3,16 dd (12,6; 17,1)	2,6-3,13 m	4	196,5	197,1	4'	157,7	157,9
6	5,93 s	6,03 s	4a	101,7	n.a.	5'	115,3	115,4
2'	7,29 d (8,5)	7,42 d (8,8)	5	161,4	161,6	6'	128,2	128,3
3'	6,77 d (8,5)	6,93 d (8,8)	6	95,5	95,4	1''	21,4	n.a.
5'	6,77 d (8,5)	6,93 d (8,8)	7	165,1	164,7	2''	122,9	122,9
6'	7,29 d (8,5)	7,42 d (8,8)	8	107,1	107,1	3''	130,2	130,5
1''	3,06 br d (7,0)	3,22 br d (7,9)	8a	159,8	160,1	4''	17,7	17,5
2''	5,07 br t (7,0)	5,20 br d (7,9)	1'	129,4	129,5	5''	25,7	25,5
4''	1,57 s	1,61 s						
5''	1,53 s	1,61 s						
5-OH	12,11 s	12,15 s						

Die Klärung der absoluten Konfiguration am C-2 Kohlenstoff erbrachte eine CD-Messung. Dabei glich das Spektrum von FL1 dem von Kushenol P, welches als Referenz verwendet wurde (Abb. 46). Somit lag bei FL1 eine S-Konfiguration an C-2 vor.

Den Spektrenanalysen und Interpretationen nach handelte es sich bei FL1 somit um Sophoraflavanon B, das auch unter den Synonymen Flavaprenin und 8-C-Prenylnaringenin bekannt ist. Die Substanz wurde bereits 1993 von ZHAO *et al.* als Inhaltsstoff von *Sophora flavescens* beschrieben. Weiterhin berichteten SHIRATAKI *et al.* (1988) vom Vorkommen der Substanz in *Sophora moorcroftiana*, KOMATSU *et al.* (1978) in *Sophora tomentosa*, BOHLMANN *et al.* (1979) in *Marshalla grandiflora*, BOHLMANN *et al.* (1984) in *Helichrysum athrixifolium*, MCCORMICK *et al.* (1985) in *Wyethia glabra*, TAHARA *et al.* (1994) in *Lupinus luteus* und STEVENS *et al.* (2000) in *Humulus lupulus*.

Identifizierung von FL2 (Exiguaflavanon K)

(4',5,7-Trihydroxy-3'-methoxy-8-prenylflavanon)



Die Substanz FL2 wurde als gelbes amorphes Pulver mit einer Ausbeute von 3 mg in gleicher Weise isoliert wie FL1. Das UV-Spektrum zeigte ähnliche Maxima (204, 292 und 339 nm) und die Schulter bei 230 nm wie Sophoraflavanon B und deutete wiederum auf das Vorliegen eines Flavanonderivates hin.

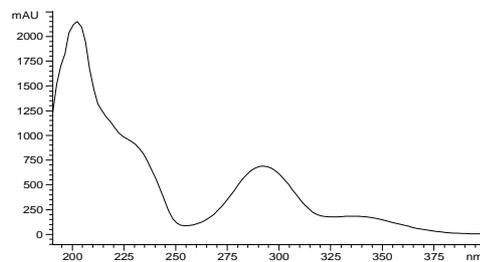


Abb. 51: UV-Spektrum von FL2

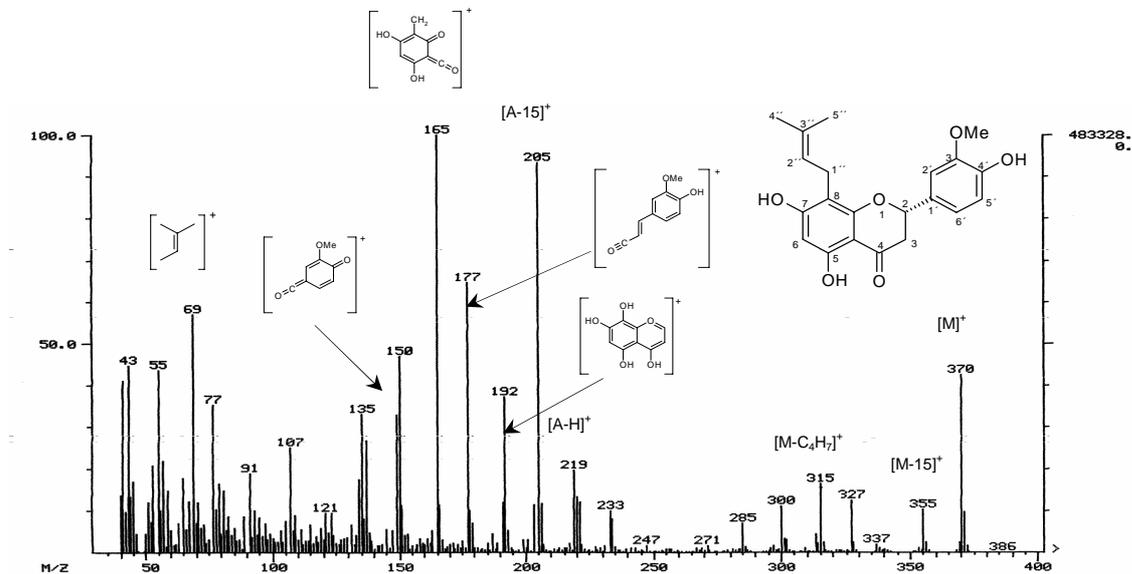


Abb. 52: Direkt-EI-Massenspektrum von FL2

Das Massenspektrum zeigte die schon bei FL1 beschriebenen Fragmente, die für das Vorhandensein einer Prenylseitenkette sprachen. Sowohl Fragmentationen bei m/z 43, 55 und 69 amu als auch Abspaltungen dieser Fragmente vom

Molekülion. Für die Anwesenheit einer Methoxygruppe sprach $[M-15]^+$. Die Methylgruppe war wahrscheinlich am B-Ring lokalisiert, denn mit m/z 219, 205, 192 und 165 fanden sich Fragmente des A-Ringes, die diese Methoxygruppe nicht enthielten. Bei den Fragmenten m/z 150 und 177 war sie dagegen enthalten.

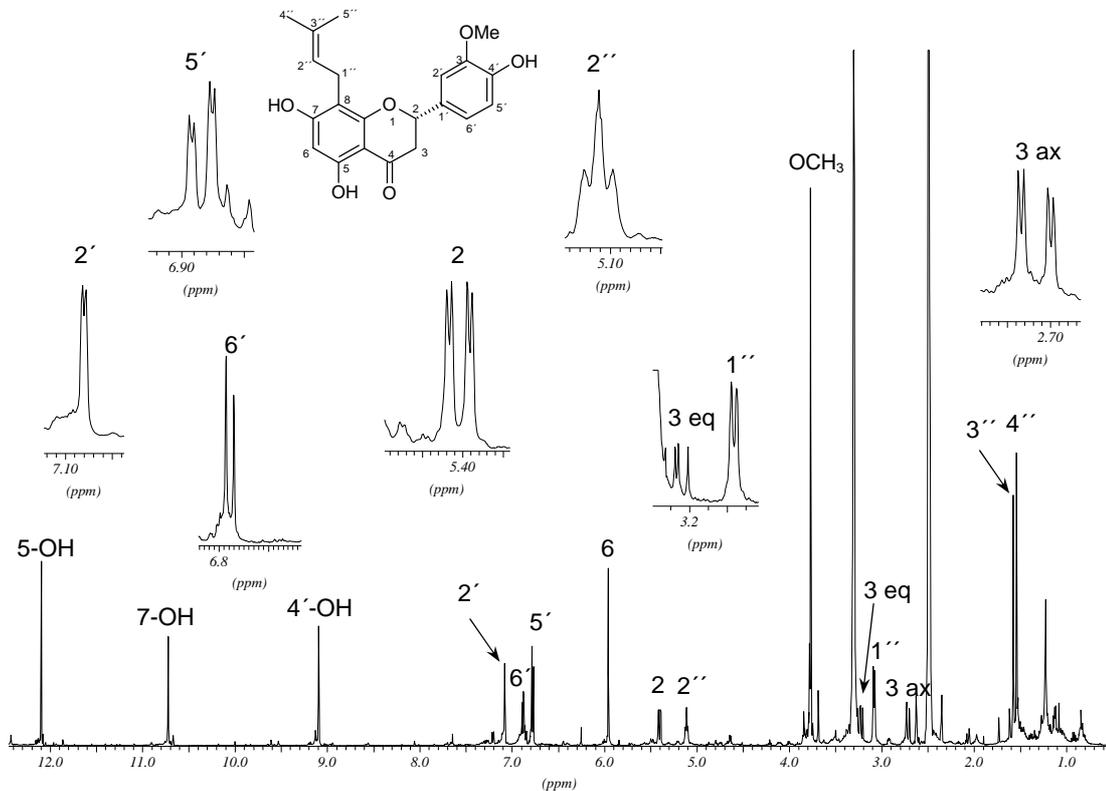


Abb. 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL2 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 53) bestätigte die bisherigen Strukturvermutungen. Im Spektrum erschienen die Protonen für den A- und C-Ring, sowie für die Prenyl-Seitenkette bei gleicher Resonanz wie sie bereits bei FL1 diskutiert wurden. Lediglich die im tiefen Feld in Resonanz tretenden B-Ring-Protonen zeigten durch die Einführung eines weiteren Substituenten nun das Aufspaltungsmuster eines ABC-Systems. H-5' erschien als Dublett bei 6,78 ppm mit $J = 8,1$ Hz und koppelte mit dem ortho-ständigen H-6', das als Doppeldublett bei 6,88 ppm erschien. Der zweite Kopplungspartner des 6'-Protons war H-2' mit der Signallage bei 7,08 ppm. Die vermutete Zuordnung wurde durch HMBC- und ROESY-Spektren (Abb. 54 und Abb. 55) bestätigt. Das HMBC-Spektrum verdeutlicht durch das Vorliegen eines Crosspeaks von C-2 hin zu den oder zumindest einem aromatischen Proton/-en den Ausschluss einer 2'/6'-Substi-

tution des B-Ringes. Mit Hilfe des ROESY-Spektrums ließ sich auch die Stellung der Methoxygruppe abklären. Während bereits aus den MS-Daten hervorgegangen sein musste, dass diese am Ring B lokalisiert war, zeigte ein Kreuzsignal eine Wechselwirkung zwischen C-2' und der Methoxygruppe. Das in DMSO als Lösungsmittel aufgenommene ROESY-Spektrum erklärt auch die Zuordnungen der weiteren im ^1H -Spektrum sehr gut zu erkennenden Hydroxylgruppen an C-7- und C-4'. Durch Korrelationen der H-6'- und H-4'-Protonen zu einem der Signale dieser Hydroxylgruppen bei 9,09 ppm wurde sie als 4'-OH identifiziert. Die dritte Hydroxylgruppe des Protonenspektrums bei 12,09 ppm war an C-5 gebunden. Sämtliche ^1H -Daten und ^{13}C -Daten sind in Tab. 28 und Tab. 29 aufgelistet.

Tab. 28: ^1H -NMR-Daten von FL2 (500 MHz) bzw. Exiguaflavanon K von IINUMA *et al.*, 1994 (Lit.) (in Aceton- d_6 ; Messfrequenz konnte nicht ermittelt werden); δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend; *gekennzeichnete Werte wurden in der Literaturquelle nicht zugeordnet nicht zugeordnet; **Zuordnungen vertauschbar

H-Atom	^1H (CDCl_3)	^1H ($\text{DMSO-}d_6$)	^1H (Lit.)
1''	3,29 d (7,6)	3,08 d (7,1)	3,24 br d (6,0)
2''	5,20 t (7,0)	5,11 t (7,1)	5,22 t like m
4''	1,70 s	1,57 s**	1,62 s
5''	1,70 s	1,54 s**	1,62 s
2	5,31 dd (13,1; 3,2)	5,41 dd (12,6; 3,0)	5,45 dd (13,0; 3,0)
3ax	2,78 dd (17,4; 3,2)	2,72 dd (17,1; 3,0)	2,77 dd (17,0; 3,0)
3eq	3,03 dd (17,4; 13,1)	3,23 dd (17,1; 12,6)	3,17 dd (17,0; 13,0)
6	6,0 s	5,96 s	6,04 s
2'	6,95-6,92 m	7,08 d (2,0)	7,21 d (2,0)
5'	6,95-6,92 m	6,78 d (8,1)	6,88 d (8,0)
6'	6,95-6,92 m	6,88 dd (8,1; 2,0)	7,02 d (8,0 2,0)
OCH_3	3,91 s	3,77 s	3,90 s
4'-OH		9,09 s	7,75 br s*
5-OH	11,98 s	12,09 s	12,14 s
7-OH		10,72 s	9,60 br s*

Tab. 29: ^{13}C -NMR-Daten von FL2 (500 bzw. 125 MHz, in CDCl_3); zum Vergleich Daten von Exiguaflavanon K in Aceton- d_6 (Messfrequenz des Gerätes konnte nicht ermittelt werden) von IINUMA *et al.*, 1994 (Lit.); δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
2	79,3	80,1	3'	146,9	148,6
3	43,6	43,8	4'	146,3	147,9
4	196,6	197,7	5'	114,7	115,8
4a	103,4	103,4	6'	119,6	120,4
5	162,5	163,1	1''	22,1	22,4
6	97,1	96,5	2''	121,8	123,8
7	163,9	165,1	3''	135,2	131,4
8	106,4	108,4	4''	26,1	26,0
8a	159,9	161,2	5''	18,1	18,0
1'	130,9	129,8	OCH ₃	56,2	56,4
2'	108,9	111,1			

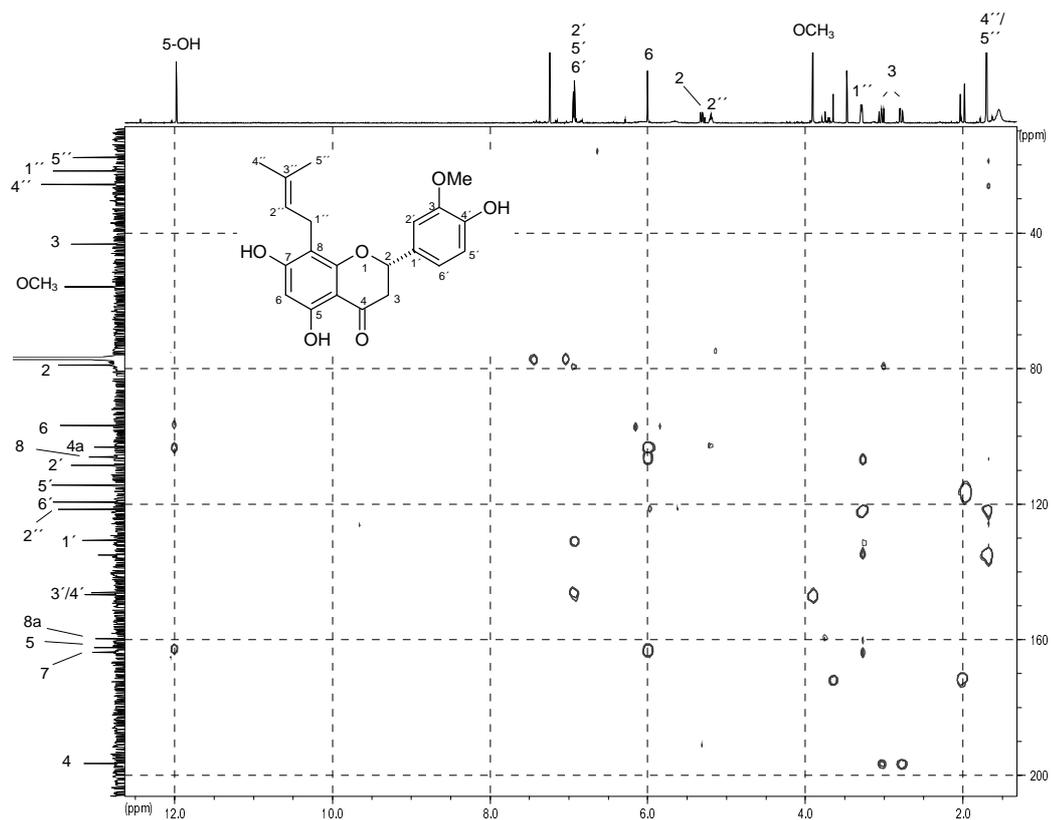


Abb. 54: HMBC-Spektrum von FL2 (500 bzw. 125 MHz, in CDCl_3)

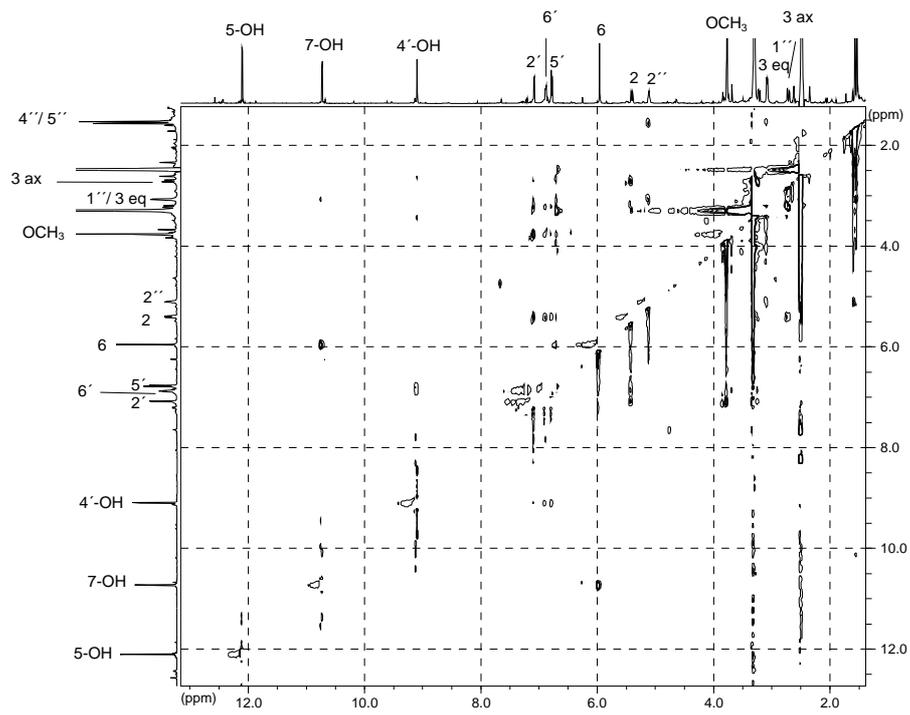


Abb. 55: ROESY-Spektrum von FL2 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO- d_6)

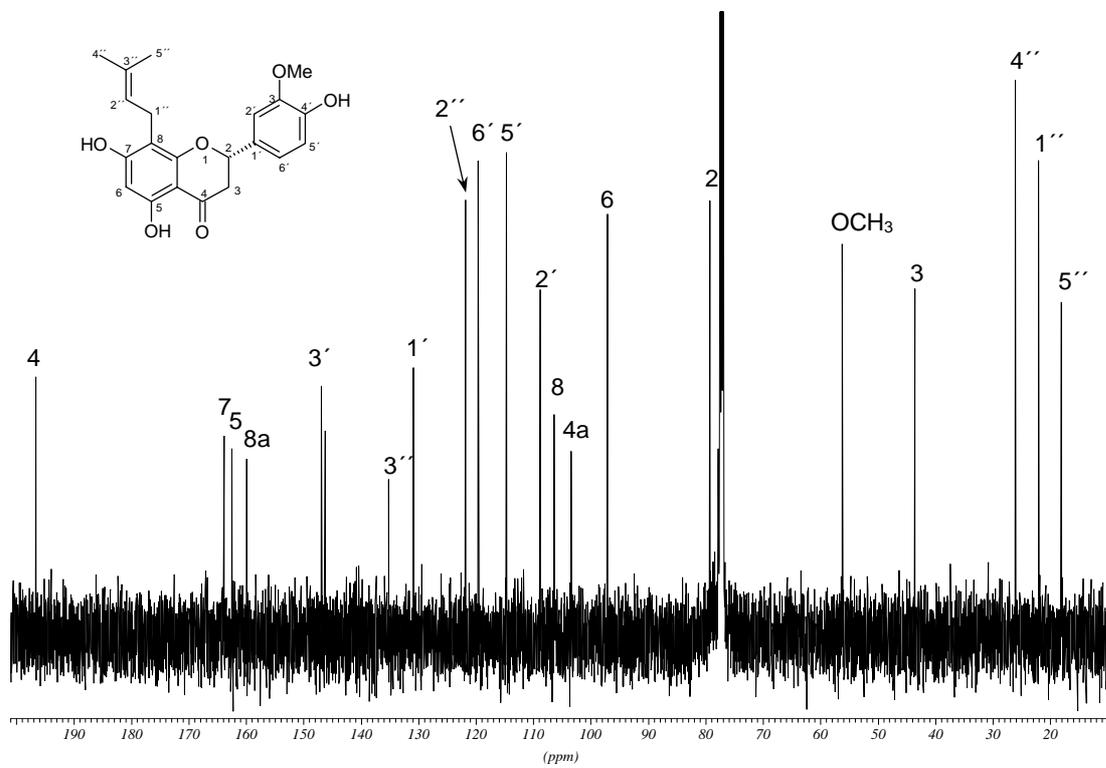
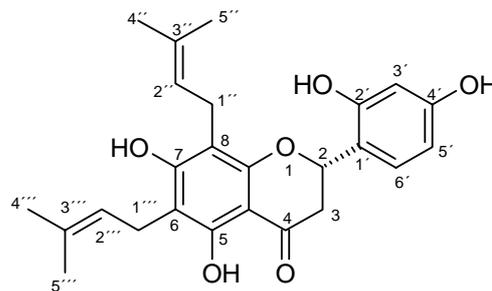


Abb. 56: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL2 (500 MHz, in CDCl_3)

Aufgrund dieser Überlegungen handelte es sich bei FL2 eindeutig um Exiguaflavanon K. Die Substanz wurde im Jahre 1994 von IINUMA *et al.* erstmalig aus *Sophora exigua* isoliert. Sie wurde als Inhaltsstoff von *Sophora flavescens* bisher noch nicht beschrieben.

Identifizierung von FL3 (Kushenol E)

(2',4',5,7-Tetrahydroxy-6,8-diprenylflavanon)



FL3 gehörte zu den potentesten Hemmstoffen der Leukotrienbiosynthese, die aus *Sophora flavescens* gewonnen werden konnten.

Verbindung FL3 konnte als gelbes amorphes Pulver in einer Ausbeute von 58,8 mg aus der Unterfraktion IV DC- und HPLC-rein gewonnen werden. Es handelte sich erneut um ein Flavanonderivat mit für Substanzen dieses Grundgerüsts typischem UV-Spektrum.

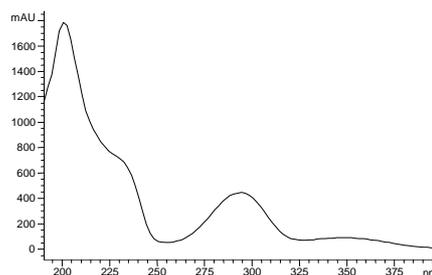


Abb. 57: UV-Spektrum von FL3

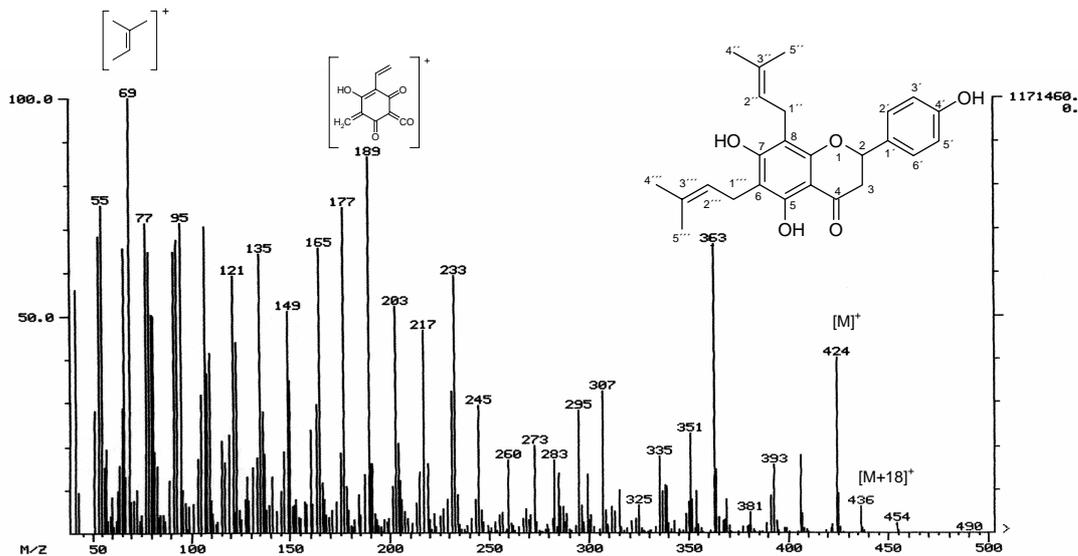
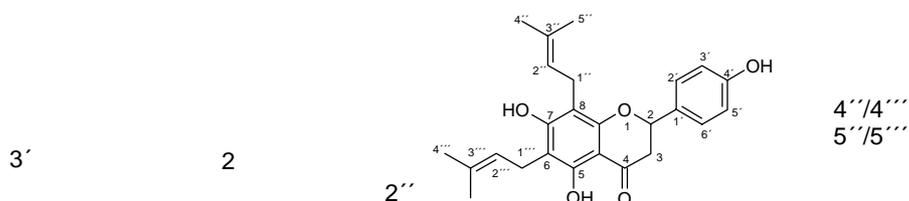


Abb. 58: Direkt-Einlass-EI-MS-Spektrum von FL3

Das MS-Spektrum (Abb. 58) von FL3 besaß ein reichhaltiges Fragmentierungsmuster. Das Molekülion $[M]^+$ fand sich bei m/z 424. Den Basispeak bildete das positiv geladene Isoprenbruchstück m/z 69. Die Intensität des gebildeten Fragmentions und weiterem Molekülbruchstück bei m/z 55, auch mit sehr hoher Intensität, deutete bereits an, dass im Molekül zwei Isopentenyl-Seitenketten enthalten sein könnten. Vorausgesetzt, dass es sich erneut um ein Flavanonderivat handeln würde (siehe Abb. 57) und dass zusätzlich zwei C_5 -Seitenketten gebunden waren, konnte eine Summenformel von $C_{25}H_{28}O_6$ postuliert werden.

Auch das 1H -NMR-Spektrum (Abb. 59) zeigte die Signale zweier Isopentenylseitenketten am Flavanongrundgerüst. Dabei überlagerten sich die der entsprechenden Protonen, so dass die Bestimmung von Kopplungskonstanten für $H-1''$ und $H-2''$ bzw. $H-1'''$ und $H-2'''$ nicht möglich war und die jeweiligen Integrale der Signale nun doppelt so groß waren wie z.B. bei FL2, was nur eine Seitenkette dieser Art enthielt. Die Klärung dieses Problems konnte durch ein HMBC-Spektrum (Abb. 60) erbracht werden. Bei dieser Aufnahmetechnik können Korrelationen zwischen Protonen und Kohlenstoffen über zwei oder über drei Bindungen beobachtet werden.



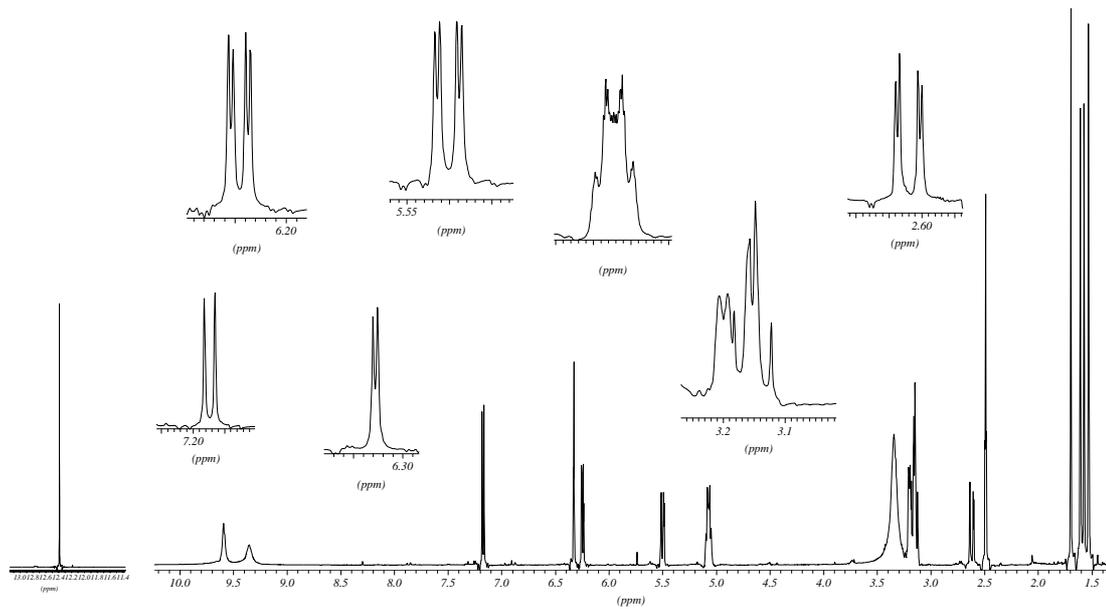


Abb. 59: ^1H -NMR-Spektrum von FL3 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Im vorliegenden Fall war eine Kopplung (Crosspeak) von C-2 und dem Proton, das lediglich eine Metakopplung zeigte, entscheidend. Damit musste eine 1',2',4'-Trisubstitution vorliegen. Auch die Stellungen der Prenylseitenketten ließen sich anhand des HMBC-Spektrums ausmachen. H-1'', H-1''', H-2'' und H-2''' korrelierten mit C-6 und C-8. In einigen Fällen, wie z.B. bei H-3' oder H-5' konnten sogar ^1J -Kopplungen im HMBC-Spektrum beobachtet werden, die eine direkte C-H-Korrelation bedeuteten und Zuordnungen des HMQC-Spektrums (Abb. 61) untermauerten.

Tab. 30: ^1H -NMR-Daten von FL3 (500 MHz, in DMSO bzw. Aceton- d_6) und Kushenol E (90 MHz, in Aceton- d_6) nach MIZUNO *et al.* (1990); δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H (DMSO)	^1H (Aceton- d_6)	^1H (Lit.)
2	5,50 dd (13,1; 3,1)	5,62 dd(12,9; 3,2)	5,65 dd (13,0; 3,0)

3ax	2,62 dd (17,0; 2,9)	2,72 dd (17,0; 3,2)	2,76 dd (14,0;3,0)
3eq	3,16 m	3,05 dd (17,0; 12,9)	3,05 dd (14,0; 13,0)
3'	6,66 d (2,2)	6,44 d (2,5)	6,49 d (2,0)
5'	6,25 (8,2; 2,2)	6,39 dd (8,2; 2,5)	6,42 dd (8,0; 2,0)
6'	7,17 d (8,2)	7,29 d (8,2)	7,31 d (8,0)
1''/1'''	3,16 m	3,27 d 3,29 d (6,9)	3,25 m
2''/2'''	5,08 m	5,15 m	5,18 m
4''/4'''	1,61 s 1,69 s	1,61 s 1,72 s	1,66 s 1,76 s
5''/5'''	1,53 s 1,57 s	1,58 s 1,57 s	1,64 s
5-OH	12,39 s	12,48 s	12,46 s
2x OH	9,59 s 9,35 s	-	-

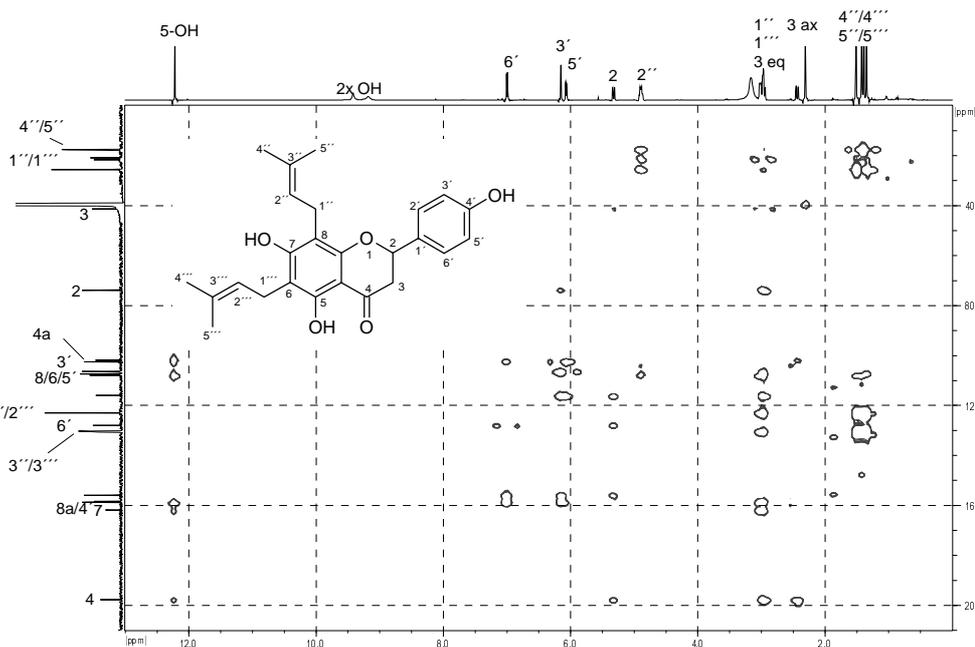
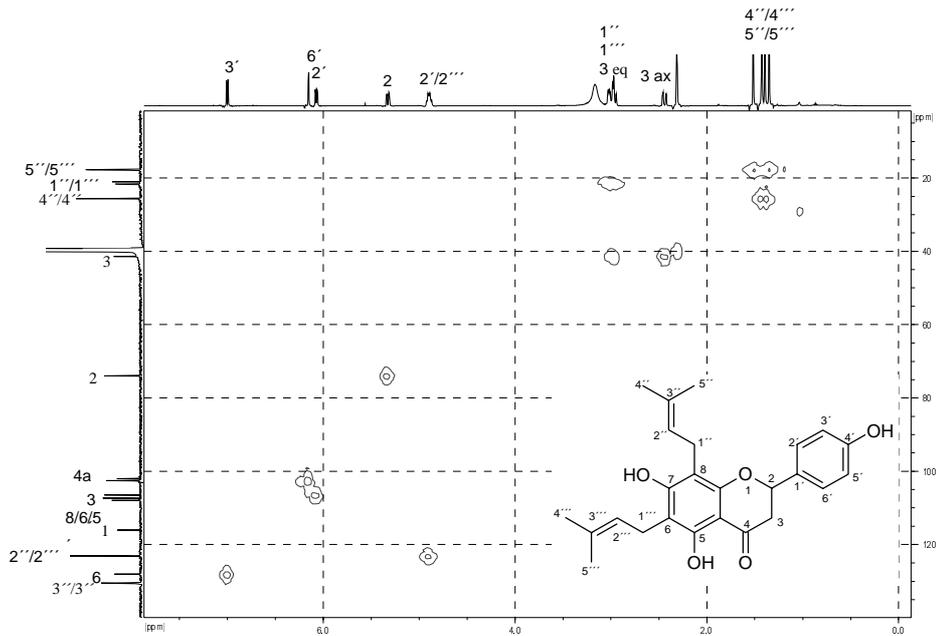


Abb. 60: HMBC-Spektrum vom FL3 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO- d_6)

Im ^{13}C -NMR-Spektrum erschien das C-4 der Ketongruppe bei 197,6 ppm im tiefsten Feld. Anhand des HMQC-Spektrums konnten die Methingruppen im ^{13}C -Spektrum eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund der chemischen Verschiebung mussten die zwei-Sauerstoff-tragenden aromatischen Kohlenstoffkerne im Bereich von 100-110 ppm erscheinen. Somit erschienen neben C-5' und C-3' die Kohlenstoffatome C-6, C-8 und C-4a. Die NMR-Daten von FL3 wurden außerdem mit Literaturdaten von Kushenol E verglichen (siehe Tab. 30 und Tab. 31).


 Abb. 61: HMBC-Spektrum von FL3 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆)

 Tab. 31: ¹³C-NMR-Daten von FL3 (jeweils 125 MHz) und von Kushenol E (22.5 MHz, in Aceton-d₆ nach WU *et al.*, 1985); δ in [ppm]

C-Atom	¹³ C (DMSO-d ₆)	¹³ C (Aceton-d ₆)	¹³ C (Lit.)
2	73,9	75,3	75,4
3	41,5	42,8	42,9
4	197,6	198,2	198,2
4a	102,0	103,1	103,3
5	158,7	159,4	159,3
6	107,9	108,6	108,6
7	161,8	162,6	162,4
8	107,3	108,0	108,0
8a	158,6	160,2	160,2
1'	116,0	117,8	117,9
2'	155,8	159,4	159,3
3'	102,6	103,4	103,7
4'	158,3	156,3	156,2
5'	106,5	107,7	107,9
6'	127,9	128,6	128,6
1''/1'''	21,8 21,1	21,8 22,5	21,8 22,5
2''/2'''	123,0	123,6 123,5	123,4 123,5
3''/3'''	130,5 130,3	131,9 131,8	132,0 132,2
4''/4'''	25,7	25,85 25,82	25,8
5''/5'''	17,8 17,9	17,9	17,9

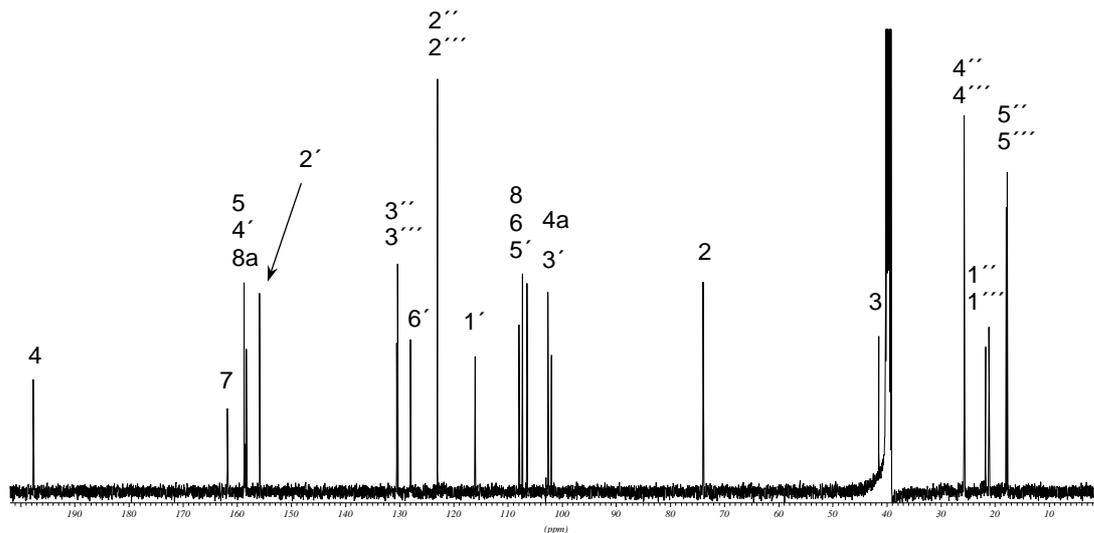
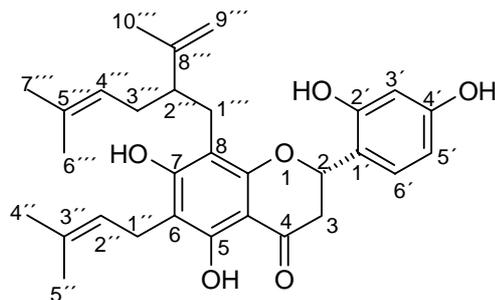


Abb. 62: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL3 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so konnte es sich bei FL3 nur um Kushenol E handeln. Dieser Naturstoff wurde von Wu *et al.* (1985) zum ersten Mal aus *Sophora flavescens* isoliert. Weiterhin wurde die Substanz von Mizuno *et al.* (1990) in *Euchresta horsfieldii* und von Chen *et al.* im Jahre 1990 in *Flemingia philippensis* (hier unter dem Synonym Flemiphilippin D) gefunden.

Identifizierung von FL4 (Kushenol B)

(2',4'-5,7-Tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)



Der Inhaltsstoff FL4 wurde aus der Unterfraktion IV mit einer Ausbeute von 18 mg als gelbes amorphes Pulver isoliert. Bei der Substanz handelte es sich erneut um ein Flavanonderivat (vgl. UV-Spektrum in Abb. 63), in diesem Fall mit höherer Lipophilie als die zuvor diskutierten Stoffe, denn FL4 wurde im HPLC erst bei 90 % Acetonitril/10 % Wasser eluiert. Die anderen Stoffe (FL1-FL3) eluierten bei der Anwendung der gleichen Methode bereits bei 40 % Acetonitril/60 % Wasser.

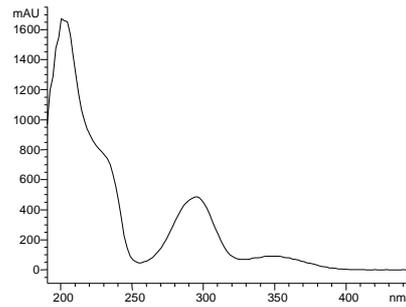


Abb. 63: UV-Spektrum vom FL4

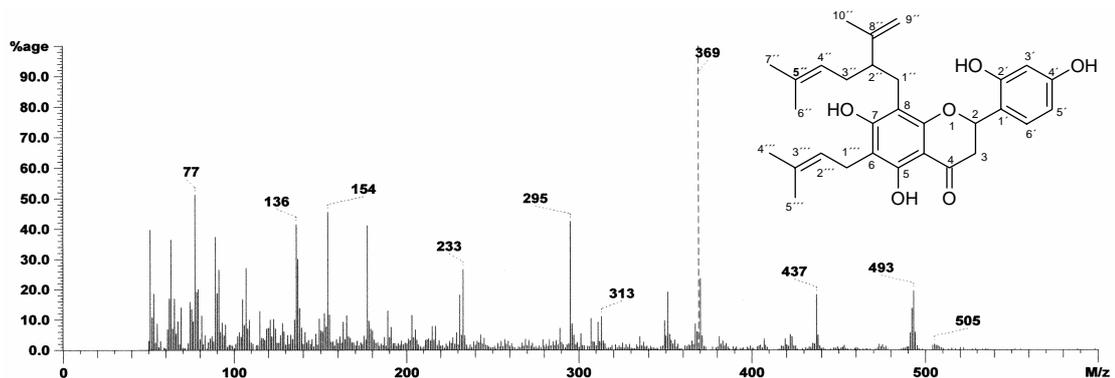


Abb. 64: FAB-Massenspektrum von FL4 (mit Nitrobenzylalkohol als Träger-substanz)

Um ein Massenspektrum von FL4 zu erhalten, wurde in diesem Fall ein FAB-Spektrum aufgenommen. Dafür musste getrocknete Substanz in Nitrobenzylalkohol gelöst werden, der als Trägermaterial diente. Im Spektrum (Abb. 64) zeigte sich ein Pseudomolekülpeak bei m/z 493 ($[M+1]^+$). Der Basispeak ($[M-123]^+$) entstand nach Abspaltung der Lavandulyl-Seitenkette in Benzylstellung vom Flavanongrundgerüst. Das Fragment bei m/z 437 ($[M-55]^+$) bedeutete die Eliminierung eines Isopropylrestes von der zusätzlich vorhandenen Isopentenyl-Seitenkette. Aber auch RDA-Fragmente konnten im Spektrum beobachtet werden. Hier waren Fragmente bei m/z 136 und 154 von Bedeutung.

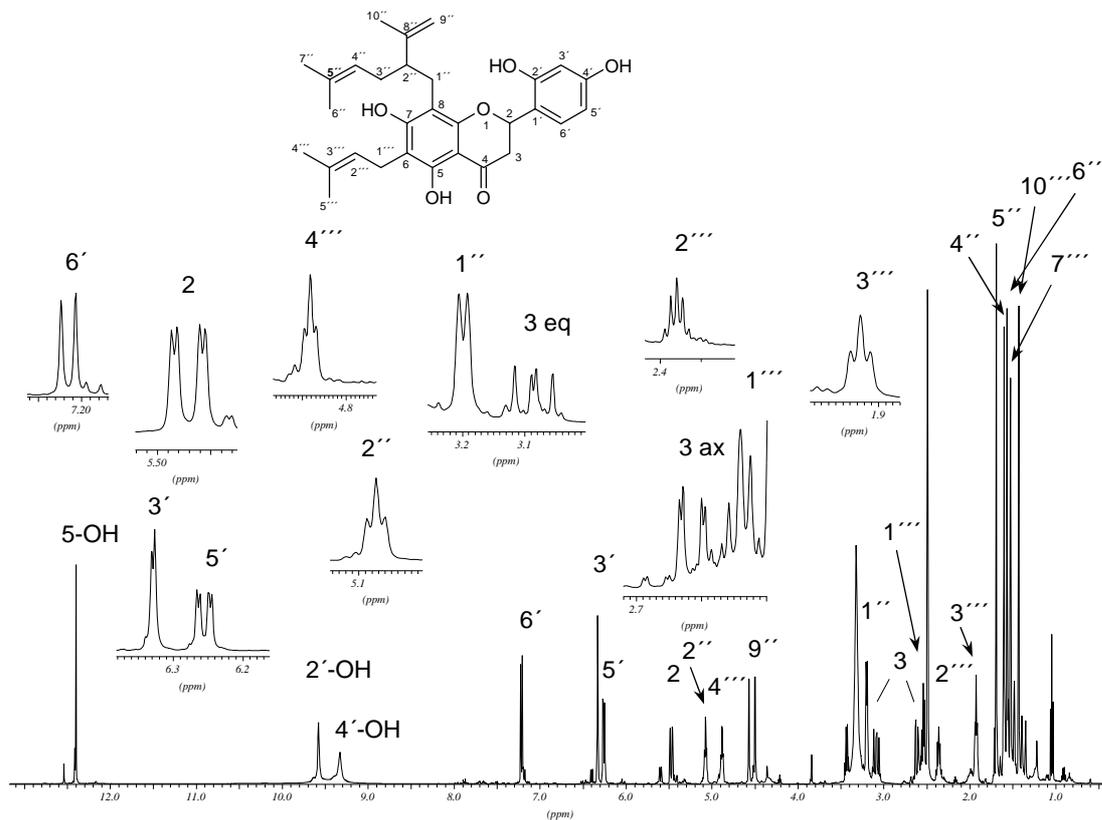


Abb. 65: ¹H-NMR-Spektrum von FL4 (500 MHz, in DMSO-d₆)

Im tiefsten Feld des ¹H-NMR-Spektrums (Abb. 65) erschien bei $\delta = 12,40$ ppm ein scharfes Singulett, das der OH-Gruppe an C-5 zuzuordnen war. Weitere Signale zweier Hydroxylgruppen (C-2'-OH und C-4'-OH) fanden sich bei 9,58 und 9,33 ppm. Ihre Zuordnung konnte anhand eines zusätzlich aufgenommenen HMBC-Spektrums (Abb. 66) getroffen werden. Die zum B-Ring gehörenden Protonen zeigten im Bereich von 6,24-7,21 ppm ein ABC-Spinsystem mit gleichem Aufspaltungsmuster wie es bereits bei FL3 diskutiert worden war (1',2',4'-trisubstituierter Aromat). Daneben erschienen erneut drei Signale der Protonen des C-Ringes und vier Signale der Isopentenyl-Seitenkette.

Im Vergleich zu bisher diskutierten Flavanonderivaten kamen im Hochfeld zusätzlich acht Signale für siebzehn aliphatische Protonen zur Resonanz. Davon zeigten sich drei Singulett im höchsten Feld bei $\delta = 1,43$, 1,53 und 1,57 ppm die nach Integration jeweils Methylgruppen (H-6''', H-7''' und H-10''') zugeordnet wurden. Im tieferen Feld ($\delta = 4,50$ und 4,57 ppm) kam eine Exomethylengruppe zur Resonanz, die sich in den Signalen zweier breiter

Singulets ausdrückte. Das bei $\delta = 2,54$ ppm zum Quintett sich aufspaltende Signal (H-2''') hatte Kopplungskonstanten von 7,4 und 7,0 Hz. Davon fand sich die erst genannte Kopplung bei H-1''' wieder. Die beiden sich zum Triplet aufspaltenden Protonen des H-3''' mit einer chemischen Verschiebung von 1,93 ppm zeigten ein Signal mit einer Kopplungskonstanten von 7,0 Hz. Die Multiplizität dieses Signals ließ auf zwei in Nachbarschaft befindliche Protonen schließen. Es zeigte sich ein weiteres Triplet bei 4,88 ppm neben H-2''' als Kopplungspartner. Die eindeutige Zuordnung beider Triplets ergab sich aus einer Korrelation des C-1''' zum H-3''' zugeordneten Triplet nicht aber zu dem des H-4''' im HMBC-Spektrum.

Tab. 32: ^1H -Daten von FL4 (500 MHz, in DMSO-d_6) und Kushenol B; Lit. 1 (300 MHz, in DMSO-d_6) von Ryu *et al.*, 1997; Lit. 2 (90 MHz, in Aceton-d_6) von Wu *et al.*, 1985; n.a.= nicht angegeben; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit. 1)	^1H (Lit. 2)
2	5,47 dd (13,3; 2,5)	5,52 dd (13,2; 2,5)	5,68 dd (12,0; 4,5)
3ax	2,61 dd (17,3; 2,6)	2,62 dd (17,2; 2,5)	2,52 m
3eq	3,09 dd (17,3; 13,3)	3,17 dd (17,2; 13,2)	3,10 m
3'	6,33 d (2,2)	6,36 d (2,2)	6,52 d (2,5)
5'	6,26 dd (8,4; 2,2)	6,25 dd (8,4; 2,2)	6,48 dd (9,0; 2,5)
6'	7,22 d (8,4)	7,25 d (8,4)	7,42 d (9,0)
1'''	2,54 q (7,4)	2,52 m	2,92 m
2'''	2,36 q (7,4; 7,0)	2,38 m	n.a.
3'''	1,93 br t (7,0)	1,92 m	n.a.
4'''	4,88 br t (6,5)	4,85 m	4,96 br t (7,0)
6'''	1,43 s	1,43 s	1,48 s
7'''	1,53 s	1,53 s	1,54 s
9'''	4,50 s 4,57 s	4,53 s	4,62 br s
10'''	1,57 s	1,59 s	1,64 s
1''	3,20 d (6,5)	3,21 m	3,38 br d (7,0)
2''	5,07 t (6,5)	5,07 m	5,15 t (7,0)
4''	1,60 s	1,60 s	1,64 s
5''	1,69 s	1,69 s	1,76 s
5-OH	12,40 s	12,42 s	12,47 s
2'-OH	9,58 s		9,62 s
4'-OH	9,33 s		9,45 s

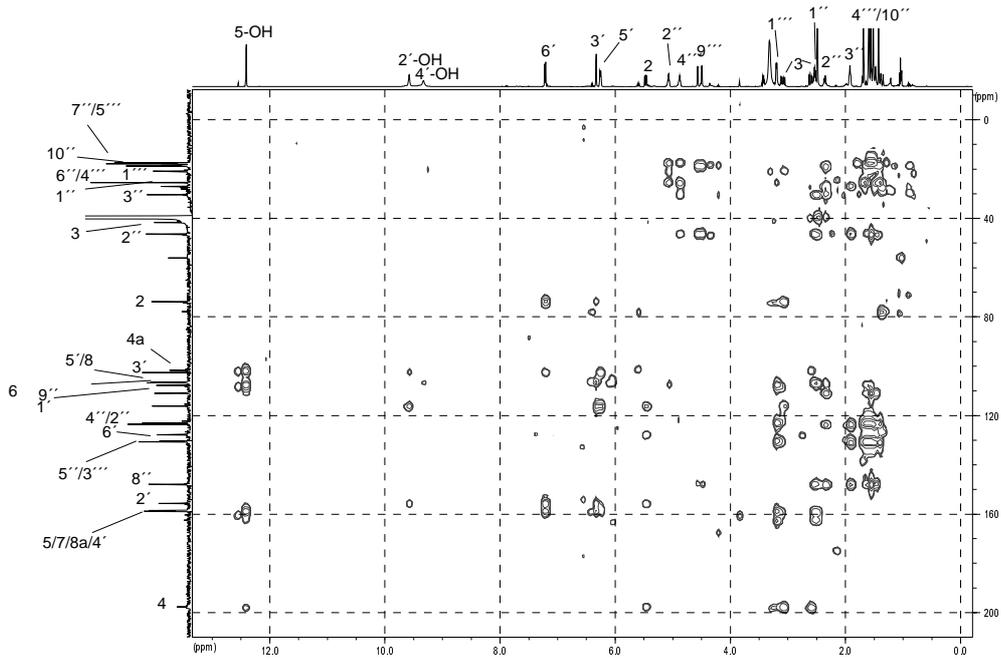


Abb. 66: HMBC-Spektrum von FL4 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆)

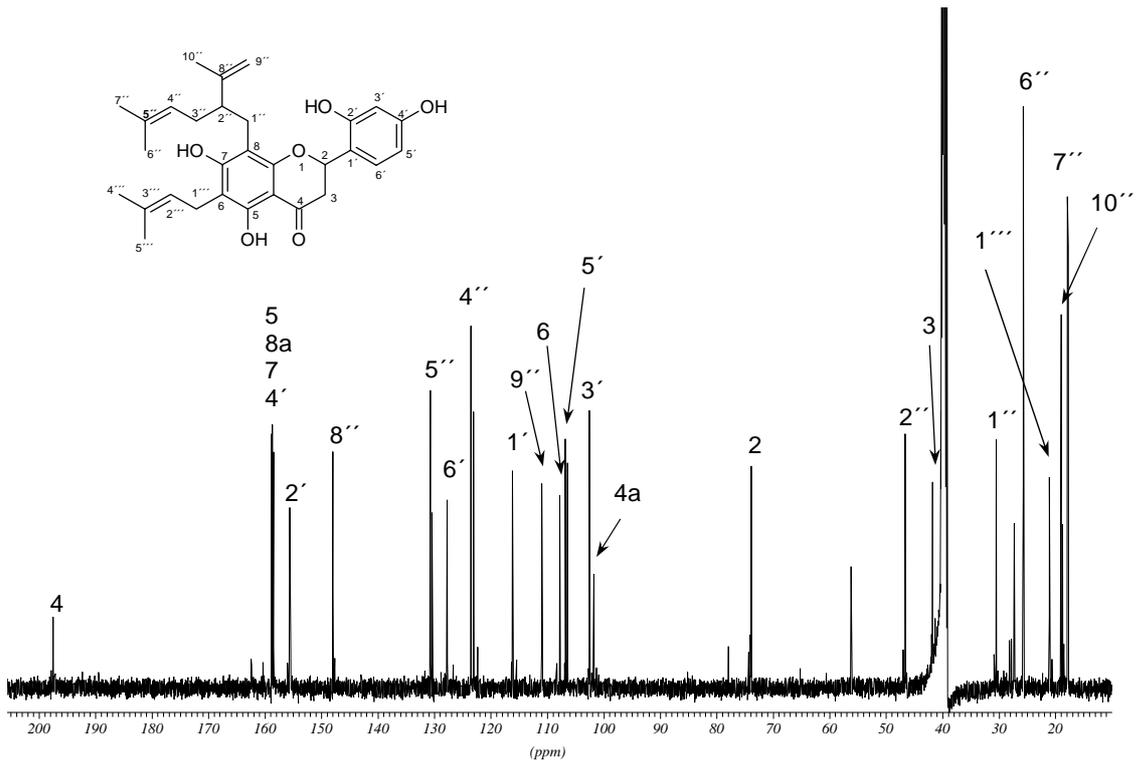


Abb. 67: ¹³C-NMR-Spektrum von FL4 (125 MHz, in DMSO-d₆)

Schließlich gab das HMBC-Spektrum auch Aufschluss bezüglich der Positionen der Methylgruppen der C₁₀H₁₇-Seitenkette. C-7''' und C-5''' korrelierten mit H-4''', C-10''' zeigte Kreuzsignale zu H-2''' und H-9'''. Es konnte somit gefolgert

werden, dass es sich bei dieser Seitenkette um eine Lavandulylgruppe handelte, welche sich aus zwei Isopreneinheiten zusammensetzt, welche miteinander in 3-4-Position verknüpft sind. Die Positionen, an denen die Isopentenyl- und Lavandulyl-Seitenketten im Molekül gebunden sind, wurden auch mit Hilfe des HMBC-Spektrums festgelegt. Die Protonen H-1''' und H-2''' korrelierten mit C-8, während H-1'' und H-2'' mit C-6 Crosspeaks zeigten.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte die Anwesenheit von vier hydroxylierten aromatischen Kohlenstoffatomen mit chemischen Verschiebungen von 155,6-158,9 ppm (C-5, C-7, C-2' und C-4'). Die im Spektrum zusätzlich auftretenden Signale bei 27,3 und 56,2 ppm entsprachen chemischen Verschiebungen von Ethanol als Lösungsmittelrückstand (HESSE, 1991). Eine Zusammenstellung der ^{13}C -Daten im Vergleich zu Literaturdaten von RUY *et al.* gibt Tab. 33.

Tab. 33: ^{13}C -NMR-Daten von FL4 (125 MHz, in DMSO-d_6) und von Kushenol B (75 MHz, in DMSO-d_6) nach RUY *et al.*, 1997; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
2	74,0	73,9	1'''	27,4	27,2
3	41,9	41,8	2'''	46,7	46,6
4	197,4	197,6	3'''	30,6	30,4
4a	101,9	101,8	4'''	123,7	123,5
5	158,6	158,4	5'''	130,8	130,7
6	107,8	107,7	6'''	25,7	25,6
7	162,6	162,1	7'''	17,8	17,6
8	106,9	106,5	8'''	148,1	147,9
8a	15,9	158,8	9'''	111,1	110,9
1'	116,3	116,1	10'''	19,1	18,9
2'	155,7	155,5	1''	21,2	21,0
3'	102,6	102,5	2''	123,2	123,0
4'	158,9	158,6	3''	130,5	130,4
5'	106,5	106,4	4''	25,8	25,5
6'	127,8	127,7	5''	18,0	17,8

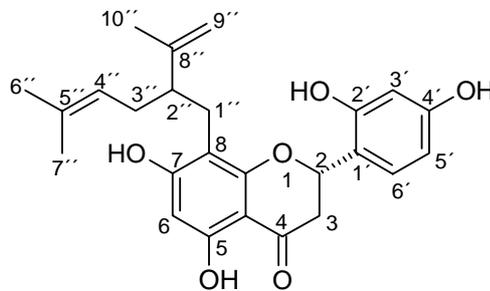
Bei der CD-Messung zeigten sich entsprechende Cotton-Effekte bei 263, 332 (positive Effekte) und bei 291 nm (negativer Effekt), die das Vorliegen eines Racemates ausschlossen und eine 2S-Konfiguration deutlich machten (GAFFIELD, 1970; MIYACHI *et al.*, 1987). Da die Konfiguration des chiral vorliegenden C-2'' Kohlenstoffatoms lediglich kristallographisch bestimmt werden kann, alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Substanzen aber nicht zu

kristallisieren waren, muss dieses Problem ungeklärt bleiben. Auch in der zur Verfügung stehenden Literatur konnten sich keinerlei Hinweise finden.

Aufgrund der diskutierten Spektren und deutlichen Übereinstimmungen mit gefundenen Literaturdaten handelte es sich bei FL4 zweifelsfrei um Kushenol B. Bei früheren Untersuchungen zur Flavonoidführung von *Sophora flavescens* war Kushenol B bereits von Wu *et al.* (1985) nachgewiesen worden. Im eingesetzten 5-LOX-Assay zeigte FL4 sehr gute Hemmeigenschaften.

Identifizierung von FL5 (Soporaflavanon G)

(2',4',5,7-Tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)



Mit 351 mg Ausbeute konnte FL5 als zweitgrößte Menge neben dem Hauptinhaltsstoff FL6 (Kurarinon) isoliert werden. Die Substanz war in den Grobfraktionen V und VI enthalten.

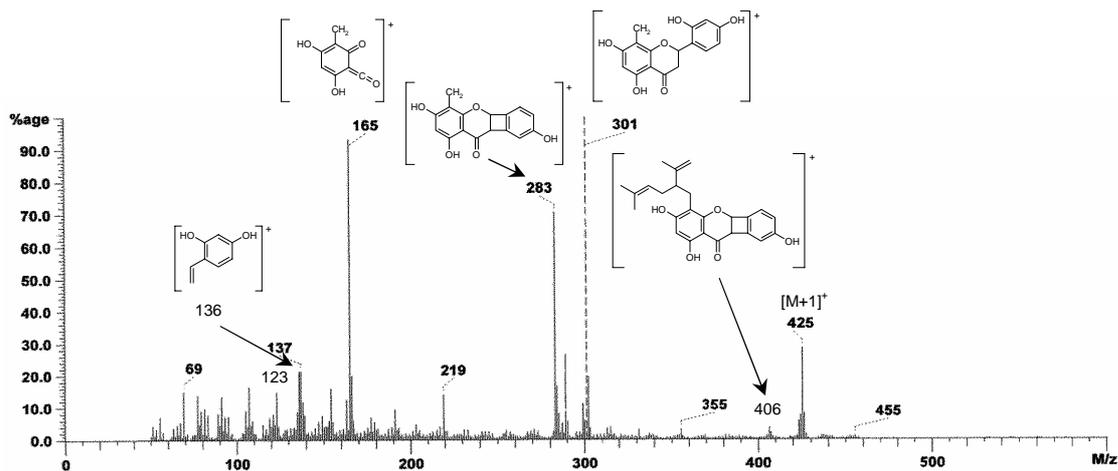


Abb. 68: FAB-Massen-Spektrum von FL5 mit NBA als Trägersubstanz

FL5 schlug sich nach der Isolierung und an der Glaswand als gelbe ölige Masse ab. Im FAB-Massenspektrum (Abb. 68) erschien neben dem Pseudomolekülpeak für das $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 425 unter anderem ein weiteres Fragment bei

m/z 301 als Basispeak, das für die Abspaltung einer vorhandenen Lavandulylgruppe ($[M-123]^+$) sprach. Dieses Fragment erfuhr eine Retro-Diels-Alder-Spaltung und brachte die Fragmente für den A-Ring (m/z 165) und den B-Ring (m/z 136) hervor. Dieses Fragmentierungsmuster (Abb. 68) fand sich auch in Publikationen von INUMA *et al.* (1990), sowie von BATIROV *et al.* (1985).

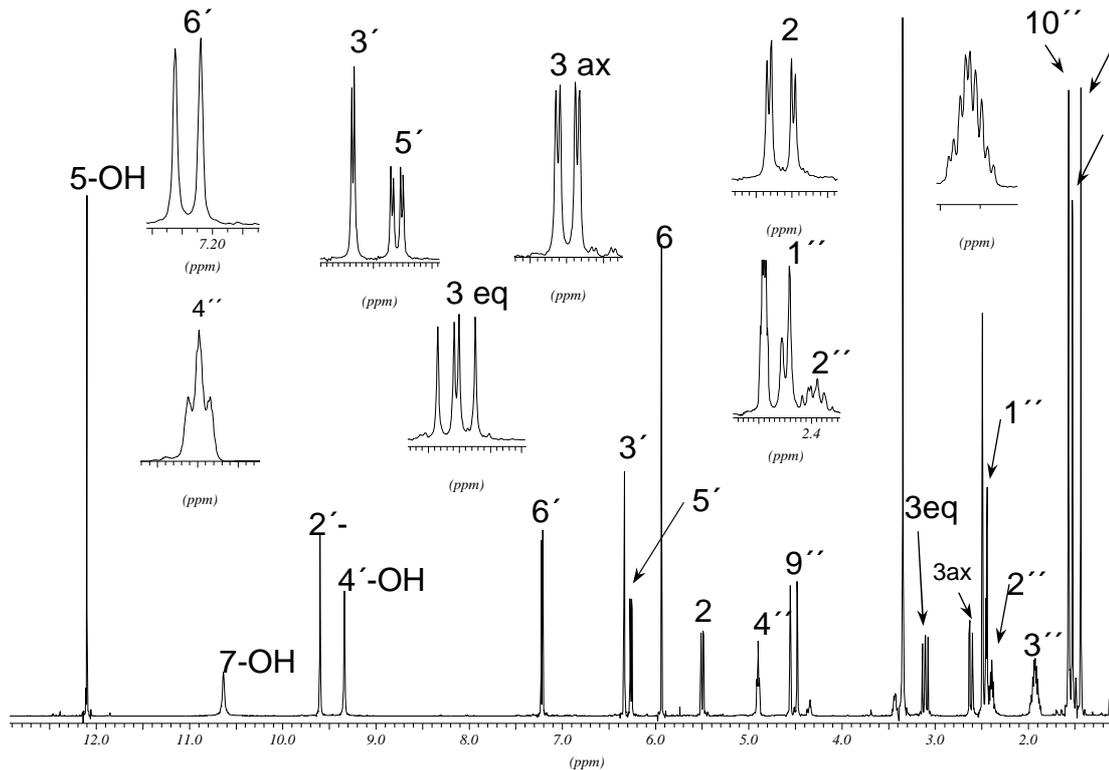


Abb. 69: ^1H -NMR-Spektrum von FL5 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Dass es sich bei FL5 wahrscheinlich erneut um ein Flavanonderivat handeln würde, wurde bereits durch das aufgenommene UV-Spektrum angedeutet (nicht abgebildet). Die endgültige Klärung sollte die NMR-Spektroskopie erbringen. Hier fanden sich wie auch schon bei den bereits diskutierten Flavanonen die charakteristischen Signale für H-2 und H-3.

Weitere im ^1H -Spektrum erschienenen Protonen zeigten unter anderem die Anwesenheit einer auch hier vorkommenden Lavandulyl-Seitenkette, die nach entsprechenden Korrelationen aus dem HMBC-Spektrum (Abb. 70) in 8-Position an den A-Ring gebunden sein musste.

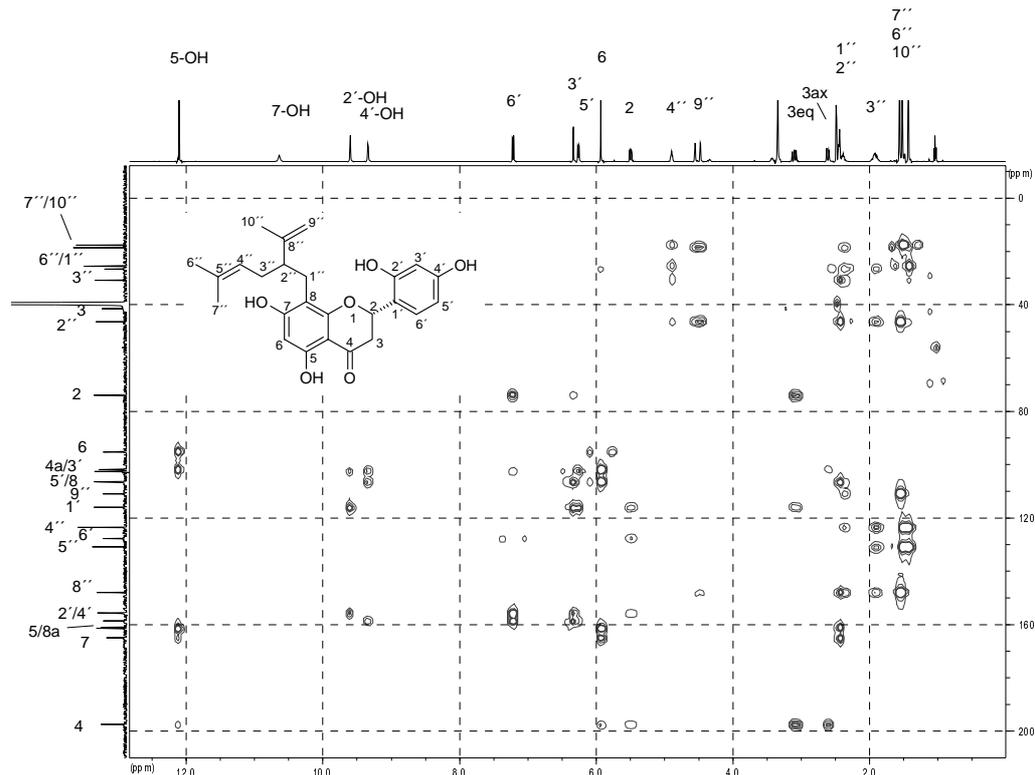


Abb. 70: HMBC-Spektrum von FL5 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆)

Die Protonen des B-Ringes von FL5 hatten zum einen die gleiche Signalaufspaltung wie bei Kushenol E (FL3), zum anderen ließen entsprechende Kreuzsignale des HMBC-Spektrums auf eine 1',2',4'-Trisubstitution des Aromaten schließen.

Anhand des HMBC-Spektrums (Abb. 70) konnten auch die Signale der 2',4'- und 7-Hydroxylgruppen eindeutig zugeordnet werden. Während das Signal der 2'-OH-Gruppe eine Korrelation zu C-1' zeigte, fehlte die Korrelation zur 4'-OH-Gruppe. Sie korrelierte mit C-5', im Gegensatz zu 2'-OH.

Tab. 34: ^1H -NMR-Daten von FL5 (500 MHz, in DMSO-d_6) und von Sophoraflavanon G (300 MHz, in DMSO-d_6) nach RUY *et al.*, 1997; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend; n.a.= nicht angegeben

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
2	5,5 dd (13,2; 2,5)	5,45 dd (13,2; 2,8)
3 ax	2,62 dd (17,0; 2,5)	2,61 dd(17,2; 2,8)
3 eq	3,10 dd (17,0; 13,2)	3,08 dd (17,2; 13,2)
6	5,93 s	5,92 s
3'	6,34 d (2,2)	6,33 d (2,2)
5'	6,26 dd (8,4; 2,2)	6,25 dd (8,4; 2,2)
6'	7,22 d (8,4)	7,20 d (8,4)
1''	2,44 d	2,42 m
2''	2,39 m	2,38 m
3''	1,93 m	1,90 m
4''	4,90 t (6,6)	4,85 m
6''	1,44 s	1,43 s
7''	1,53 s	1,53 s
9''	4,48 4,56 je s	4,46 4,53 je s
10''	1,57 s	1,57 s
5-OH	12,10 s	12,12 s
7-OH	10,63 s	n.a.
2'-OH	9,59 s	n.a.
4'-OH	9,33 s	n.a.

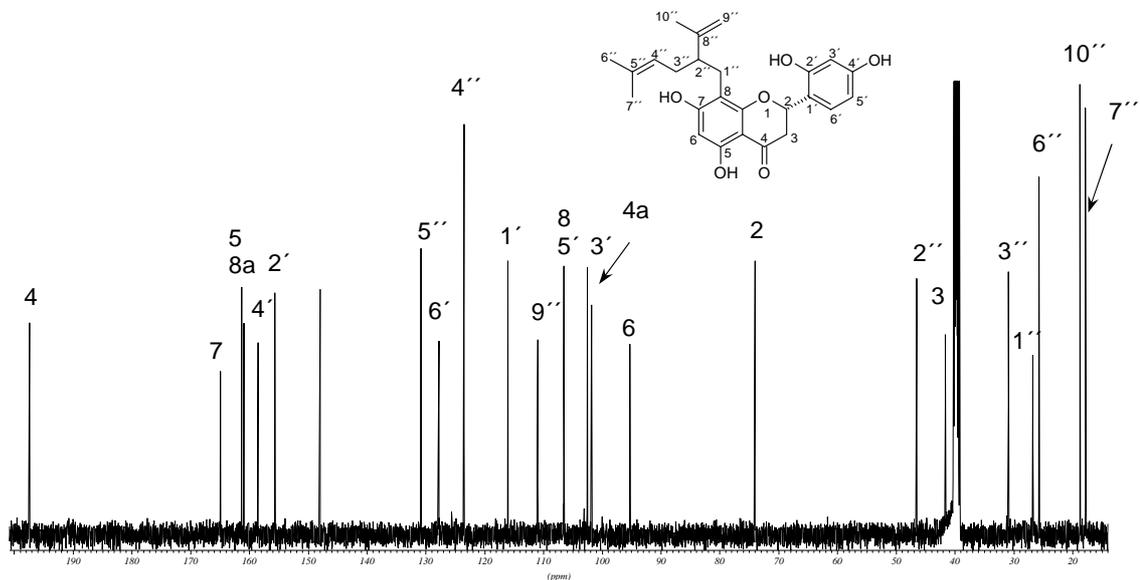


Abb. 71: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL5 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Die Zuordnung der protonen tragenden Kohlenstoffatome erfolgte anhand eines HMQC-Spektrums (Abb. 72). Die chemischen Verschiebungen quartärer C-

Atome wurden mittels Literaturvergleichen oder indirekt aus dem HMBC-Spektrum zugeordnet. Sämtliche ^{13}C -Daten von FL5 sind in Tab. 36 angegeben. Aufgrund der spektralen Daten von FL5 handelte es sich bei der vorliegenden Substanz eindeutig um Sophoraflavanon G.

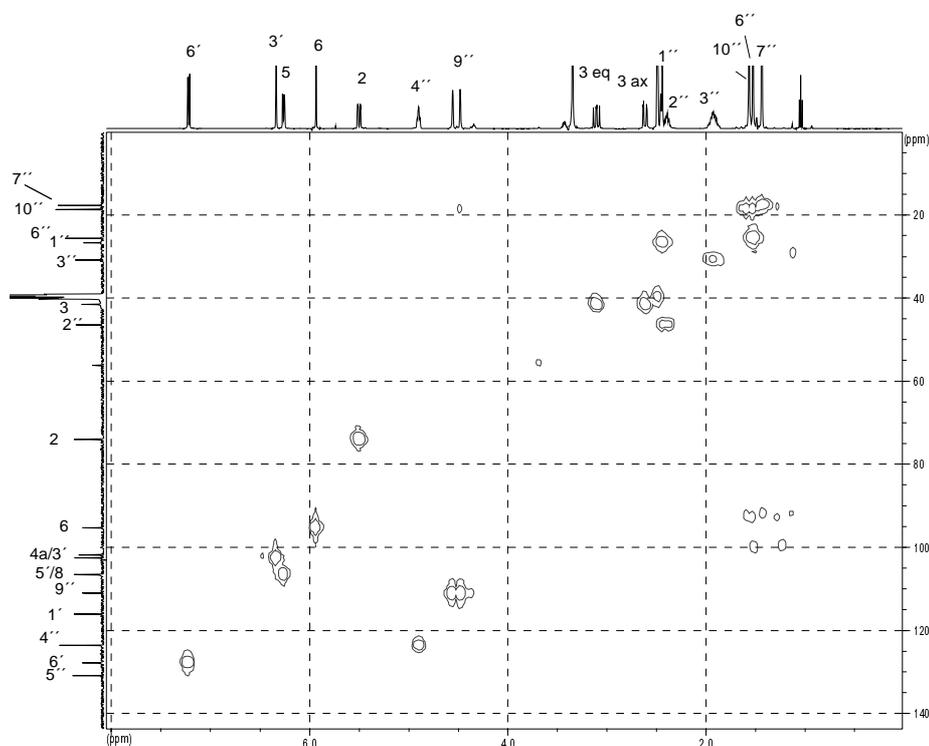
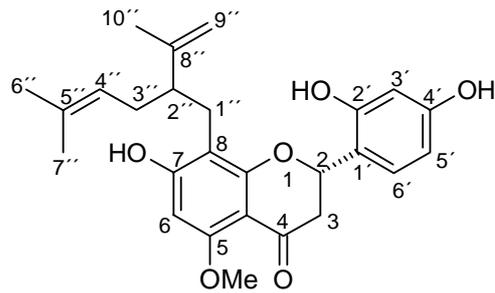


Abb. 72: HMBC-Spektrum von FL5 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO- d_6)

Sophoraflavanon G wurde erstmalig von HATAYAMA *et al.* (1971) aus *Sophora flavescens* mit der Bezeichnung Norkurarinon isoliert, allerdings wurde in der Publikation die absolute Konfiguration des C-2-Kohlenstoffes nicht bestimmt. SHIRATAKI *et al.* (1988) veröffentlichte die 2S-Form als Sophoraflavanon G ebenso wie auch WANG *et al.* (1997) aus der Droge. BATIROV *et al.* (1985) isolierte die Verbindung aus *Vexibia alopecuroides* und bezeichnete sie als Vexibinol. IINUMA *et al.* (1990) wies Sophoraflavanon G in *Sophora leachiano* nach, 1991 wurde die Substanz von RUANGRUNGSI *et al.* in *Sophora exigua* gefunden.

Identifizierung von FL6 (Kurarinon)

Die Substanz stellte den Hauptpeak im HPLC- und eine der intensivsten Banden im DC-Chromatogramm des Dichlormethanextraktes von *Sophora flavescens* dar. Sie wurde aus den Grobfractionen VII und VIII nach MPLC-Trennung jeweils rein erhalten und fiel als amorpher Niederschlag aus dem bei der Isolierung verwendeten Eluentengemisch Acetonitril/Wasser im Verlauf der Eliminierung des Lösungsmittels als amorpher Niederschlag aus. Nach anschließender Lyophilisation konnte ein gelbes amorphes Pulver gewonnen werden. Insgesamt wurden 532 mg der Verbindung isoliert.

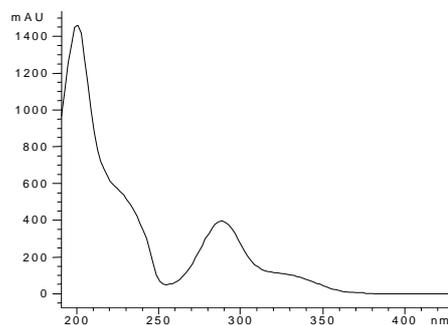


Abb. 73: UV-Spektrum von FL6

Im IR-Spektrum (Abb. 74) fand sich im Bereich zwischen 3700 und 2500 cm^{-1} deutlich eine sehr breite Bande der OH-Valenzschwingungen bedingt durch Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe der C=O Valenzschwingungen. Zudem ließ sich eine Doppelbande, die auf eine Carbonylgruppe hindeutete (1772 cm^{-1}), erkennen. Der Fingerprint des Spektrums wies zwischen 1400 und 1200 cm^{-1} Banden für OH-Deformationsschwingungen und zwischen 1200 und 100 cm^{-1} CO-Valenzschwingungen auf (RÜCKER *et al.*, 1992).

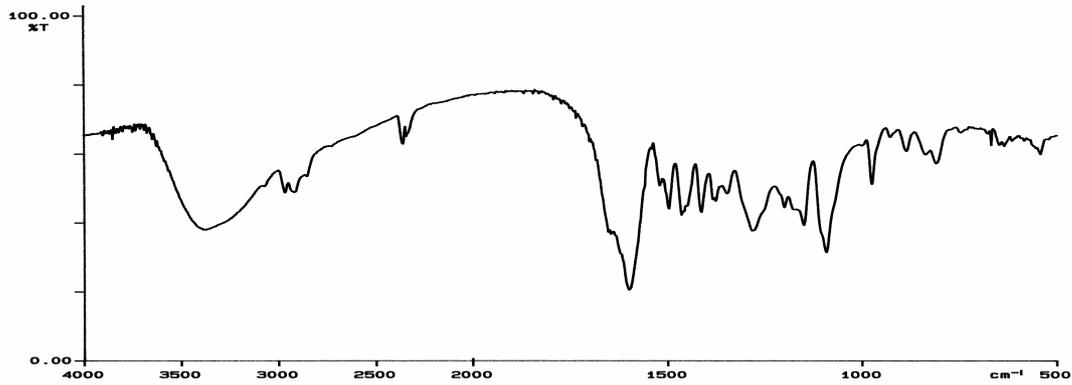


Abb. 74: FT-IR-Spektrum von FL6 in KBr

Im EI-MS-Spektrum (Abb. 75) zeigte sich bei m/z 438 der Molpeak mit relativ geringer Intensität. In einer Literaturquelle von RYU *et al.* (1997) wird dieser als fehlend beschrieben. Die Abspaltung einer Lavandulyl-Seitenkette wird durch m/z 315 ($[M-123]^+$) ausgedrückt. Das Fragment m/z 299 resultierte ebenfalls durch die Abspaltung der Seitenkette, allerdings vom Fragment mit 422 amu ($[M-16]^+$). Das bei m/z 179 in Erscheinung tretende Fragment des A-Ringes resultierte aus einer RDA-Spaltung und deutete eine an den Aromaten gebundene Methoxygruppe an. Ein B-Ring-Fragment wurde bei m/z 134 hervorgebracht.

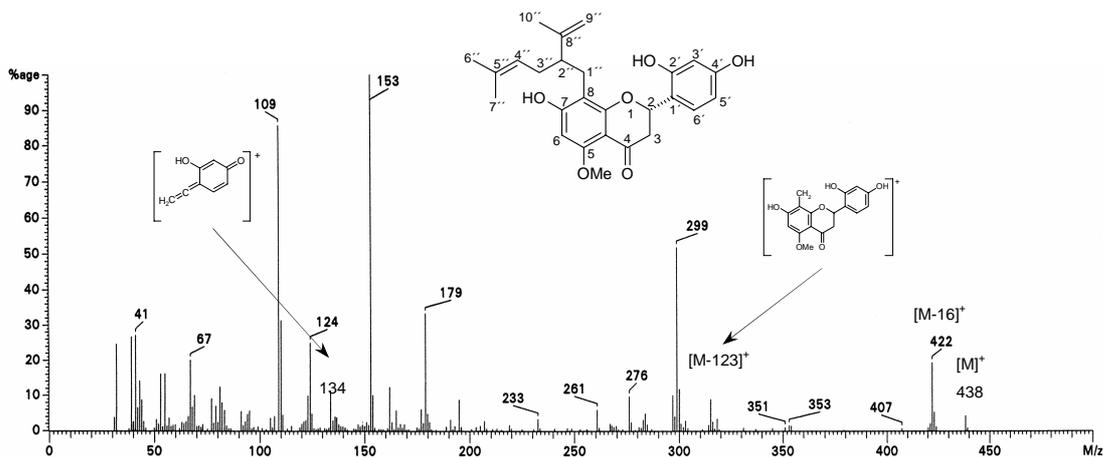


Abb. 75: EI-MS-Spektrum von FL6

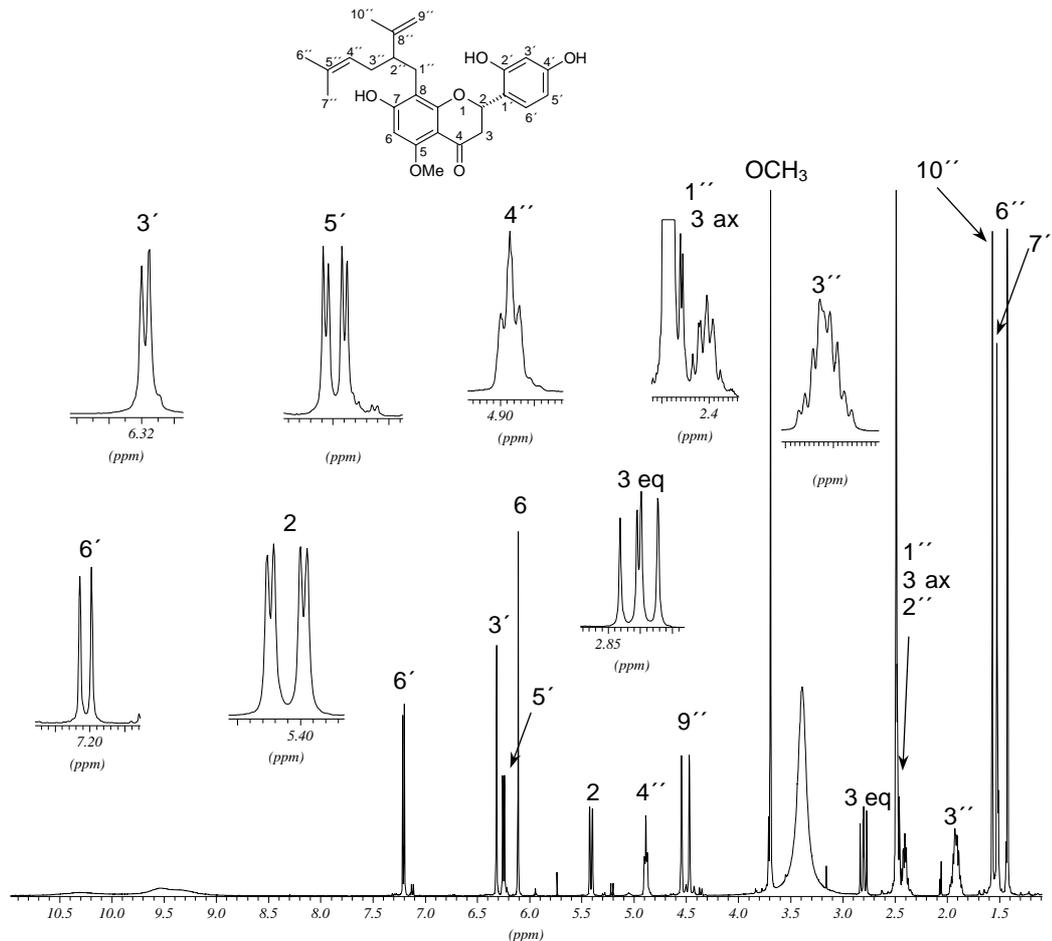


Abb. 76: ¹H-NMR-Spektrum von FL6 (500 MHz, in DMSO-d₆)

Im Protonenspektrum fehlte das Singulett im Tieffeld für eine chelatisierte OH-Gruppe des C-5 zur Carbonylgruppe an C-4. In diesem Fall lag stattdessen eine Methoxygruppe vor und zeigte sich im Spektrum bei 3,69 ppm als dominantes Singulett. Die Protonen H-1'' und H-3ax verbargen sich teilweise unter dem Lösungsmittelsignal. Ihre chemischen Verschiebungen konnten aber mit Hilfe des HMQC-Spektrums eindeutig zugeordnet werden. Die weiteren Protonensignale im Spektrum zeigten nahezu gleiche chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster wie die von FL5. Die Singulett der C-7-, C-2'- und C-4'-Hydroxylgruppen von FL6 kamen im Gegensatz zu FL5 im Spektrum nicht deutlich zur Resonanz, weil deren Protonen durch H-Atome einer geringen Menge Wasser im verwendeten Lösungsmittel ausgetauscht worden waren.

Tab. 35: ^1H -NMR-Daten von FL6 (500 MHz, in DMSO-d_6) im Vergleich zu Kurarinon (400 MHz, in DMSO-d_6) nach RYU *et al.*, 1997; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
2	5,41 dd (13,2; 2,5)	5,42 dd (13,2; 2,5)
3ax	2,47 dd (16,1; 2,5)	2,45 dd (16,0; 2,5)
3eq	2,80 dd (16,1; 13,2)	2,82 dd (16,0; 13,2)
6	6,11 s	6,10 s
3'	6,32 d (2,5)	6,31 d (2,2)
5'	6,25 dd (8,4; 2,5)	6,23 dd (8,4; 2,2)
6'	7,21 d (8,5)	7,20 d (8,4)
1''	2,48 d (2,8)	2,50 m
2''	2,42 m	2,48 m
3''	1,95 m	1,95 m
4''	4,88 t	4,85 m
6''	1,42 s	1,41 s
7''	1,52 s	1,51 s
9''	4,47 s 4,55 s	4,46 s 4,53 s
10''	1,57 s	1,62 s
OCH_3	3,69 s	3,68 s

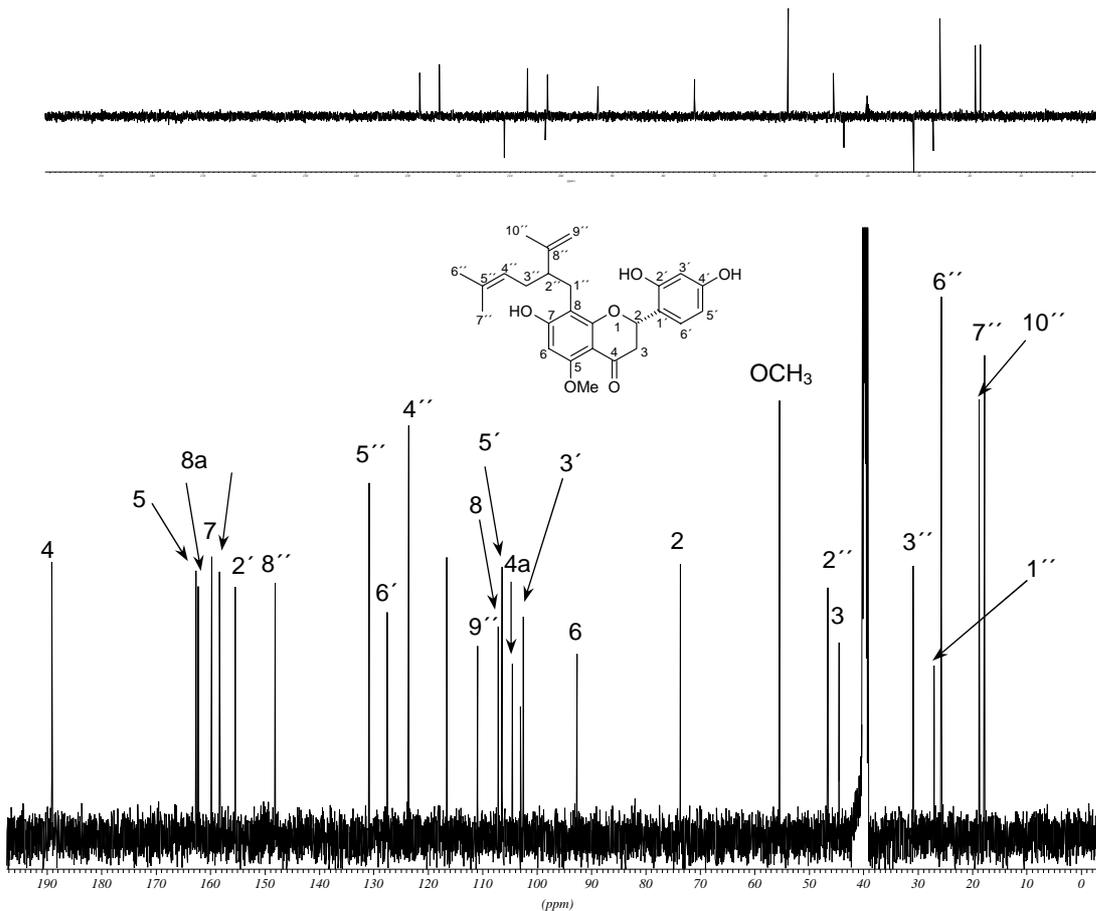


Abb. 77: ^{13}C -NMR und DEPT-Spektrum von FL6 (125 MHz, in DMSO-d_6)

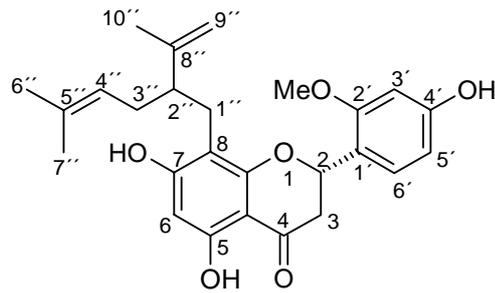
Das ^{13}C -Spektrum (Abb. 77) von FL6 wies kaum Unterschiede zu dem von FL5 auf (Abb. 71). Lediglich im Einflussbereich der Methoxygruppe respektive der 5-Hydroxylgruppe kam es bedingt durch die unterschiedlichen Substituenteneinflüsse zu Änderungen der chemischen Verschiebungen, was die Aufklärung der Struktur von FL6 als Kurarinon untermauerte (Tab. 36). Die Zuordnungen der ^{13}C -NMR-Werte für nicht quartäre Kohlenstoffatome wurden mittels eines HMQC-Spektrums abgesichert.

Tab. 36: ^{13}C -NMR-Daten von FL5 und FL6 (beide 125 MHz, in DMSO- d_6) und von Sophoraflavanon G (a) bzw. Kurarinon (b) zum Vergleich (beide 125 MHz, in DMSO- d_6) nach RUY *et al.*, 1997; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C (FL5)	^{13}C (a) (Lit.)	^{13}C (FL6)	^{13}C (b) (Lit.)
2	74,0	73,9	73,7	73,6
3	41,6	41,5	44,5	44,4
4	197,4	197,2	189,1	189,1
4a	101,8	101,6	104,5	104,4
5	164,9	164,8	162,7	162,5
6	95,3	95,2	92,6	92,5
7	161,3	161,2	159,8	159,6
8	106,6	106,5	107,1	107,0
8a	160,9	160,8	162,5	159,6
1'	116,0	115,9	116,5	116,4
2'	155,6	155,5	155,4	155,3
3'	102,5	102,4	102,5	102,4
4'	158,5	158,4	158,3	158,2
5'	106,5	106,3	106,4	106,3
6'	127,8	127,6	127,5	127,3
1''	26,7	26,1	27,1	26,9
2''	46,5	46,4	46,5	46,4
3''	30,9	30,8	30,9	30,8
4''	123,5	123,4	123,6	123,5
5''	130,8	130,7	130,8	130,7
6''	25,7	25,5	25,7	25,5
7''	17,8	17,6	17,8	17,6
8''	148,0	147,8	148,1	148,0
9''	111,0	110,8	110,9	110,8
10''	18,7	18,6	18,8	18,6
OCH₃			55,4	55,3

Kurarinon wurde bereits 1971 von HATAYAMA *et al.* und 1999 von KANG *et al.* aus *Sophora flavescens* isoliert und beschrieben.

Identifizierung von FL7 (Isokurarinon)



FL7 wurde mit einer Ausbeute von 98 mg aus der Grobfraction III rein gewonnen.

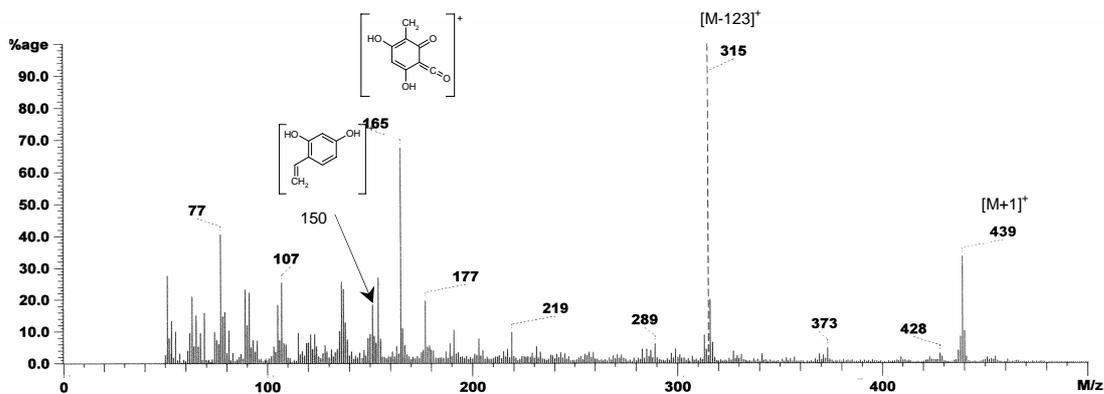


Abb. 78: FAB-Spektrum von FL7 (mit NBA als Trägermaterial)

Neben dem Pseudomolekülion bei m/z 439 ($[M+1]^+$) trat vor allem ein Fragment bei m/z 315 als Basispeak ($[M-123]^+$) im FAB-Spektrum (Abb. 78) hervor. Das Bruchstück entstand durch die Abspaltung einer Lavandulyl-Seitenkette in Benzylstellung vom Flavanongrundgerüst. Dass es sich bei FL7 erneut um ein Flavanonderivat handeln würde, wurde durch ebenfalls im Spektrum erscheinende RDA-Fragmente bei m/z 165 und m/z 150 (A- bzw. B-Ring-Fragment) ausgedrückt.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 79) zeigte sich bei 12,08 ppm ein scharfes Singulett für eine chelatisierte Hydroxylgruppe an C-5. Die Methoxygruppe bei 3,75 ppm war an den B-Ring gebunden, was bereits aus den oben beschriebenen MS-Untersuchungen hervorgegangen war. Durch ein zusätzlich aufgenommenes HMBC-Spektrum konnte gezeigt werden, dass eine Methoxygruppe an C-2' gebunden ist. Alle anderen Signale im Spektrum

entsprechen denen von FL6. FL7 unterschied sich von FL6 somit lediglich durch die Stellung der Methoxygruppe.

Die beiden Doppeldubletts für H-3ax und H-3eq mit chemischen Verschiebungen von 3,80 und 3,86 ppm waren nicht gänzlich voneinander getrennt. Dies wurde durch Lösungsmiteleinflüsse des CDCl_3 hervorgerufen.

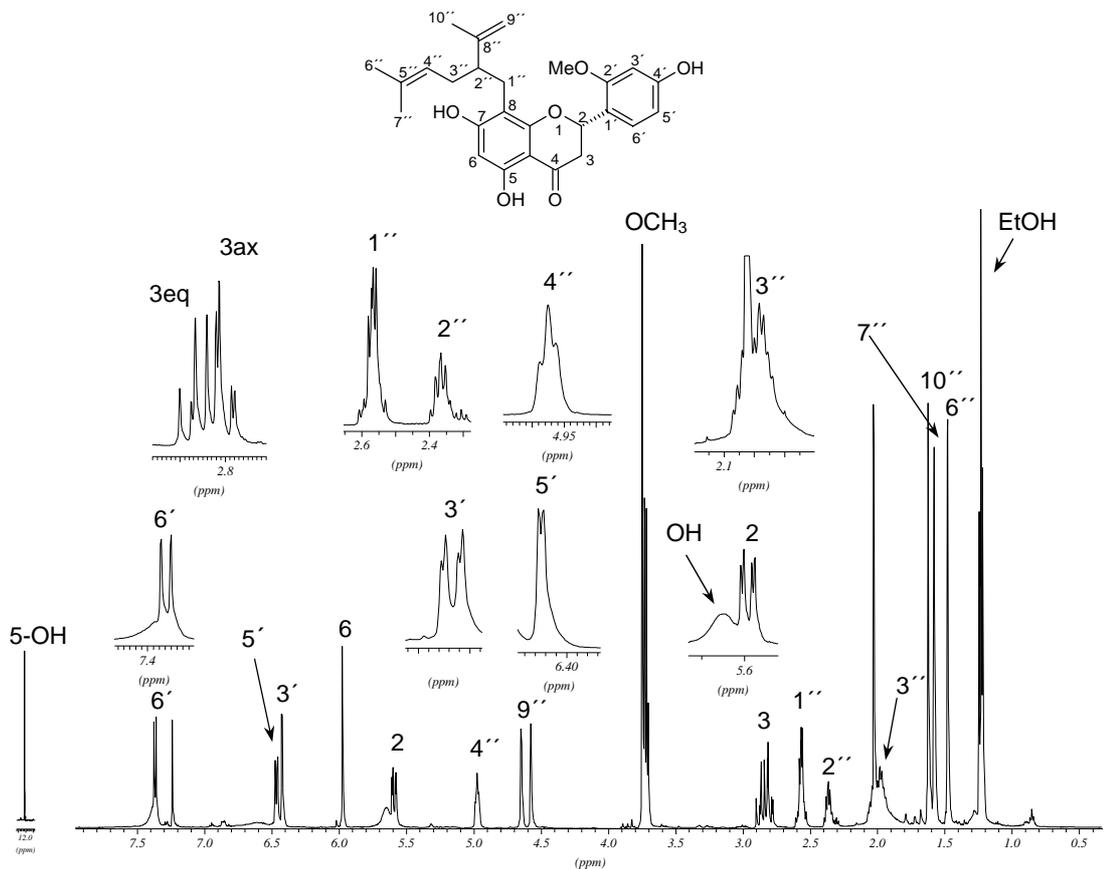


Abb. 79: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL7 (500 MHz, in CDCl_3)

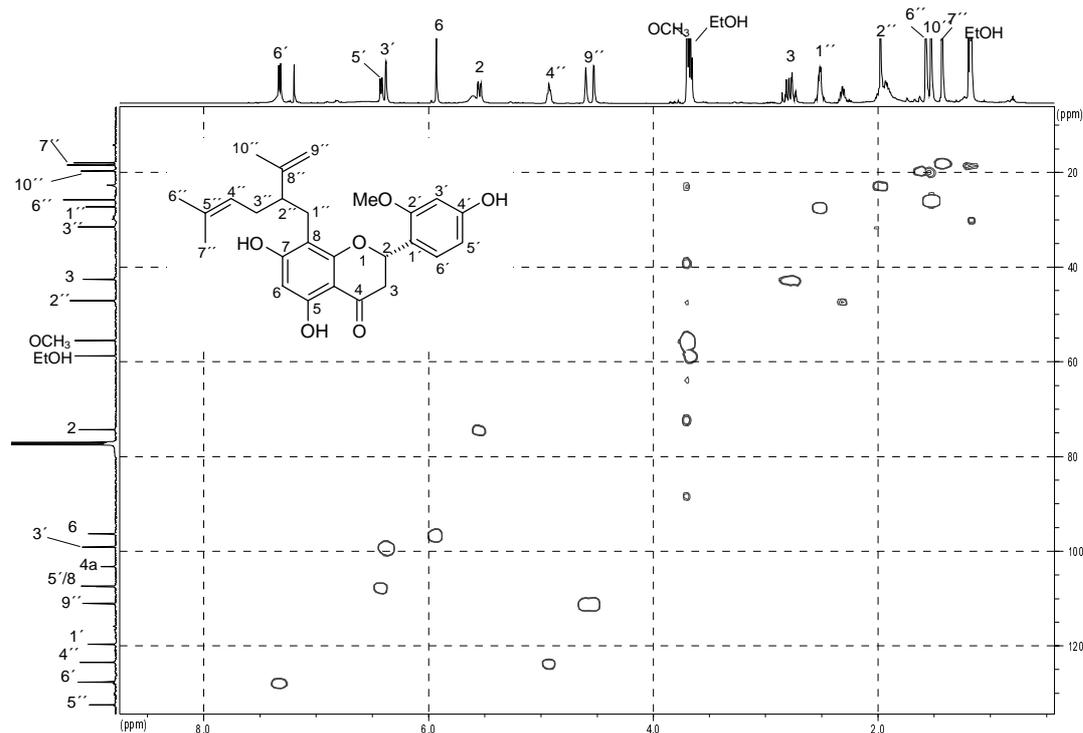


Abb. 80: HMQC-Spektrum von FL7 (500 bzw. 125 MHz, in CDCl_3)

Tab. 37: ^1H -Daten von FL7 (500 MHz, in CDCl_3 bzw. Aceton- d_6) im Vergleich zu Isokurarinon (Lit.) (60 MHz, in Aceton- d_6) von KYOGOKU *et al.*, 1973; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H (CDCl_3)	^1H (Aceton- d_6)	^1H (Lit.)
2	5,59 dd (12,9; 3,8)	5,63 dd (13,3; 2,8)	5,65 q (12,0; 4,5)
3ax	2,80 dd (17,5; 3,8)	2,70 dd (17,0; 2,8)	2,80-3,20 m
3eq	2,86 dd (17,5; 12,9)	3,04 dd (17,0; 13,3)	2,80-3,20 m
6	5,98 s	6,00 s	6,02 s
3'	6,42 d (2,2)	6,54 d (2,3)	6,55 d (2,2)
5'	6,47 dd (8,5; 2,2)	6,52 dd (8,2; 2,3)	6,50 q (9,0; 2,2)
6'	7,37 d (8,5)	7,43 d (8,2)	7,34 d (9,0)
1''	2,57 m	2,68 d (7,7)	2,62-2,70 br s
2''	2,37 m	2,51 m	1,29-1,80 m
3''	2,00 m	2,00 m	1,29-1,80 m
4''	4,97 t	4,98 m	5,07 m
6''	1,48 s	1,48 s	1,59 s
7''	1,57 s	1,55 s	1,63 s
9''	4,58s 4,65 s	4,53 s 4,58 s	4,60 s
10''	1,62 s	1,63 s	1,72 s
OCH₃	3,75 s	3,82 s	3,81 s
5-OH	12,08 s	12,15 s	
OH		9,51 s	
OH		8,51 s	

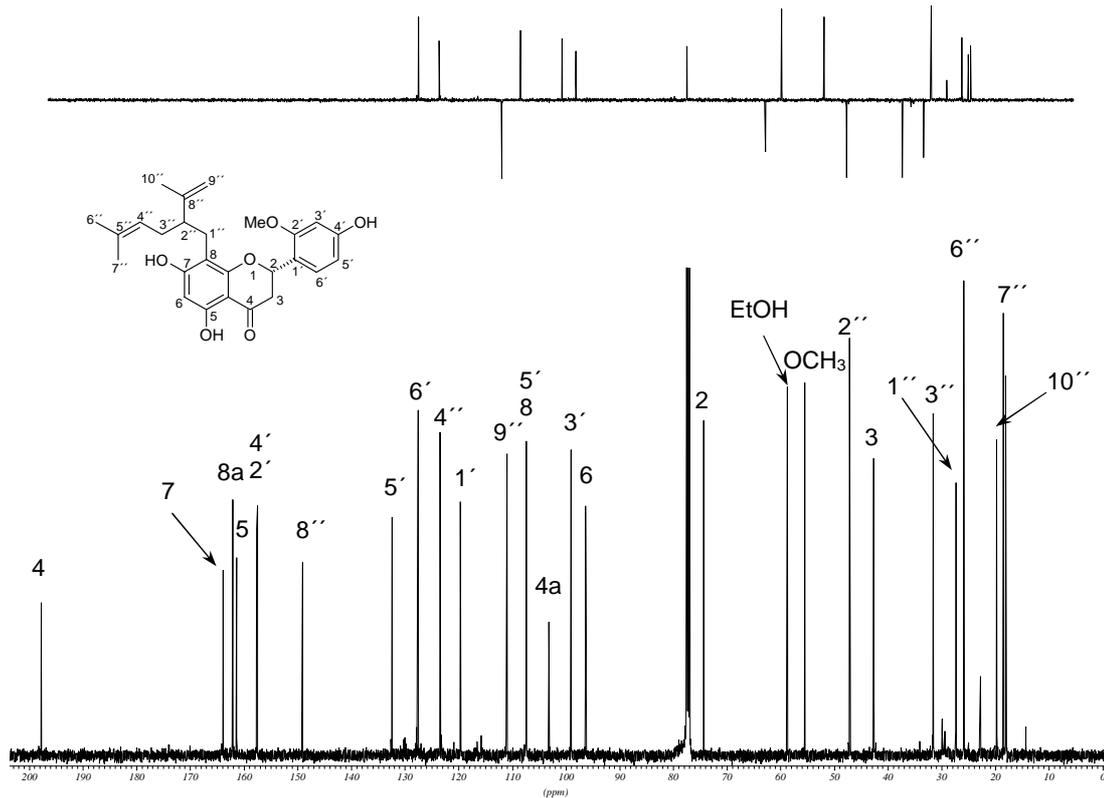


Abb. 81: ^{13}C -NMR- und zugehöriges DEPT-Spektrum von FL7 (125 MHz, in CDCl_3)

Die Zuordnung der Kohlenstoffatome erfolgte sowohl anhand von HMQC- und DEPT-Spektren (Abb. 80 und Abb. 81) als auch durch Vergleich mit Literaturdaten von Kurarinon (Tab. 38).

Tab. 38: ^{13}C -NMR-Daten von FL7 (125 MHz, in CDCl_3 bzw. Aceton- d_6) im Vergleich zu Isokurarinon (ohne Angabe der Messfrequenz, in Aceton- d_6) nach IINUMA *et al.*, 1990

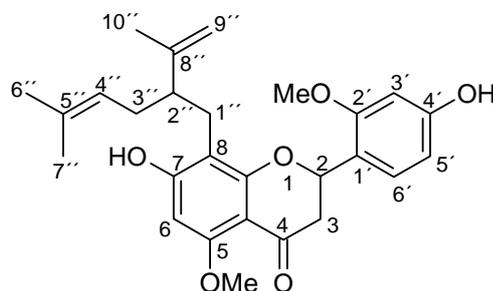
C-Atom	$^{13}\text{C}_{(\text{CDCl}_3)}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Aceton})}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Lit.})}$	C-Atom	$^{13}\text{C}_{(\text{CDCl}_3)}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Aceton})}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Lit.})}$
2	74,5	75,0	75,4	5'	107,5	107,8	108,4
3	42,8	42,8	43,2	6'	127,8	128,4	128,9
4	197,9	198,1	198,5	1''	27,5	27,7	28,2
4a	103,4	103,2	103,7	2''	47,3	47,7	48,2
5	161,5	162,0	162,5	3''	31,7	31,9	32,4
6	96,5	96,2	96,7	4''	123,6	124,4	124,9
7	164,1	165,3	165,7	5''	132,5	131,6	132,1
8	107,6	107,9	108,3	6''	26,0	25,8	26,3
8a	162,3	163,0	162,3	7''	18,2	17,8	18,3
1'	119,8	119,2	119,7	8''	149,3	149,1	149,6
2'	157,7	159,8	159,1	9''	111,2	111,2	111,7
3'	99,2	99,8	100,3	10''	19,9	19,1	19,6
4'	157,7	158,9	160,3	OCH₃	55,7	55,8	56,3

Zur Ermittlung der absoluten Konfiguration des C-2 wurden CD-Messungen durchgeführt. Hier zeigten sich ein positiver Cotton-Effekt bei 312 nm und ein negativer Cotton-Effekt bei 292 nm, was eine 2S-Konfiguration bedeutete.

Die Messung der optischen Drehung von FL7 ergab einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = -61,4^\circ$ ($c = 0,1$; in EtOH).

Nach der Auswertung aller spektralen Daten konnte FL7 damit als Isokurarinon identifiziert werden. Der Inhaltsstoff wurde erstmalig 1973 von KYOGOKU *et al.* aus *Sophora flavescens* isoliert. Allerdings wurde die Lavandulyl-Seitenkette in der Publikation an C-6 statt an C-8 beschrieben. Nach Entwicklung neuerer NMR-Aufnahmetechniken, wie zum Beispiel COSY, NOESY oder HMBC konnten FUKAI *et al.* (1990) und IINUMA *et al.* (1990) die bis dahin vorgeschlagene Struktur revidieren und beweisen, dass die Seitenkette in 8-Position vorlag.

Identifizierung von FL8 (2'-Methoxykurarinon)



FL8 wurde aus den Fraktionen VII und VIII mit einer Ausbeute von insgesamt 29 mg isoliert. Der Inhaltsstoff zeichnete sich im eingesetzten Testsystem zur 5-LOX-Inhibition als stärkster Hemmstoff, der aus *Sophora flavescens* isoliert wurde, aus.

FL8 war optisch aktiv. In Ethanol p.a. wurde eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -45,1^\circ$ ($c = 0,1$; in EtOH) bestimmt

Im EI-Massenspektrum (Abb. 82) zeigte sich die Abspaltung einer Methoxygruppe durch das Fragment m/z 422 und ein Molpeak bei m/z 452. Da diese beiden Fragmente mit sehr geringer Intensität im Spektrum erschienen, wurde der Spektrenbereich ab 400 amu zweifach vergrößert. Das Fragment bei m/z

329 drückt die Abspaltung einer Lavandulylgruppe vom Molekölion ($[M-123]^+$) aus.

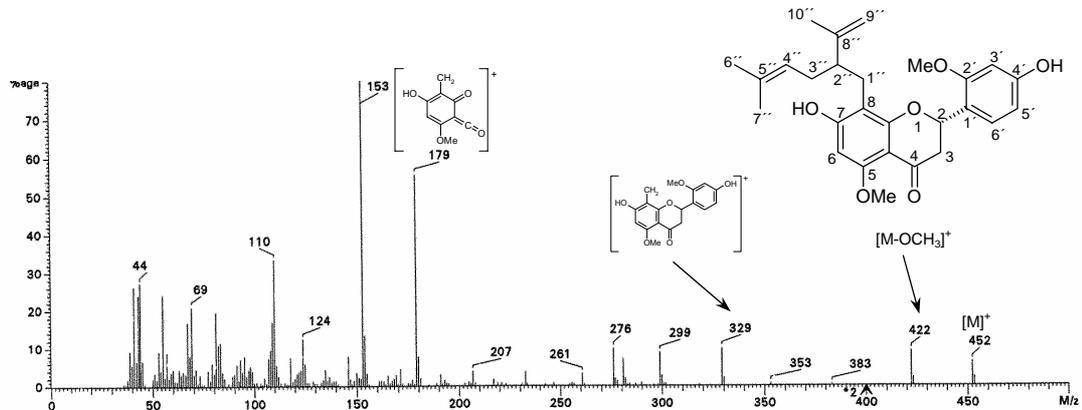


Abb. 82: EI-Massenspektrum von FL8

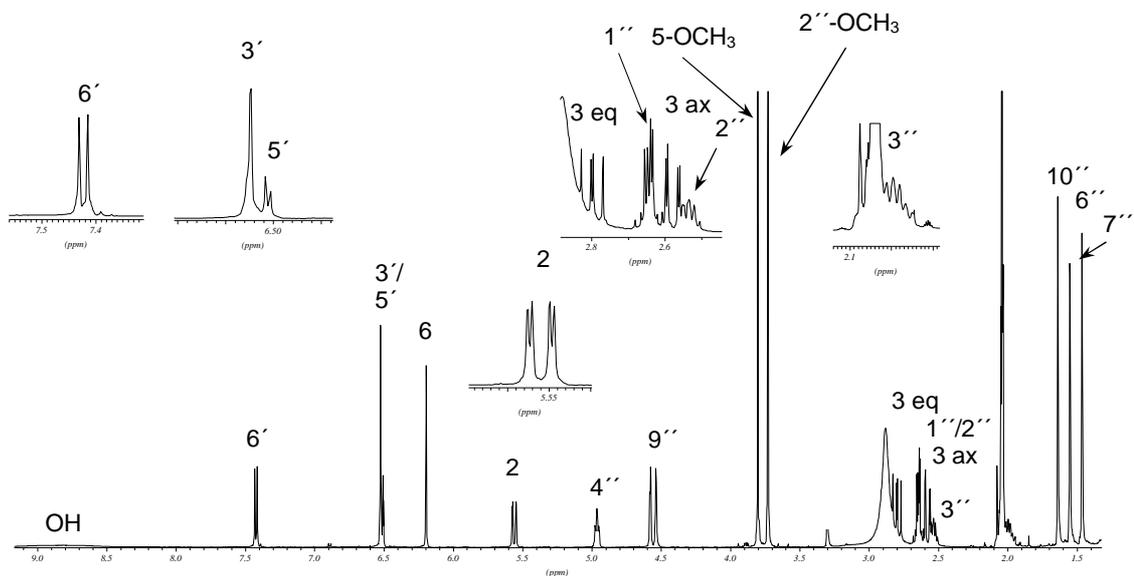


Abb. 83: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL8 (500 MHz, in Aceton- d_6)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 83) fiel zunächst das Vorhandensein von zwei Methoxygruppen durch die Signale bei 3,73 und 3,80 ppm auf. Alle Signale der Protonen einer Lavandulyl-Seitenkette, sowie die eines Flavanongrundgerüsts waren zusätzlich vorhanden. Das Aufspaltungsmuster der Protonensignale des B-Ringes im Bereich von 6,50-7,43 ppm zeigte eine 1',2',4'-Trisubstitution des Aromaten. Das Singulett bei 6,19 ppm wurde dem H-6 des A-Ringes zugeordnet. Das Tieffeldsignal bei ca. 12 ppm für eine 5-Hydroxylgruppe fehlte, somit musste diese Position durch eine Methoxygruppe ersetzt sein. Der

Literaturvergleich der ^1H -Daten zeigte mit den gemessenen Daten eine nahezu exakte Übereinstimmung (Tab. 39).

Tab. 39: ^1H -NMR-Daten von FL8 (500 MHz, in Aceton- d_6) und von 2'-Methoxykurarinon (Lit.) (500 MHz, in Aceton- d_6) nach KANG *et al.*, 2000; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
2	5,56 dd (13,2; 2,5)	5,56 dd (13,2; 2,5)	1''	2,64m	2,64m
3ax	2,80 dd (16,4; 13,2)	2,81 dd (16,0; 13,2)	2''	2,53 m	2,53 m
3eq	2,58 dd (16,4; 2,5)	2,58 dd (16,0; 2,5)	3''	1,99m	1,99m
6	6,19 s	6,19 s	4''	4,96 br t (6,9)	4,96 br t (6,7)
3''	6,51 m	6,51 m	6''	1,46 s	1,46 s
4''	6,51 m	6,51 m	7''	1,55 s	1,54 s
5''	7,42 d (8,2)	7,42 d (8,0)	9''	4,57s 4,54 s	4,57s 4,53 s
			10''	1,64 s	1,63 s
			2'-OCH ₃	3,73 s	3,72 s
			5-OCH ₃	3,80 s	3,80 s

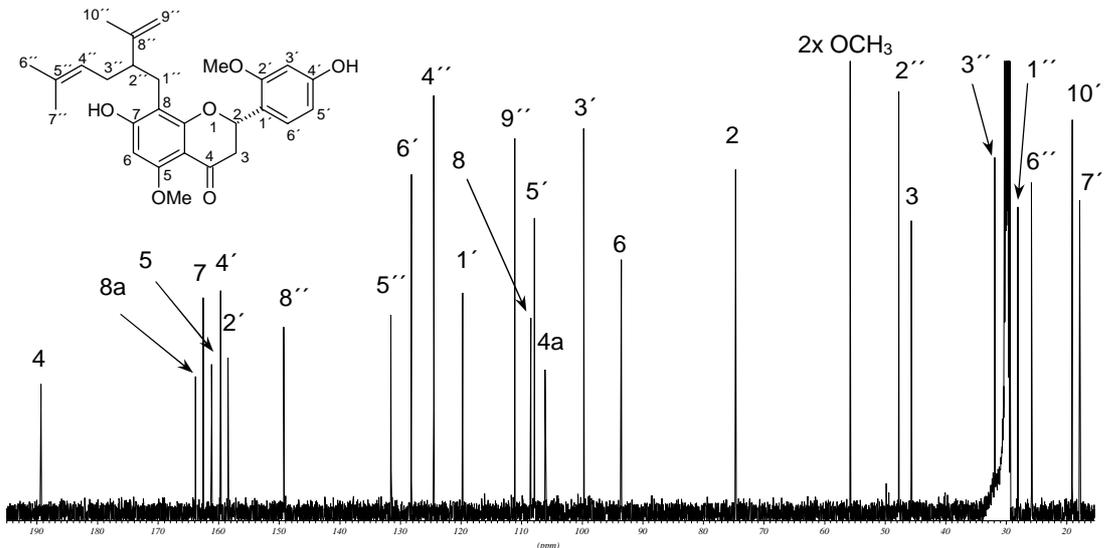


Abb. 84: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL8 (125 MHz, in Aceton- d_6)

Auch die ^{13}C -NMR-Daten stimmten sehr gut mit den Literaturdaten von 2'-Methoxykurarinon überein (Tab. 40), geringfügige Abweichungen ergaben sich aufgrund von Referenzierungsfehlern.

Die Messungen am Dichrometer zur Bestimmung der absoluten Konfiguration an C-2 zeigten ein positiver Cotton-Effekt bei 325 nm sowie ein negativer Cotton-Effekt bei 288 nm. Daraus wurde eine 2S-Konfiguration für FL8 abgeleitet.

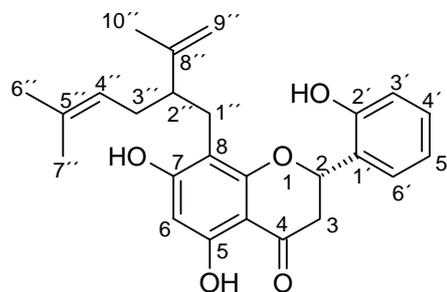
Tab. 40: ^{13}C -NMR-Daten von FL8 (125 MHz, in Aceton- d_6) und von 2'-Methoxykurarinon (Lit.) (125 MHz, in Aceton- d_6) nach KANG *et al.*, 2000;
* Zuordnungen vertauschbar

C-Atom	^{13}C (FL8)	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C (FL8)	^{13}C (Lit.)
2	74,2	74,7	6''	127,7	128,1
3	45,1	45,6	1''	27,5	28,0
4	188,6	189,5	2''	47,2	47,7
4a	105,6	106,1	3''	31,4	31,9
5	160,7	161,2	4''	124,0	124,5
6	93,0	93,5	5''	131,0	131,5
7	162,1	162,6	6''	25,3	25,8
8	108,5	108,5	7''	17,3	17,8
8a	163,3	163,8	8''	148,7	149,2
1'	119,2	119,7	9''	110,6	111,1
2'	157,9	158,4	10''	18,6	19,1
3'	103,5	99,6	2'OCH ₃	55,2*	55,7
4'	159,1	159,6	5'OCH ₃	55,3*	
5'	107,3	107,8			

FL8 wurde damit nach der Auswertung der gesammelten analytischen und spektralen Daten sowie nach Vergleich mit Literaturwerten als 2'-Methoxykurarinon identifiziert. Der Naturstoff war von KANG *et al.* (2000) für *Sophora flavescens* erstmals beschrieben worden, kurz bevor die Substanz im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurde.

Identifizierung von FL9 (Kushenol A)

(Synonym: 2',5,7-Trihydroxy-8-lavandulylflavanon)



FL9 wurde aus den Fraktionen II und III mit einer Ausbeute von 23,7 mg erhalten. Es handelte sich erneut um ein Flavanonderivat, was bereits durch das UV-Spektrum (Abb. 85) angedeutet wurde.

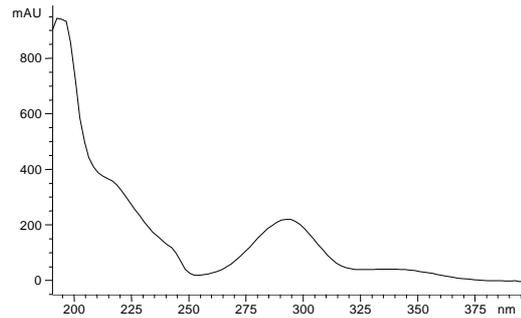
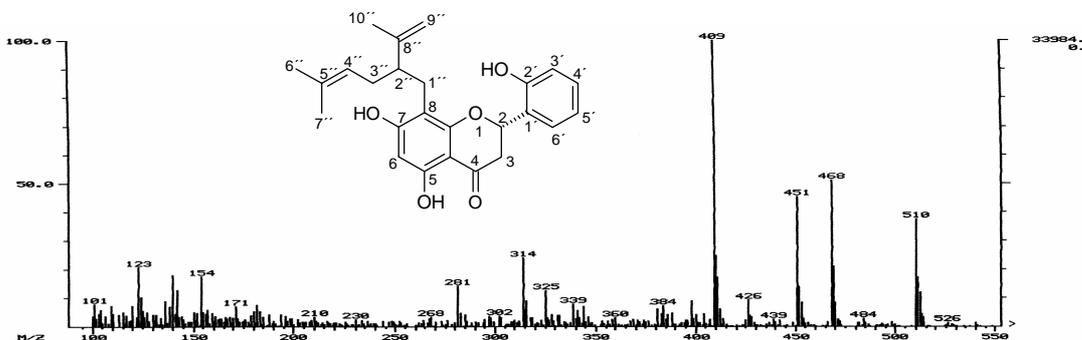


Abb. 85: UV-Spektrum von FL9

Da es für eine gewisse Zeit nicht möglich war, MS-Spektren nach Direkteinlass der Probe mit Elektronenstoß-Ionisierung zu messen, wurde der Versuch einer Derivatisierung durchgeführt, bei der die Hydroxylgruppen der Verbindung acetyliert werden sollten. So war es möglich, im CI-Spektrum nicht nur den Molpeak zu erkennen, sondern auch Fragmente der bei der Reaktion entstandenen Produkte. Dazu wurden 0,1 mg der isolierten Substanz mit Acetanhydrid und Pyridin versetzt. Nach 12-stündiger Reaktionszeit wurde der Ansatz unter Stickstoffatmosphäre zur Trockene eingedampft, in 1 ml Ethanol aufgenommen und ins MS-Gerät eingegeben. Es konnte ein MS-Spektrum nach chemischer Ionisation mit NH_3 erhalten werden, in dem neben Fragmenten mono- und diacetylierter Moleküle ein Basispeak mit m/z 409 auftrat. Die Masse entsprach dem mit einem Proton versehenen positiv geladenen Moleküllion. Das Fragment bei m/z 123 deutete das Vorliegen einer Lavandulylgruppe an.

Abb. 86: CI-MS-Spektrum von FL9 nach Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin (mit NH_3 als Reaktandgas)

Parallel dazu erfolgte eine HPLC-Untersuchung des Acetylierungsgemisches. Im Chromatogramm erschienen bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm vier Substanzpeaks (Peak 1-4) nach der vorgegebenen Reaktionszeit (Abb. 87).

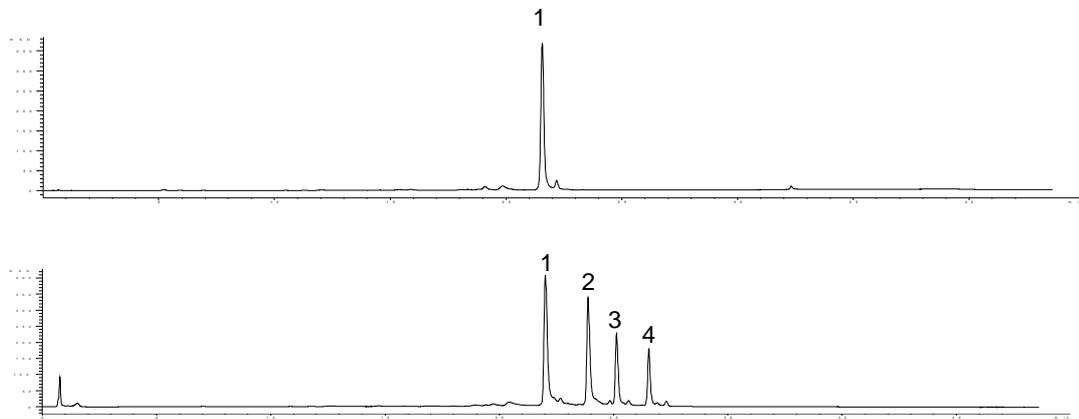


Abb. 87: HPLC-Chromatogramme von FL9 (Peak 1) vor der Acetylierung (oben) und Reaktionsprodukte (Peaks 2-4) nach abgelaufener Reaktion (unten);(Trennmethode: LC1; Einspritzvolumen 10 µl; Detektion bei 220 nm)

Bei der Derivatisierung hatte sich also nur ein Teil der Substanzmenge vollständig umgesetzt. Theoretisch hätte es sich bei dem Gemisch der Substanzen auch um eventuell entstehende Zersetzungsprodukte handeln können. Dies konnte aber durch online aufgenommene UV-Spektren der eluierten Substanzen ausgeschlossen werden. Alle UV-Spektren zeigten typische Maxima für Flavanonderivate und waren nahezu identisch. Die bei diesem Gemisch zuerst eluierte Substanz hatte die gleiche Retentionszeit wie vor der Acetylierung, folglich hatte hier noch keine Reaktion stattgefunden. Die anderen drei später eluierten Substanzen waren lipophiler und ließen vermuten, dass es sich hier um mono-, di- und triacetylierte Reaktionsprodukte handelte. Wahrscheinlich waren also bei FL9 drei Hydroxylgruppen enthalten. Den bisherigen Strukturinformationen nach wurde eine Summenformel von $C_{25}H_{28}O_5$ für FL5 postuliert. Weitere Informationen zur Strukturaufklärung sollte die NMR-Spektroskopie liefern.

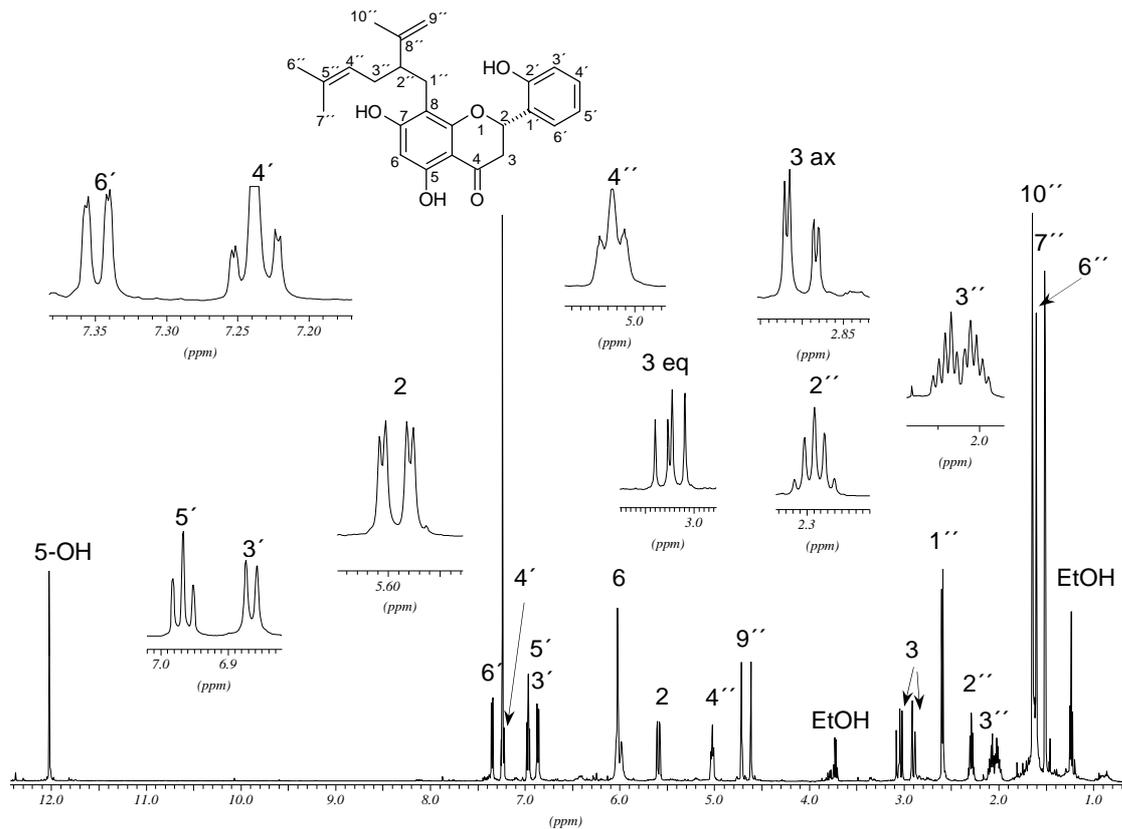


Abb. 88: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL9 (500 MHz, in CDCl_3)

Das Tieffeldsignal bei 12,02 ppm ließ die Anwesenheit einer chelatisierten Hydroxylgruppe an C-5 erkennen. Die Protonen der anderen OH-Gruppen zeigten keine Signale, da ein Austausch mit dem verwendeten Lösungsmittel CDCl_3 stattfand. Im aromatischen Bereich zwischen 6,0-7,5 ppm erschienen Signale für fünf Protonen, wovon das Singulett bei 6,02 ppm dem H-6 des A-Ringes zugehörig war. Die anderen im tieferen Feld zur Resonanz kommenden H-Atome bildeten untereinander ein Spinsystem. Da die zugehörigen Signale für jedes Proton unterschiedliche chemische Verschiebungen hatten, konnte im Gegensatz zu FL1 keine para-Substitution des B-Ringes vorliegen. Der Aromat (B-Ring) von FL9 musste in ortho-Stellung substituiert sein, weil die in Frage kommenden Signale mit zwei Triplets und zwei Dubletts nur diesem Substitutionsmuster gerecht werden konnten. Die C-Ring-Protonen (H-2 und H-3) zeigten die für Flavanone typischen Signale zwischen 2,87 und 3,05 ppm bzw. bei 5,60 ppm. Schließlich fanden sich alle Signale von Protonen einer Lavandulyl-Seitenkette. Diese wurden bereits zuvor bei FL4 erklärt. Ein

Unterschied war bei den Signalen der Protonen an C-3''' zu erkennen. Anstatt des zuvor auftretenden Triplets existierten zwei Multipletts, die allerdings direkt ineinander übergingen. Anscheinend waren die Protonen der Seitenkette in diesem Fall also nicht äquivalent. Die beiden im Spektrum zusätzlich auftretenden Signale bei 1,25 und 3,72 ppm stammten von Ethanol, welches als Lösungsmittelrest noch in der Probe vorhanden war.

Tab. 41: ^1H -NMR-Daten von FL9 (500 MHz, in CDCl_3) im Vergleich zu Kushenol A (90 MHz bzw. keine Angabe der Messfrequenz, beide in Aceton- d_6) nach (Lit.1) WU *et al.*, 1985 und (Lit.2) IINUMA *et al.*, 1993; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.1)	^1H (Lit.2)
2	5,59 dd (13,2; 3,1)	5,73 dd (12,0; 4,5)	5,76 dd (13,0; 3,0)
3 ax	2,89 dd (17,3; 3,1)	2,88-3,20 m	3,02 dd (17,0; 13,0)
3 eq	3,05 dd (17,3; 13,2)	2,88-3,20 m	2,04-2,91 m
6	6,02 s	6,01 s	6,04 s
3'	6,87 d (7,6)	6,92-7,61 m	6,98 m
4'	7,24 dt (7,8; 1,2)	6,92-7,61 m	7,21 ddd (8,0; 8,0; 2,0)
5'	6,97 dt (7,6; 1,2)	6,92-7,61 m	6,98 m
6'	7,35 (7,6; 1,6)	6,92-7,61 m	7,63 dd (8,0; 2,0)
1''	2,59 d (7,0)	2,64 m	2,04-2,91 m
2''	2,29 q (7,0)	1,96-2,17 m	2,04-2,91 m
3''	1,98-2,11 m	1,96-2,17 m	2,04-2,91 m
4''	5,03 m (wie br t)	5,00 br t (7,0)	5,00 t (wie m)
6''	1,60 s	1,56 s	1,56 s
7''	1,51 s	1,48 s	1,48 s
9''	4,71 br s 4,61 br s	4,60 br s	4,61 br s 4,58 br s
10''	1,64 s	1,66 s	1,66 s
5-OH	12,02 s	12,56 s	12,17 s
2xOH	5,98 s 6,03 s		8,80 br s 9,60 br s

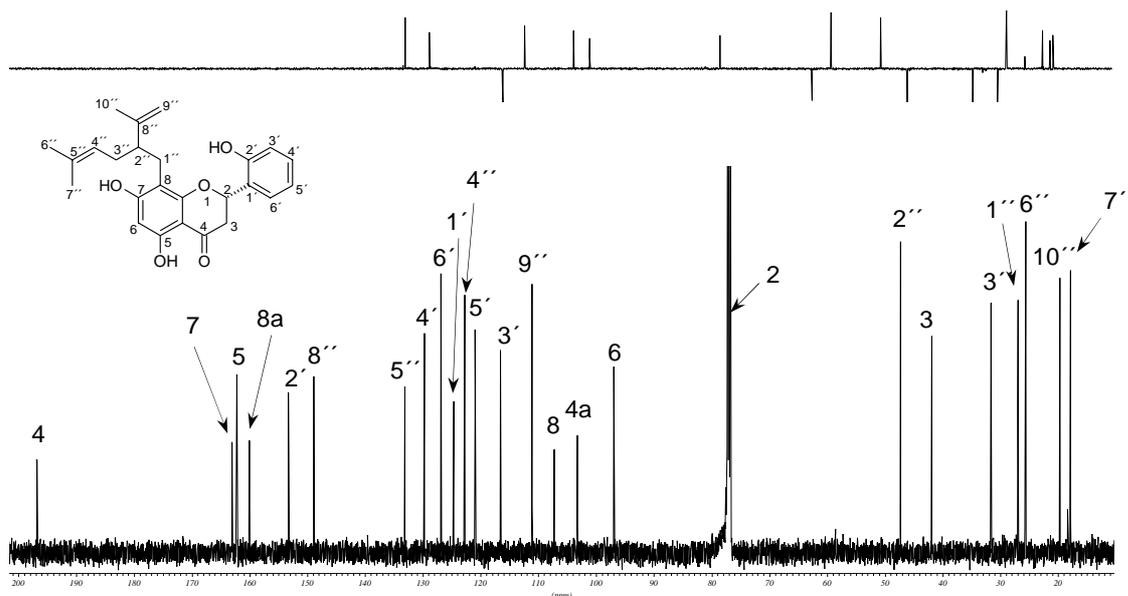


Abb. 89: ^{13}C -NMR- und zugehöriges DEPT-Spektrum von FL9 (125 MHz, in CDCl_3)

Im ^{13}C -Spektrum (Abb. 89) zeigten sich die zu erwartenden Signale, deren chemische Verschiebung mit Literaturdaten (Tab. 42) verglichen wurden. Das Signal von C-2 verbarg sich unter dem des Lösungsmittels (CDCl_3). Dies konnte durch die Aufnahme des darüber abgebildeten DEPT-Spektrums bewiesen werden.

Tab. 42: ^{13}C -NMR-Daten von FL9 (125 MHz, in CDCl_3) im Vergleich zu Kushenol A (22,5 MHz, in Aceton- d_6) nach (Lit.) Wu *et al.*, 1985; δ in [ppm]

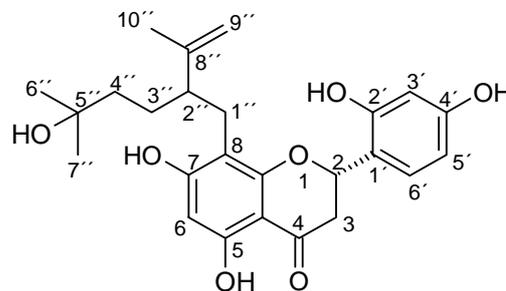
C-Atom	^{13}C (FL9)	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C (FL9)	^{13}C (Lit.)
2	76,8	75,5	5'	120,9	120,7
3	41,9	42,7	6'	126,8	127,4
4	196,8	197,7	1''	27,0	27,8
4a	103,2	103,3	2''	47,3	47,8
5	162,2	163,1	3''	31,6	32,0
6	97,0	96,6	4''	124,7	124,5
7	163,1	165,3	5''	133,2	131,6
8	107,3	108,0	6''	25,7	25,7
8a	160,0	161,8	7''	17,9	17,8
1'	122,8	126,8	8''	148,9	149,2
2'	153,2	154,7	9''	111,1	111,1
3'	116,5	116,3	10''	19,8	19,3
4'	129,8	130,0			

Auch der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten zeigte gute Übereinstimmungen mit den ebenfalls angegebenen Vergleichswerten. Allerdings muss die von IINUMA *et al.* erstellte Zuordnung von H-3ax und H-3eq vertauscht werden.

Auf der Basis aller spektralen Daten konnte die Struktur von FL9 als Kushenol A aufgeklärt werden. Diese Substanz war bereits in früheren Arbeiten von WU *et al.* (1985) aus *Sophora flavescens*, sowie aus *Sophora exigua* von IINUMA *et al.* (1993) beschrieben worden.

Identifizierung von FL10 (Norkurarinol)

(4'',5''-Dihydro-5''-hydroxy-8-lavandulylflavanon)



FL10 konnte mit einer Ausbeute von 28,5 mg aus der Grobfraktion VIII rein isoliert werden. Bei der analytischen Untersuchung zeigte FL10 ähnliche Eigenschaften wie die zuvor isolierten Substanzen, war allerdings polarer als FL1 bis FL10. FL10 eluierte in der HPLC bei kürzeren Retentionszeiten und wurde auf der DC-Folie mit niedrigerem R_f -Wert detektiert.

Da weder das EI-Massenspektrum, der Molpeak noch das FAB-Massenspektrum Aussagen über das Molekulargewicht von FL10 erlaubten, wurde in diesem Fall ein ESI-Spektrum an einer LC-MS-Kopplung aufgenommen. Abb. 90 zeigt im oberen Teil den Totalionenstrom (TIC), während im unteren Teil der Abbildung das dem Substanz-Peak des TIC zugehörige Massenspektrum zu sehen ist. Hier erkennt man deutlich das Pseudomolekülion bei m/z 443 ($[\text{M}+1]^+$), sowie die Abspaltung von 18 Masseneinheiten (Wasserabspaltung) ($[\text{M}-18]^+$) bei m/z 425. Die Bruchstücke bei m/z 302 und m/z 301 entstanden nach der sich anschließenden Abspaltung einer Seitenkette.

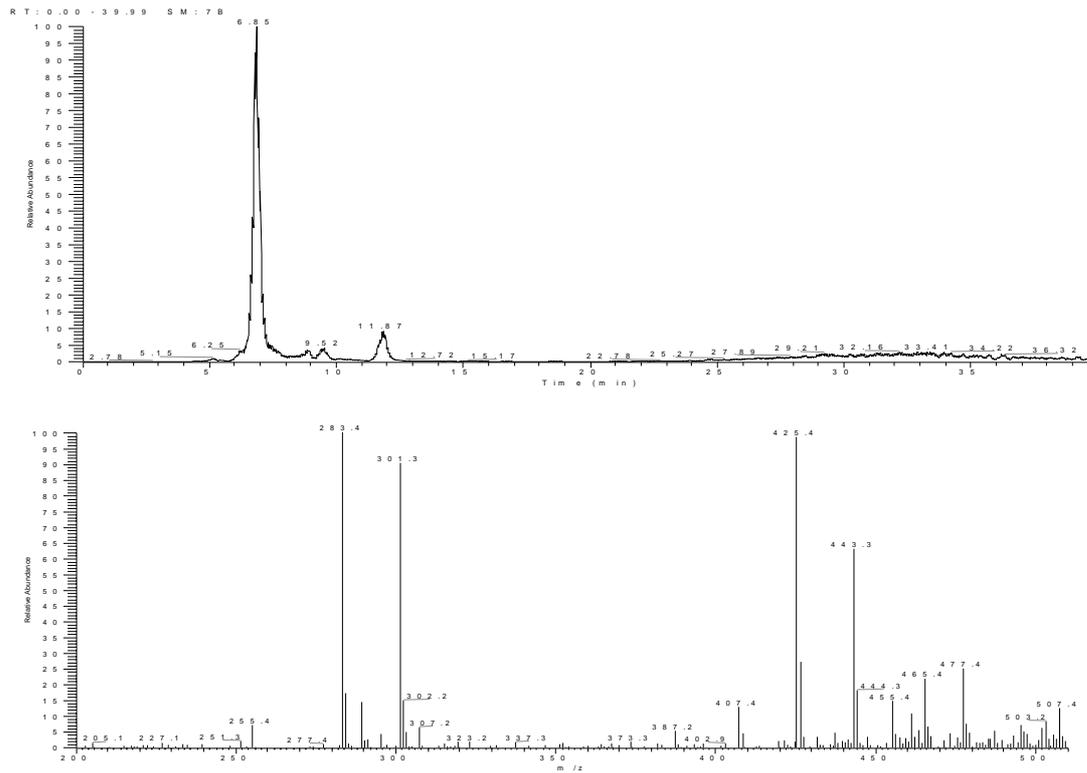
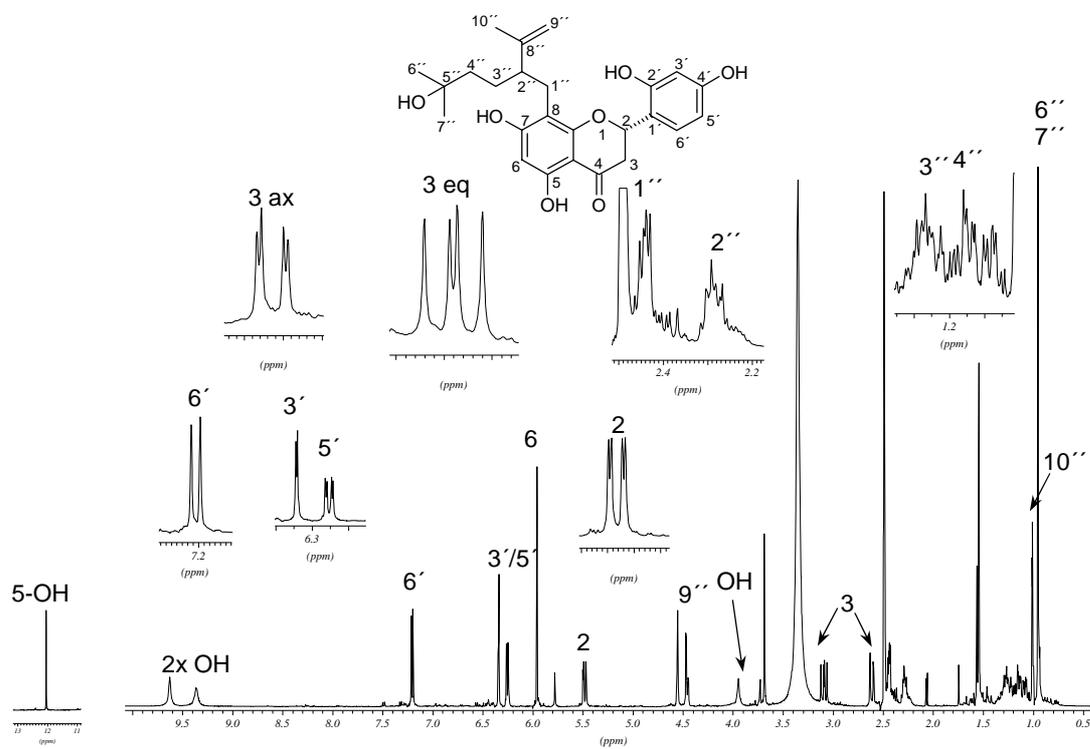


Abb. 90: LC-MS-Spektren von FL10

Abb. 91: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL10 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 91) von FL10 konnten die für ein Flavanongrundgerüst typischen Signale erkannt werden. Erneut lag der B-Ring als 1',2',4'-trisubstituierter Aromat vor. Die Signallagen der Protonen der Seitenkette sowie deren Aufspaltungsmuster unterschieden sich aber von allen bisher diskutierten Verbindungen. Auf den ersten Blick des ^1H -Spektrums war zu erkennen, dass das Triplett für H-4'', das üblicherweise bei ca. 4,8 ppm in Erscheinung trat (siehe dazu z.B. FL9), in diesem Spektrum nicht mehr vorhanden war. Dies zeigte an, dass die Doppelbindung zwischen 4'' und 5'' fehlen musste. Im Bereich von 1,10 - 1,40 ppm offenbarten sich im Spektrum dieser Verbindung zwei Multipletts für jeweils zwei Protonen. Nach Auswertung eines zusätzlich aufgenommenen $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrums konnten diese Signale als H-3'' und H-4'' erkannt werden. In diesem Spektrum zeigten sich zum einen Kreuzsignale von H-2'' zu H-1'' und H-3'', zum anderen koppelte H-3'' mit H-2'' und H-4''.

Im höchsten Feld des ^1H -NMR-Spektrums erschien ein Singulett bei 0,95 ppm mit einem Integral für sechs Protonen, was bedeutete, dass FL10 zwei geminale Methylgruppen enthielt, die chemisch äquivalent waren. Im Vergleich zu bisher diskutierten Verbindungen waren die Signale dieser Methylgruppen zusätzlich noch weiter ins Hochfeld verschoben, während die chemische Verschiebung des Singuletts von H-10'', das ebenfalls einer Methylgruppe entsprach, mit 1,54 ppm nahezu konstant geblieben war im Vergleich zu Flavanonderivaten mit Lavandulyl-Seitenkette (z.B. FL10).

Im Unterschied zu vorherigen ^{13}C -NMR-Spektren wurde bei FL10 ein neues Signal bei 68,9 ppm beobachtet, das die Anwesenheit eines mit einer Hydroxylgruppe substituierten Kohlenstoffzentrums zeigte. Die Position der OH-Gruppe wurde dem C-5'' zugeordnet, was durch ein ebenfalls aufgenommenes HMBC-Spektrum bewiesen wurde.

Der Hochfeldshift der Signale der Protonen H-3'' und H-4'' und derer von H₃-6'' und H₃-7'' bei 0,95 ppm im ^1H -NMR-Spektrum wurde also durch eine Hydroxylgruppe, die an C-5'' lokalisiert war, ausgelöst.

Tab. 43: ^1H -NMR-Daten von FL10 (500 MHz, in DMSO-d_6) im Vergleich mit Norkurarinol (60 MHz, in Aceton-d_6) nach Kyogoku *et al.*, 1973 (Lit.1) und (75 MHz, in DMSO-d_6) nach Ryu *et al.*, 1997 (Lit.2); δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.1)	^1H (Lit.2)
2	5,48 dd (13,2; 2,9)	5,80 m	5,45 dd (13,2; 2,2)
3ax	2,61 dd (17,1; 2,9)	2,7-3,1 m	2,52 dd (16,0; 2,2)
3eq	3,09 dd (17,1; 13,2)	2,7-3,1 m	3,22 dd (16,0; 13,2)
6	5,96 s	6,03 s	5,92 s
3'	6,34 d (2,2)	6,52 d (2,2)	6,38 d (1,8)
5'	6,25 dd (8,4; 2,2)	6,50 q (9,0; 2,2)	6,25 dd (8,3; 1,8)
6'	7,21 d (8,4)	7,42 d (9,0)	7,23 d (8,3)
1''	2,44 m	2,61 br s	2,48 m
2''	2,29 m		2,33 m
3''	1,27 m	1,35-1,8 m	1,28 m
4''	1,11 m	1,35-1,8 m	1,09 1,18 m
6''	0,95 s	1,18 s	0,95 s
7''	0,95 s	1,18 s	0,95 s
9''	4,55 s 4,47 s	4,6 br s	4,45 s 4,56 s
10''	1,55 s	1,58 s	1,57 s
5-OH	12,10 s	12,21 s	12,12 s

Beim Vergleich der erzielten Daten des ^{13}C -Spektrums (Abb. 92) mit den Literaturwerten für Norkurarinol (Tab. 44) ließ sich eine große Übereinstimmung erkennen.

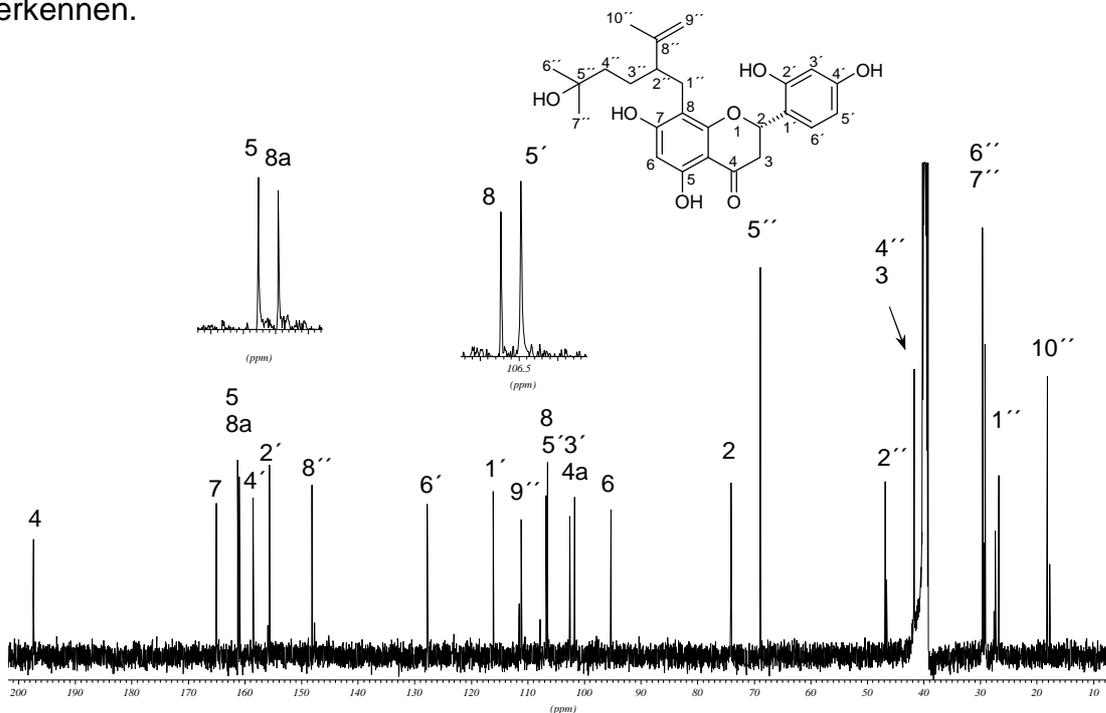


Abb. 92: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL10 (500 MHz, in DMSO-d_6)

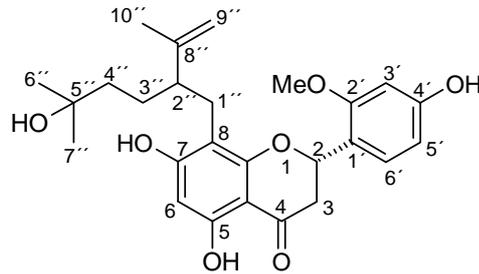
Tab. 44: ^{13}C -NMR-Daten von FL10 und FL11 (jeweils 500 MHz) im Vergleich zu Norkurarinol (75 MHz) und Kushenol P (100 MHz) nach (Lit.1) Ryu *et al.* (1997) und (Lit.2) Kuroyanagi *et al.* (1999); (a): DMSO-d_6 als Solvens; (b): $\text{CDCl}_3+\text{MeOD-d}_4$ als Solvens; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C (FL10) (a)	^{13}C (Lit.1)	^{13}C (FL11) (a)	^{13}C (FL11) (b)	^{13}C (Lit.2)
2	74,1	73,9	73,6	75,1	74,1
3	41,7	42,0	41,5	43,0	42,5
4	197,4	197,1	197,0	198,6	197,5
4a	101,8	101,6	101,6	103,3	102,6
5	161,3	161,1	160,7	162,2	161,5
6	95,3	95,1	95,2	96,3	95,8
7	165,0	164,8	161,1	162,7	161,7
8	106,7	106,5	106,9	108,6	107,6
8a	161,0	160,8	164,8	166,3	164,7
1'	116,1	115,9	117,7	119,5	118,9
2'	155,6	155,5	159,0	159,5	161,2
3'	102,6	102,3	98,9	99,6	98,9
4'	158,5	158,3	157,4	158,3	157,3
5'	106,5	106,3	106,6	108,0	107,2
6'	127,8	127,6	127,7	128,3	127,4
1''	27,3	27,1	27,1	28,4	27,3
2''	46,8	46,6	46,5	48,2	46,9
3''	26,7	26,5	26,5	27,8	26,4
4''	41,7	41,5	41,5	42,5	41,4
5''	68,8	68,7	68,6	71,5	71,3
6''	29,6	29,4	28,9	29,0	28,6
7''	29,3	29,0	29,4	29,3	28,8
8''	148,1	147,9	148,0	149,1	148,3
9''	111,1	110,9	110,9	111,7	110,8
10''	18,2	18,0	17,9	18,9	18,7
OCH_3			55,3	55,9	55,2

CD-Messungen ergaben eine 2S-Konfiguration der Verbindung, denn es wurden positive Cotton-Effekte bei 259 und 334 nm gemessen und ein negativer Cotton-Effekt bei 292 nm. Der spezifische Drehwert $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ der Verbindung betrug $+ 48,5^\circ$ (in Ethanol p.a., $c = 0,1$). Bei FL10 handelte es sich somit um die Verbindung von Norkurarinol.

Norkurarinol stellt den 4'',5''-Dihydro-5''-hydroxy-2'-methylether von Sophoraflavanon G dar. Im Unterschied zu vorher isolierten Inhaltsstoffen aus der Droge war die Lavandulyl-Seitenkette in 5''-Position hydroxyliert. Der Naturstoff ist bereits 1985 von Wu *et al.* aus *Sophora flavescens* isoliert und seine Struktur publiziert worden.

Identifizierung von FL11 (Kushenol P)



Die Isolierung von FL11 gelang aus der Grobfraktion VI mit einer Ausbeute von 161 mg. Das FAB-Spektrum der Substanz offenbarte ein Pseudomolek n bei m/z 457 ($[M+1]^+$). Die Abspaltung von Wasser wurde durch das Fragment m/z 439 ($[M-18]^+$) ausgedrückt. Dieses Fragment zerfiel durch die weitere Abspaltung von 123 amu und bildete schließlich ein Fragment bei m/z 315. Das Fragmentierungsmuster führte zu der Annahme, dass eine Lavandulyl-Seitenkette vorlag, die in gleicher Weise wie bei FL10 hydroxyliert vorlag. Mit m/z 165 fand sich auch hier ein Molek bruchst ck, das ein Produkt einer RDA-Reaktion darstellte.

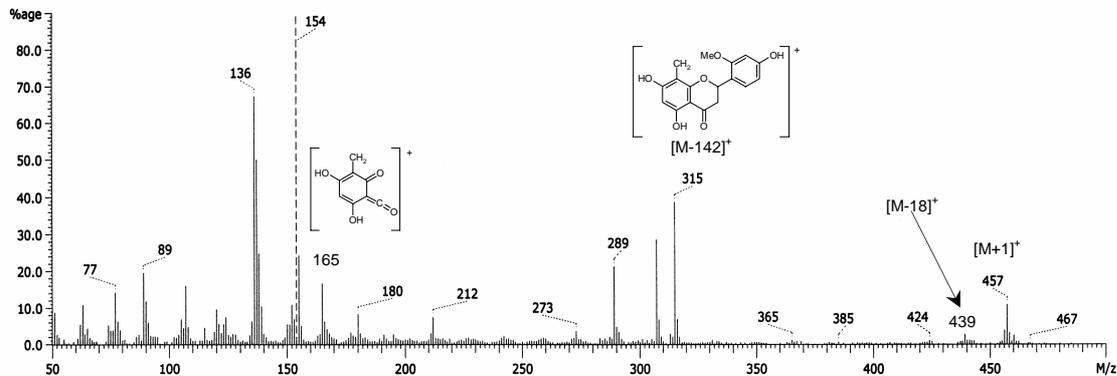
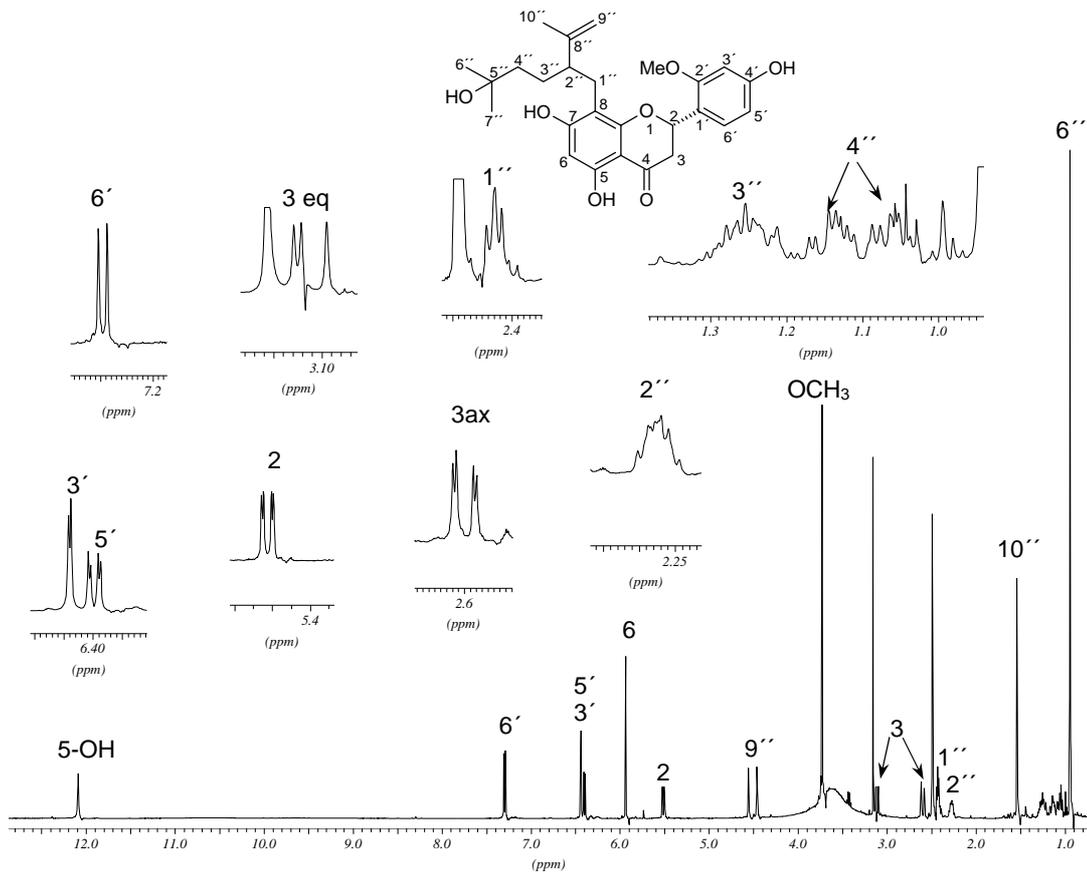


Abb. 93: FAB-Spektrum FL11, mit NBA als Trägersubstanz

Auch FL11 lag als Flavanonderivat mit einem 1',2',4'-trisubstituierten B-Ring vor. Die Seitenkette hatte die gleiche Struktur wie bereits bei FL10 gezeigt und wie nach Interpretationen des FAB-Spektrums vermutet wurde. Im Unterschied zu Norkurarinol enthielt die Verbindung FL11 eine Methoxygruppe. Dies zeigte sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 94) durch ein Singulett mit charakteristischer chemischer Signallage bei 3,7 ppm und einem Integral für drei Protonen.


 Abb. 94: ^1H -NMR-Spektrum von FL11 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Tab. 451: ^1H -NMR-Daten von FL11 (500 MHz) im Vergleich zu Kushenol P (400 MHz) nach KUROYANAGI *et al.*, 1999; (a): DMSO-d_6 als Solvens; (b): $\text{CDCl}_3+\text{MeOD-d}_4$ (1:1) als Solvens; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H (a)	^1H (b)	^1H (Lit.) (b)
2	5,51 dd	5,68 dd (13,0; 2,9)	5,55 dd(12,6; 3,2)
3 ax	2,60 dd	3,01 dd (17,0; 13,3)	2,86 dd (16,8; 12,8)
3 eq	3,13 dd	2,84 dd (17,0; 2,9)	2,76 dd (16,8; 3,2)
6	6,94 s	6,05 s	5,93 s
3'	7,30 d	6,55 d (2,2)	6,4 d (2,0)
5'	6,4 dd	6,57 d (8,2; 2,2)	6,44 dd (8,2; 2,0)
6'	6,44 d	7,47 d (8,2)	7,32 d (8,2)
1''	2,43 t	2,68 m	2,56 dd (7,4; 2,4)
2''	2,27 m	2,46 m	2,29 m
3''	1,27 m	1,45 m	1,34 m
4''	1,06 m 1,11 m	1,35 m	1,23 m
6''	0,94 s	1,17 s	1,07 s
7''	0,94 s	1,17 s	1,08 s
9''	4,46 s 4,55 s	4,64 s 4,71 s	4,53 s 4,59 s
10''	1,54 s	1,72 s	1,59 s
5-OH	12,09 s		12,56 s
OCH_3	3,73 s	3,89 s	3,74 s

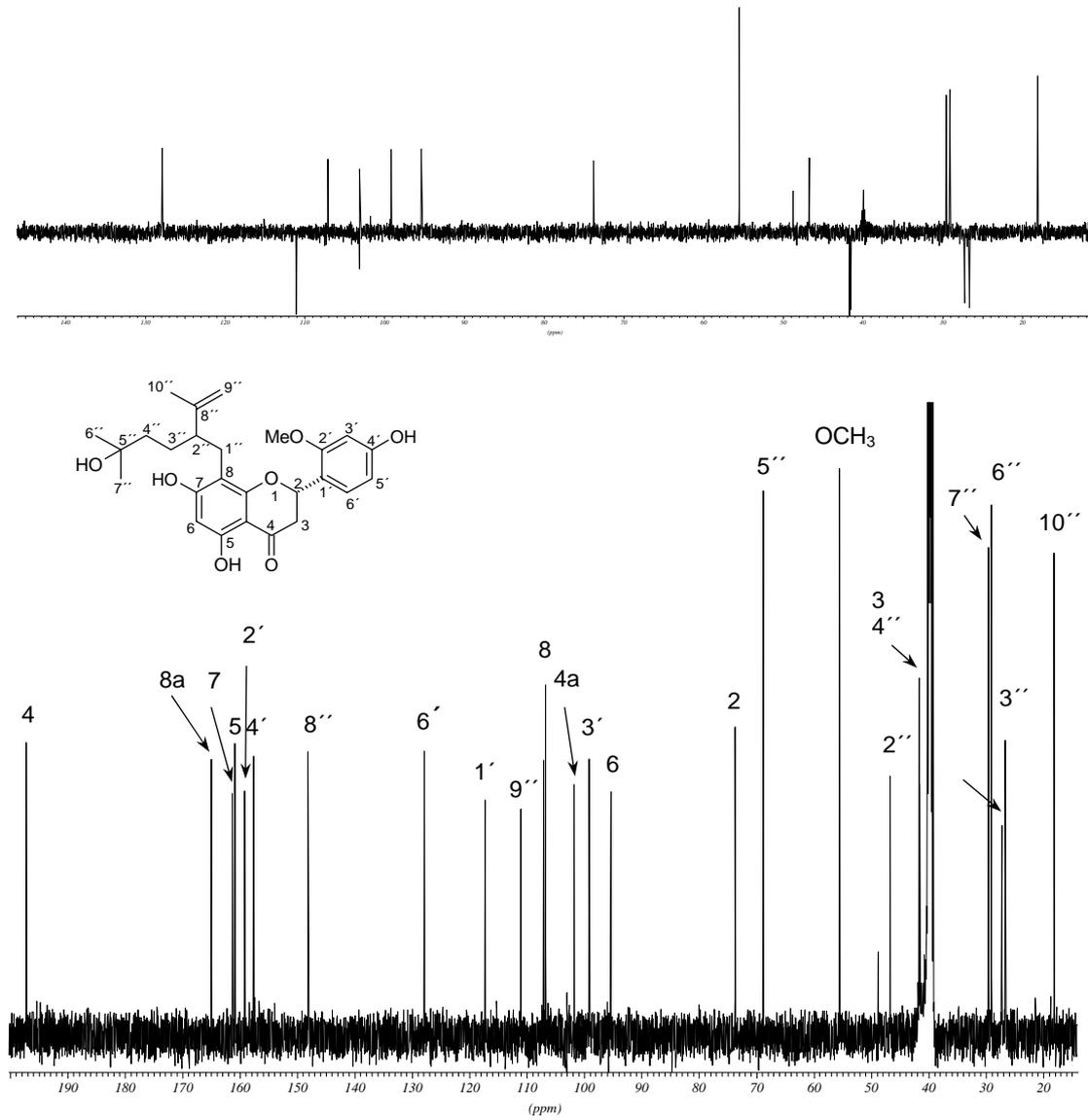
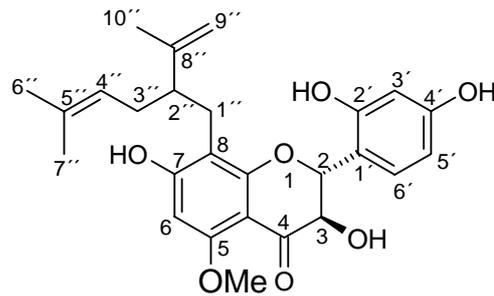


Abb. 95: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL11 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Identifizierung von FL12 (Kushenol I)

Die Isolierungsarbeiten der Grobfraction VIII brachten 204 mg von FL12 hervor. Unter den Inhaltsstoffen des Dichlormethanextraktes gehörte FL12 im bei 210 nm detektierten HPLC-Chromatogramm zu den drei größten Peaks und war auch quantitativ unter den drei Hauptsubstanzen neben Kurarinon und Sophoraflavanon G zu finden.

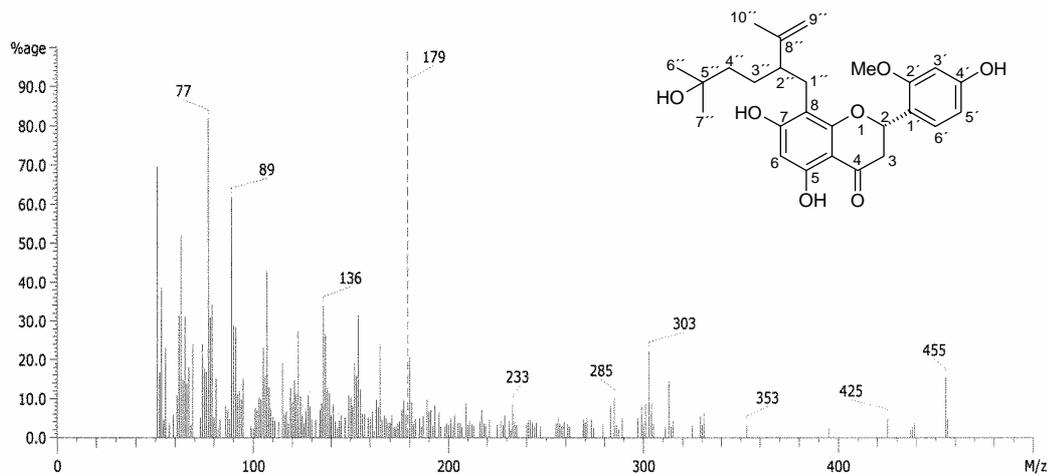


Abb. 96: FAB-Spektrum von FL12 mit NBA als Trägersubstanz

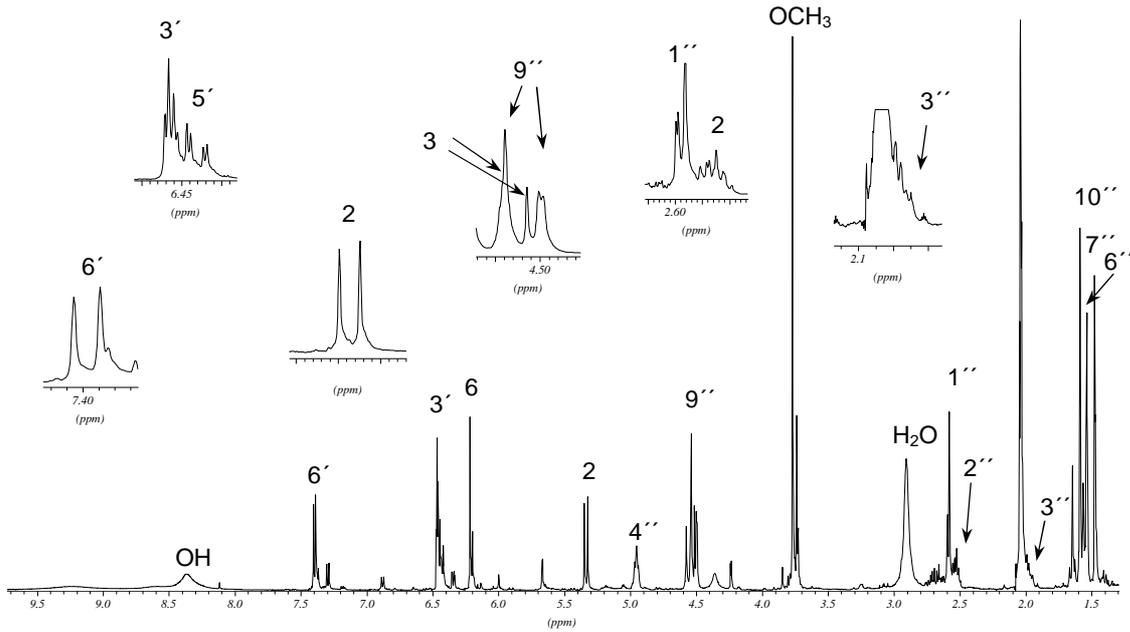


Abb. 97: ^1H -NMR-Spektrum von FL12 (500 MHz, in Aceton- d_6)

Aus dem Protonen- und MS-Spektrum von FL12 ging hervor, dass die Verbindung eine Lavandulyl-Seitenkette enthielt. Das Substitutionsmuster des B-Ringes war erneut eine 1',2',4'-Trisubstitution. Bedingt durch das Fehlen eines Singulett bei ca. 12 ppm und dem Vorhandensein einer Methoxygruppe wurde diese an C-5 gebunden zugeordnet. Anders als die bisher diskutierten Verbindungen verhielten sich die Signale der Protonen des C-Ringes. Da sich die Signale teilweise im Aceton aufgenommenen Spektrum überlagerten, wurde zusätzlich ein ^1H -Spektrum in DMSO- d_6 aufgenommen. Einen Ausschnitt dieses aufgenommenen Spektrums zeigt Abb. 98.

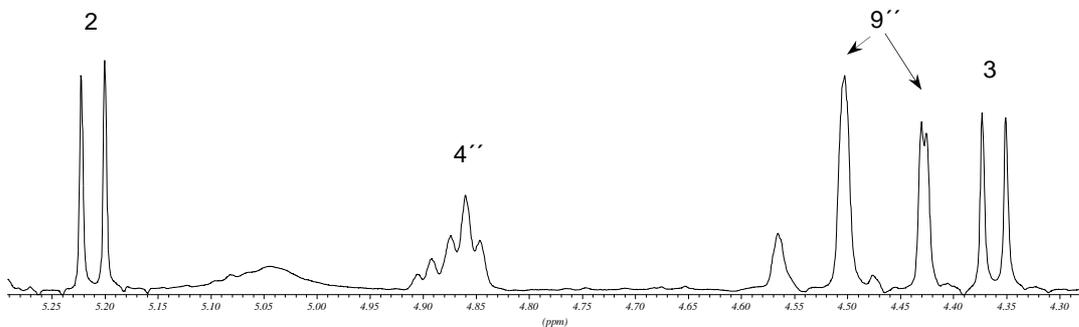


Abb. 98: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von FL12 in DMSO- d_6 (500 MHz)

Aufgrund einer Kopplungskonstante von 11,4 Hz der Dubletts bei 4,36 und 5,21 ppm konnte festgestellt werden, dass H-2 und H-3 diaxial und damit transständig zueinander waren. FL12 lag also als Flavanonol-Derivat vor, bei dem der B-Ring in der Äquatorialebene und in trans-Position zur OH-Gruppe an C-3 stand.

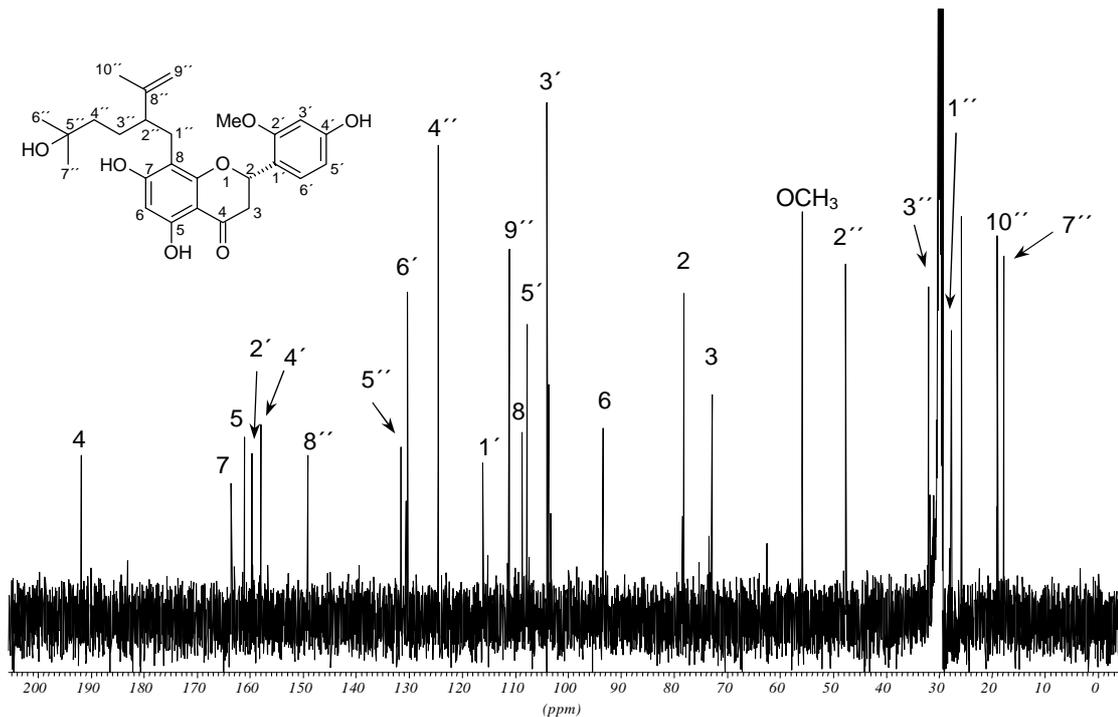


Abb. 99: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL12 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Tab. 46: ^1H -NMR-Daten von FL12 (500 MHz, in Aceton-d_6) im Vergleich zu Kushenol I (90 MHz, in Aceton-d_6) nach Wu *et al.*, 1985; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
2	5,34 d (12,3)	5,32 d (12,5)	3''	2,02 m	1,68-2,58 m
3	4,53 d (12,3)	4,50 d (12,5)	4''	4,95 br t (7,0)	4,96 br t (7,0)
6	6,22 s	6,22 s	6''	1,54 s	1,60 s
3'	6,47 d (2,2)	6,48 d (2,0)	7''	1,48 s	1,50 s
5'	6,45 dd (8,2; 2,2)	6,46 dd (8,0; 2,0)	9''	4,53 s 4,50 s	4,52 br s
6'	7,40 d (8,2)	7,38 d (8,0)	10''	1,59 s	1,60 s
1''	2,59 br d (7,3)	1,68-2,58 m	OCH ₃	3,77 s	3,78 s
2''	2,52 m	1,68-2,58 m			

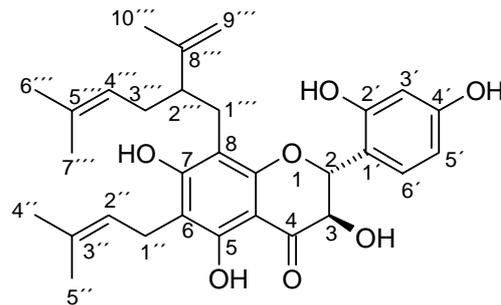
Auffällig im ^{13}C -NMR-Spektrum war die Tieffeldverschiebung für C-3 bei 73,1 ppm (bei Flavanonen üblicherweise im Bereich von 42-45 ppm). Daneben zeigte auch C-2 eine deutliche Tieffeldverschiebung von etwa. 5 ppm.

Tab. 47: ^{13}C -NMR-Daten von FL12 (125 MHz, in DMSO- d_6) im Vergleich zu Kushenol I (22,5 MHz, in Aceton- d_6) nach Wu *et al.*, 1985; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
2	78,5	78,5	5'	108,0	107,9
3	73,1	73,1	6'	130,5	130,0
4	192,1	192,1	1''	28,0	27,8
4a	104,0	103,3	2''	47,9	47,8
5	161,3	163,7	3''	32,3	32,1
6	93,7	93,7	4''	124,8	124,5
7	163,8	163,6	5''	131,8	131,4
8	109,0	108,8	6''	26,1	25,7
8a	163,8	163,3	7''	18,1	17,8
1'	116,4	116,1	8''	149,4	149,1
2'	159,9	159,5	9''	111,4	111,0
3'	104,3	104,0	10''	19,3	19,2
4'	158,2	157,8	OCH ₃	56,1	55,9

Die Substanz FL 13 war optisch aktiv mit einem spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +1,5^\circ$ ($c = 0,1$; in EtOH). CD-Messungen ergaben, dass die Verbindung als 2S-Isomer vorlag. Dabei waren positive Cotton-Effekte bei 259 und 334 nm, sowie ein negativer Cotton-Effekt bei 290 nm zu verzeichnen. Aufgrund der erstellten spektralen Daten und nach Vergleich mit in der Literatur bekannten Daten handelte es sich bei FL12 eindeutig um Kushenol I.

Das Flavanolderivat war zuvor von Wu *et al.* (1985) als Inhaltsstoff von *Sophora flavescens* identifiziert worden.

Identifizierung von FL13 (Kushenol M)

Die Isolierung von FL13 gelang mit einer Ausbeute von 11 mg aus der Grobfraction V. Bei der Testung im 5-LOX-Assay zeigte der Inhaltsstoff sehr gute Hemmeigenschaften.

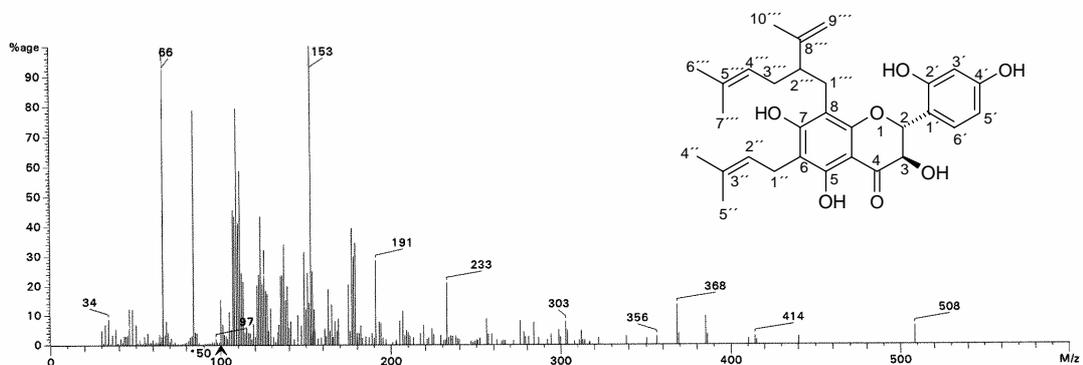


Abb. 100: EI-MS-Spektrum von FL13

Da die Intensitäten der Fragmente im Bereich von 100 - 550 amu nur sehr gering waren, wurde dieser Bereich in 50-facher Vergrößerung dargestellt. Somit war der Molpeak bei m/z 508 eindeutig zu erkennen. Das Fragment bei m/z 385 ($[M-123]^+$) entstand durch die Abspaltung einer Lavandulyl-Seitenkette vom Molekülion.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren genau wie auch bei FL4 die Signale von zwei Seitenketten vorhanden. Eine Lavandulyl-Seitenkette war an C-8 positioniert, die Isopentenyl-Seitenkette war an C-6 gebunden. Den Beweis dafür lieferte ein HMBC-Spektrum. Wie FL12 lag auch FL13 als Flavanonol-Derivat vor, was man anhand der Signalaufspaltung, der chemischen Verschiebung von H-3 und der zugehörigen Kopplungskonstanten zu H-2 belegen konnte (siehe dazu auch $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL12, Abb. 97).

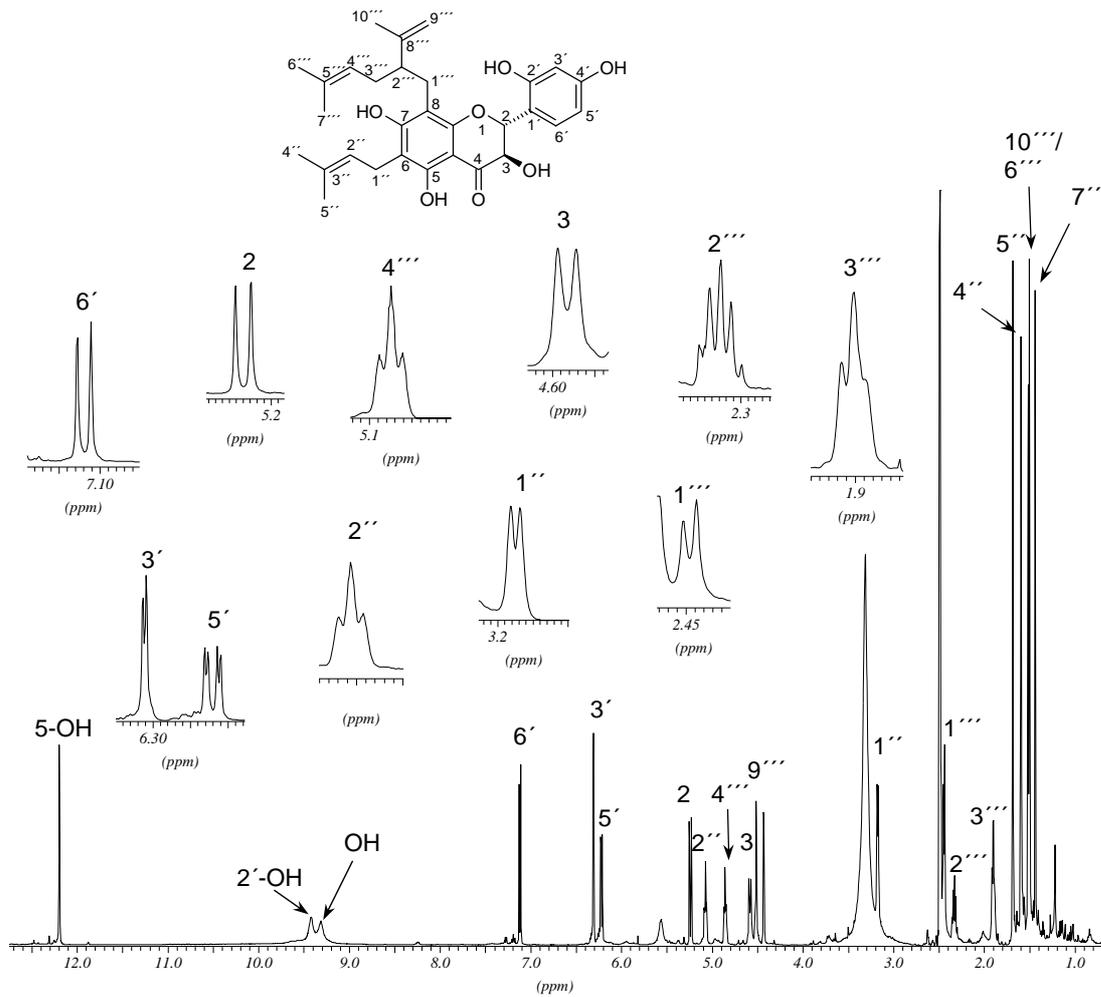


Abb. 101: ^1H -NMR-Spektrum von FL13 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Das Signal bei 12,20 ppm wurde der chelatisierten 5-Hydroxylgruppe zugeschrieben. Die Zuordnung der 2'-OH-Gruppe ergab sich aus einem Kreuzsignal zu C-1', das im HMBC-Spektrum (Abb. 103) erschien. Das Signal bei 9,31 ppm wurde ebenfalls einer Hydroxylgruppe zugeordnet, allerdings konnte deren Position nicht identifiziert werden. Auch im HMBC-Spektrum fehlte ein entsprechender Crosspeak, der eine Klärung diesbezüglich hätte bringen können.

Tab. 48: ^1H -NMR-Daten von FL13 (500 MHz, in DMSO-d_6) im Vergleich zu Kushenol M (75 MHz, in DMSO-d_6) nach RYU *et al.*, 1997; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
2	5,24 d (11,4)	5,28 d (11,3)	1'''	2,44 d (7,0)	2,49 m
3	4,58 d (11,4)	4,62 d (11,3)	2'''	2,33 m	2,35 m
3'	6,31 d (1,9)	6,35 d (2,2)	3'''	1,90 br t (6,7)	1,91 m
5'	6,22 dd (8,4; 1,9)	6,29 dd (8,4; 2,2)	4'''	4,85 br t (6,7)	4,84 t (6,6)
6'	7,12 d (8,4)	7,16 d (8,4)	6'''	1,50 s	1,48 s
1'''	3,17 d (6,3)	3,19 m	7'''	1,44 s	1,41 s
2'''	5,07 m	5,05 m	9'''	4,43 s 4,52 s	4,44 s 4,52 s
4'''	1,59 s	1,56 s	10'''	1,52 s	1,50 s
5'''	1,69 s	1,66 s	5-OH	12,20 s	12,16 s
			2'-OH	9,42 s	

Im ^{13}C -Spektrum (Abb. 101) erschienen für die Substanz 30 Signale, von denen die der Isopentenyl-Seitenkette zugehörigen aufgrund ähnlicher chemischer Umgebungen mit entsprechenden Kohlenstoffsignalen der Lavandulyl-Seitenkette sehr dicht beieinander lagen. Alle ^{13}C -Daten wurden im Vergleich zu denen von Kushenol M in Tab. 49 aufgelistet und stimmten mit diesen gut überein.

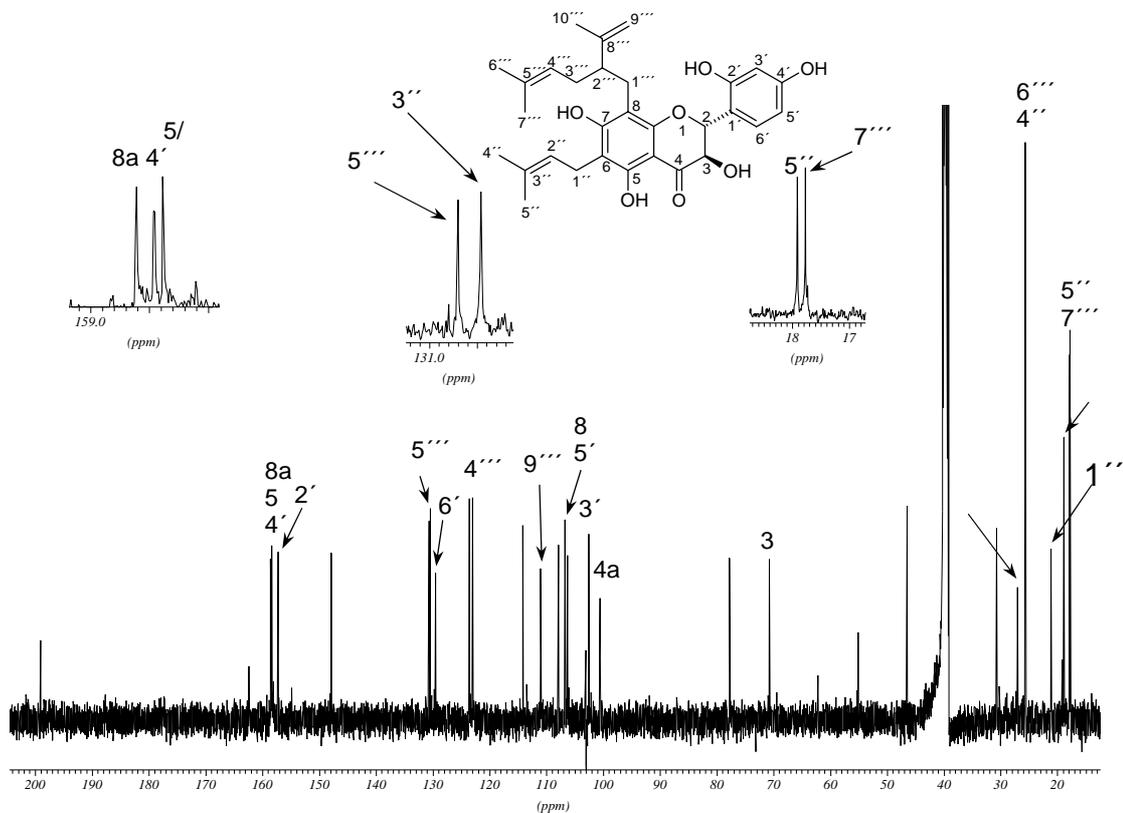


Abb. 102: ^{13}C -NMR-Spektrum von FL13 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Tab. 49: ^{13}C -NMR-Daten von FL13 (125 MHz, in DMSO-d_6) und von Kushenol M zum Vergleich (75 MHz, in DMSO-d_6) nach Ruy *et al.*, 1997; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
2	77,9	77,8	1''	21,3	21,2
3	70,1	70,9	2''	123,2	123,0
4	199,3	199,2	3''	130,6	130,5
4a	100,7	100,7	4''	25,8	25,7
5	158,6	158,4	5''	18,1	17,9
6	108,0	108,0	1'''	27,2	27,1
7	162,6	162,3	2'''	46,7	46,6
8	106,5	106,8	3'''	30,9	30,7
8a	158,8	158,7	4'''	123,8	123,6
1'	114,3	114,2	5'''	130,9	130,7
2'	157,5	157,3	6'''	25,8	25,7
3'	102,7	102,6	7'''	17,9	17,7
4'	158,6	158,5	8'''	148,0	147,9
5'	107,0	106,4	9'''	111,2	111,1
6'	129,7	129,6	10'''	19,0	18,9

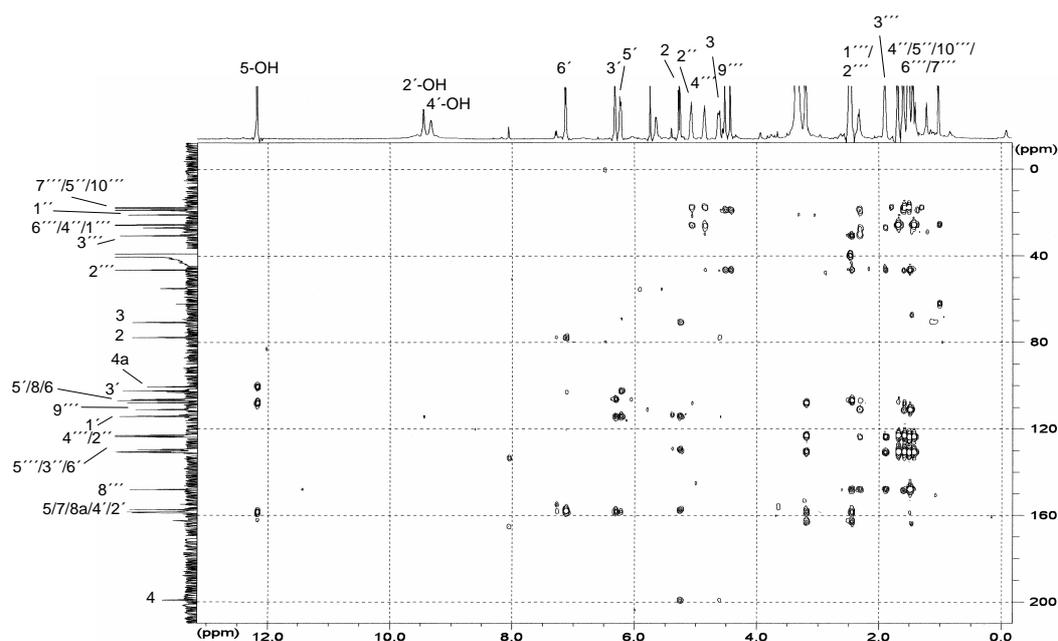


Abb. 103: HMBC-Spektrum von FL13 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d_6)

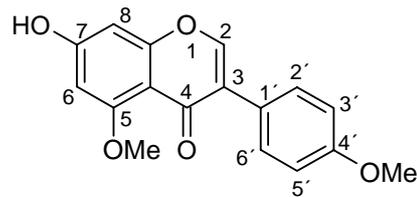
Nach CD-Messungen konnte eine 2S-Konfiguration der Verbindung erkannt werden. Das entsprechende Chromatogramm zeigte positive Cotton-Effekte bei 263 und 328 nm, sowie einen negativen Cotton-Effekt bei 280 nm.

Die optische Aktivität der Verbindung wurde mit $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +47,1^\circ$ ($c = 0,1$; in EtOH) bestimmt.

Der Inhaltsstoff FL13 wurde nach der Auswertung aller chromatographischen und spektralen Daten als Kushenol M identifiziert. Als Naturstoff aus *Sophora flavescens* war Kushenol M erstmals von Wu *et al.* (1985) beschrieben worden.

Isolierung von FL14 (Biochanin A)

(5,7-Dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on)



FL14 wurde aus der Grobfraktion IV mit einer Ausbeute von 1,1 mg isoliert.

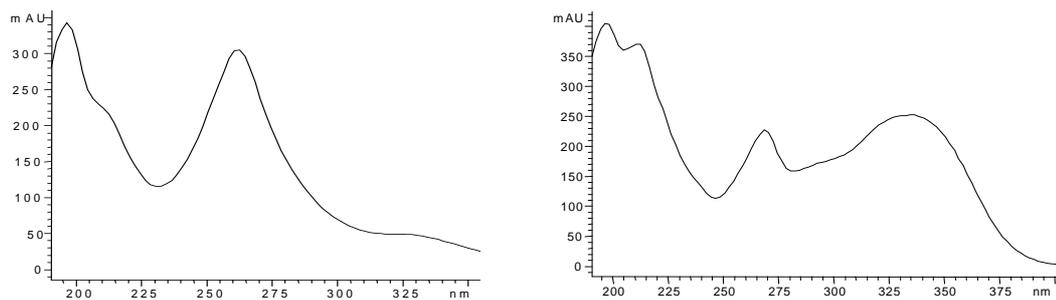


Abb. 104: UV-Spektren von FL14 und von Acacetin (beide in online in Acetonitril/Wasser aufgenommen)

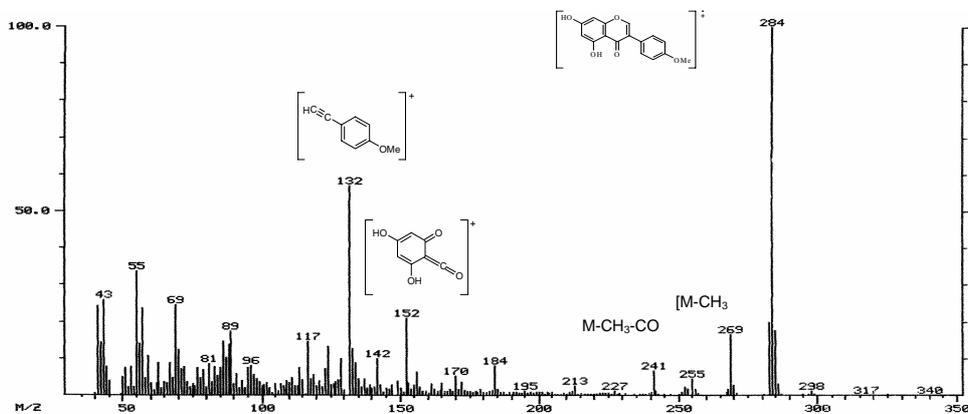


Abb. 105: EI-MS-Spektrum von FL14

Die anfängliche Vermutung nach Aufnahme des MS-Spektrums (Abb. 105), dass es sich bei der vorliegenden Substanz um Acacetin handeln könnte, wurde durch das online aufgenommene UV-Spektrum mit authentischer Reinsubstanz (Abb. 104) widerlegt. Das UV-Spektrum von Acacetin zeigte Maxima bei 210 nm, 269 nm und 334 nm. Im Vergleich dazu wurde ein UV-Chromatogramm von Biochanin A aufgenommen, das ebenfalls als authentische Reinsubstanz vorlag. Im Chromatogramm erschienen Maxima bei 198 nm und 262 nm, dazu lediglich eine Schulter bei 326 nm. Die Werte von Biochanin A stimmten mit denen der zu untersuchenden Probe genau überein. Die Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums untermauerten das Vorliegen von Biochanin A. Dabei bildeten die Protonen H-2' und H-6', sowie H-3' und H-5' zwei Dubletts, die zusammen das Spinsystem eines AA'BB'-Aufspaltungsmusters ausmachten. Die Signallage des H-2 bei 8,25 ppm war typisch für das Vorliegen eines Isoflavons (MABRY, 1970).

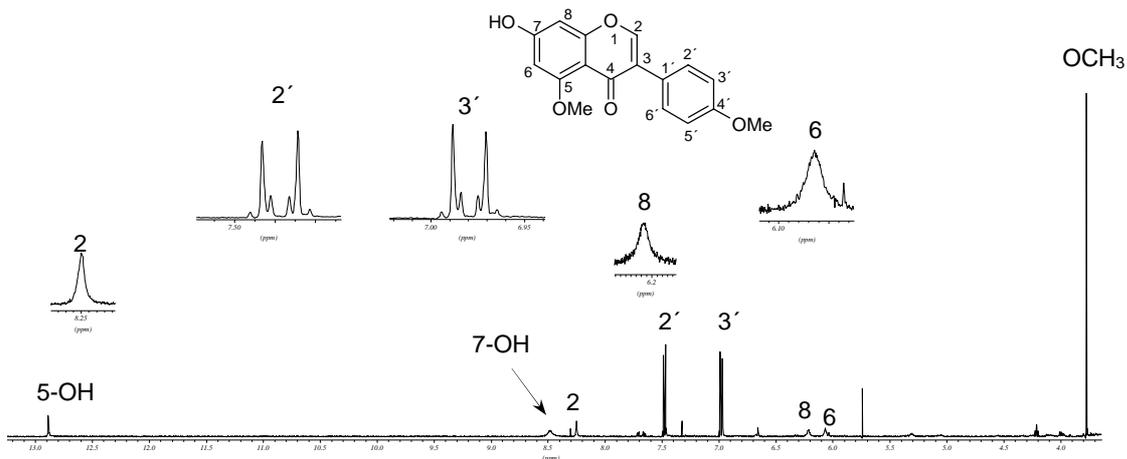


Abb. 106: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FL14 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Biochanin A ist das einzige im Rahmen dieser Arbeit im Drogenmaterial von *Sophora flavescens* nachgewiesene Isoflavon. Der Inhaltsstoff ist zwar in der Familie der Leguminosae weit verbreitet, bisher wurde aber von der Isolierung der Substanz aus Kushi noch nicht berichtet.

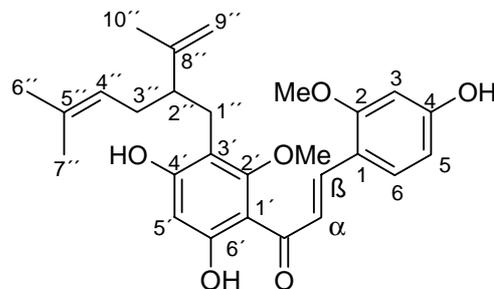
Die chemische Synthese des Isoflavons gelang bereits im Jahr 1953 (BAKER *et al.*), während die Isolierung aus *Chana germ.* zum ersten Mal bereits 1945 von SIDDIQUI *et al.* in der Literatur beschrieben wird. Als Synonyme werden die Namen Olmelin, Pratensol oder Genistein-4'-methylether verwendet.

5.2.3 Isolierungen und Strukturaufklärung von Chalkonen und weiteren Inhaltsstoffen

Die drei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Chalkonderivate unterschieden sich in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten bereits während der Isolierungen deutlich von den anderen Flavonoiden. Noch in sehr geringer Konzentration vermochten die Substanzen ethanolische oder Acetonitril/Wasser-Gemische extrem gelb zu färben.

Isolierung von CH1 (Kushenol D)

(2',4,4'-Trihydroxy-5'-lavandulyl-2,6'-dimethoxychalkon)



Das Chalkonderivat CH1 fiel in der Grobfraction VII mit einer Ausbeute von 7,7 mg an. Bereits im UV-Spektrum (Abb. 107) fiel auf, dass diese Substanz ein anderes Grundgerüst als die zuvor diskutierten Stoffe haben musste. Mit Maxima bei 202 und 390 nm und Schultern bei 253 und 315 nm hatte es Ähnlichkeiten zu Spektren von Chalkonen (MABRY, 1970).

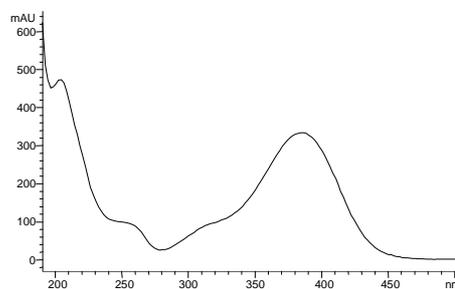


Abb. 107: UV-Spektrum von CH1

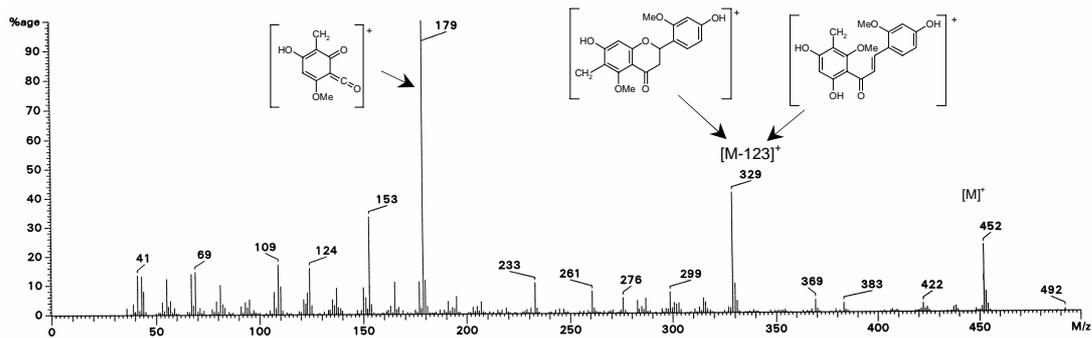


Abb. 108: EI-MS-Spektrum von CH1

Das Massenspektrum (Abb. 108) zeigte deutlich den Molpeak bei m/z 452. Das Fragmentierungsmuster glich denen der Flavanonderivate. Aufgrund der Strukturähnlichkeiten ist dies nicht verwunderlich. Gemäß des von Stevens *et al.*, 1997 vorgeschlagenen Fragmentierungsschema für das Chalkon Xanthohumol könnte der A-Ring eine Drehung um die C-1'/Carbonylkohlenstoff-Bindung erfahren, so dass die Hydroxylgruppe an C-6' mit dem β -C-Kern einen Ringschluss unter Ausbildung des C-Ringes bildet. Somit entstünde das entsprechende Flavanonderivat, das dann in weitere Bruchstücke zerfallen könnte, z.B. m/z 179 als RDA-Produkt des A-Ringes.

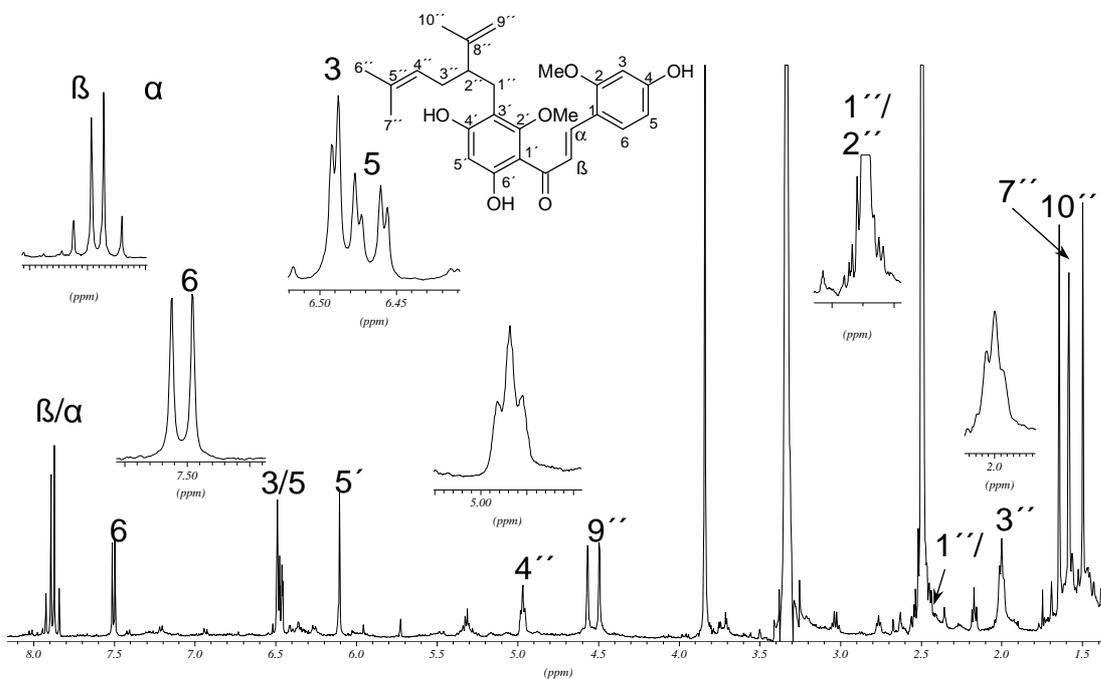


Abb. 109: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von CH1 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten die typischen Signale einer Lavandulyl-Seitenkette, sowie für einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten erkannt werden. Im

Spektrum von CH1 fielen zwei miteinander koppelnde Dubletts bei 7,85 und 7,90 ppm auf, die charakteristisch für Chalkone sind (MABRY, 1970). Mit ihrer Kopplungskonstante von 15,6 Hz wurde deutlich, dass die beiden olefinischen Protonen *trans* zueinander standen. Normalerweise würde man erwarten, dass sich die Signale von H- α und H- β aufgrund des -M-Effektes der Carbonylgruppe in ihrer chemischen Verschiebung stark voneinander unterscheiden. Dieser Effekt wird aber offensichtlich bei den Chalkonen durch den zusätzlichen aromatischen Substituenten an C- β nahezu vollständig aufgehoben.

Tab. 50: ^1H -NMR-Daten von CH1 (500 MHz, in DMSO- d_6) im Vergleich zu Kushenol D (90 MHz, in Pyridin- d_5) nach Wu *et al.*, 1985; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend; n.a.= nicht angegeben

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
3	6,48 d (2,3)	6,73 d (2,5)	7''	1,49 s	1,61 s
5	6,45 dd (8,5; 2,3)	6,80 dd (9,0; 2,5)	9''	4,56 s 4,49 s	4,92 br s
6	7,50 d (8,5)	7,75 d (9,0)	10''	1,58 s	1,64 s
5'	6,10 s	6,28 s	α	7,85 d (15,6)	8,30 d (15,0)
1''	2,42-2,55 m	n.a.	β	7,90 d (15,6)	8,70 d (15,0)
2''	2,42-2,55 m	n.a.	OCH₃	3,83 s (2x)	3,71 s 3,69 s
3''	1,99 br t (6,9)	n.a.	4-OH	10,23 s	n.a.
4''	4,96 br t (6,9)	5,35 br t (7,0)	4'-OH	10,52 s	n.a.
6''	1,64 s	1,98 s	6'-OH	14,78 s	14,38 s

Zudem enthielt die Verbindung zwei Methoxygruppen, denn die Integration des zugehörigen Signals bei 3,83 ppm zeigte sechs Protonen an. Deren Lokalisation konnte aufgrund des HMBC-Spektrums (Abb. 111) nur indirekt erfolgen, nachdem die Positionen der drei ebenfalls in CH1 enthaltenen Hydroxylgruppen zugeordnet werden konnten. Das im ^1H -NMR-Spektrum bei 14,78 ppm erscheinene Singulett war der chelatisierten OH-Gruppe von C-6' zugehörig. Dies konnte einerseits aus der Tieffeldlage des Signals, andererseits mittels eines Kreuzsignals zum C-1' gezeigt werden. Die 4-OH-Gruppe mit breitem Singulett-signal bei 10,23 ppm korrelierte mit C-3, C-4 und C-5, daneben wies 3'-OH (mit Singulett bei 10,54 ppm) einen Crosspeak zu C-3 auf. Die weiteren beiden quartären C-Atome, die im ^{13}C -Spektrum im Tieffeldbereich von 160-166 ppm zur Resonanz kamen (C-2 und C-2'), hatten also jeweils eine Methoxygruppe gebunden.

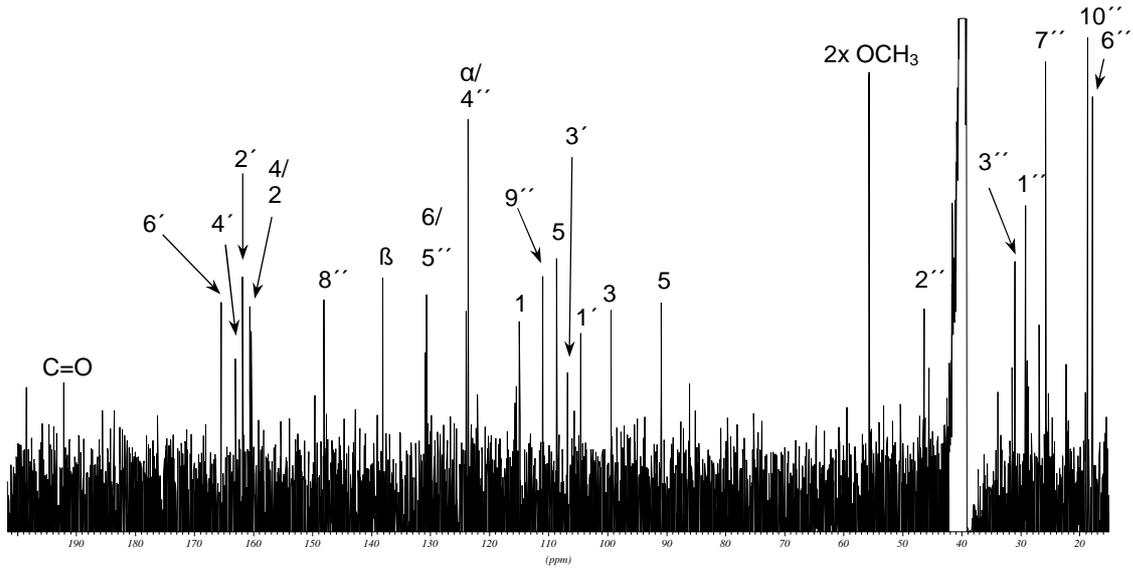


Abb. 110: ^{13}C -NMR-Spektrum von CH1 (125 MHz, in DMSO-d_6)

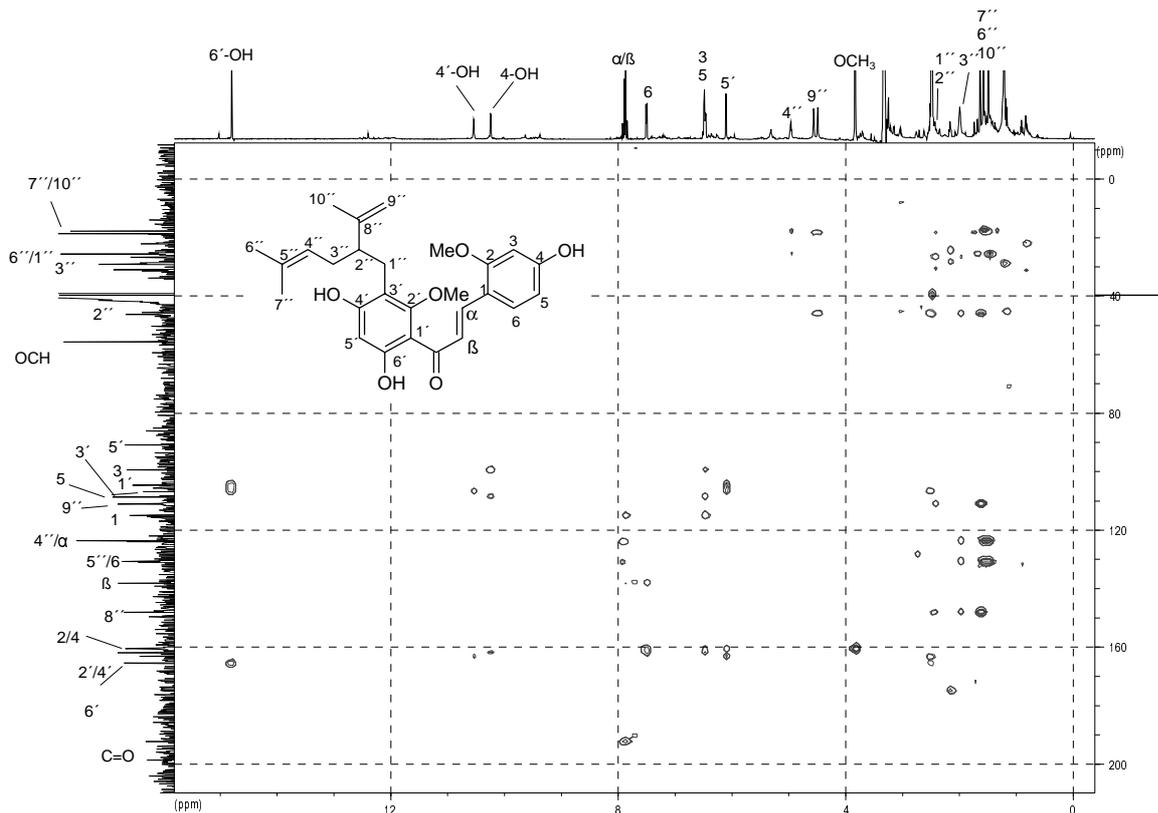


Abb. 111: HMBC-Spektrum von CH1 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d_6)

Die gemessenen ^{13}C -Werte stimmten sehr gut mit den Literaturwerten von Kushenol D überein, obwohl unterschiedliche Lösungsmittel zum Einsatz gekommen waren. Allerdings mussten die Zuordnungen für C-1 und C-3', sowie für C- α und C-6, die Wu *et al.* getroffen hatten, korrigiert bzw. vertauscht

werden. Dies ging aus entsprechenden Korrelationen im HMBC-Spektrum (Abb. 111) eindeutig hervor. H- α korrelierte mit C-1, ebenso zeigten sich Kreuzsignale von H-3 und H-5 zu C-1, sowie von H-5' zu C-3'. Die Korrektur von C- α und C-6 ging aus mehreren Literaturquellen hervor. C- α fand sich stets mit chemischen Verschiebungen von ca. 120-125 ppm (PELTER *et al.*, 1976; STEVENS *et al.*, 1997; RYU *et al.*, 1997), im Gegensatz zum Literaturwert von WU mit 130,3 ppm. Im Anschluss daran ergab sich die Korrektur des Wertes für C-6. Allein auf der Basis des HMBC-Spektrums wäre eine Zuordnung für C- α und C-6 nicht möglich gewesen.

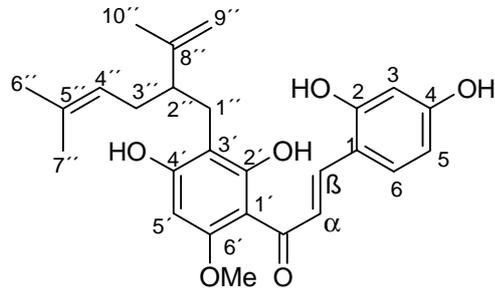
Damit konnte die Struktur von CH1 eindeutig als Kushenol D aufgeklärt werden. Das Chalkon war zuvor von WU *et al.* (1985) aus *Sophora flavescens* isoliert worden. Unsere ^1H - und ^{13}C -NMR-Werte sind in Tab. 50 und Tab. 51 den Literaturwerten gegenübergestellt.

Tab. 51: ^{13}C -NMR-Daten von CH1 (125 MHz, in DMSO- d_6) im Vergleich zu Kushenol D (22,5 MHz, in Pyridin- d_5) nach WU *et al.*, 1985; δ in [ppm]

C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)	C-Atom	^{13}C	^{13}C (Lit.)
1	115,4	108,8	2''	46,3	47,2
2	160,6	161,7	3''	31,0	31,9
3	99,4	99,9	4''	124,0	124,6
4	160,3	161,1	5''	130,9	130,8
5	108,6	108,8	6''	17,9	17,8
6	130,7	125,5	7''	25,8	25,6
1'	104,6	108,2	8''	148,0	149,2
2'	161,8	162,7	9''	111,0	110,7
3'	106,8	117,0	10''	18,7	19,1
4'	163,8	164,0	α	123,6	130,3
5'	90,9	91,6	β	138,1	138,3
6'	165,5	166,7	C=O	192,1	193,5
1''	29,2	27,8	OCH ₃	55,7	55,7

Isolierung von CH2 (Kuraridin)

2,2',4,4'-Tetrahydroxy-5'-lavandulyl-6'-methoxychalkon



CH2 wurde mit einer Ausbeute von 0,5 mg aus der Grobfraction VI erhalten. Wie das UV-Spektrum (Abb. 112) zeigte, handelte es sich auch in diesem Fall um ein Chalkonderivat.

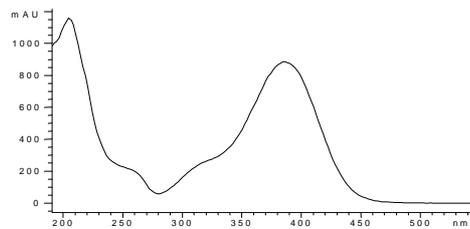


Abb. 112: UV-Spektrum von CH2

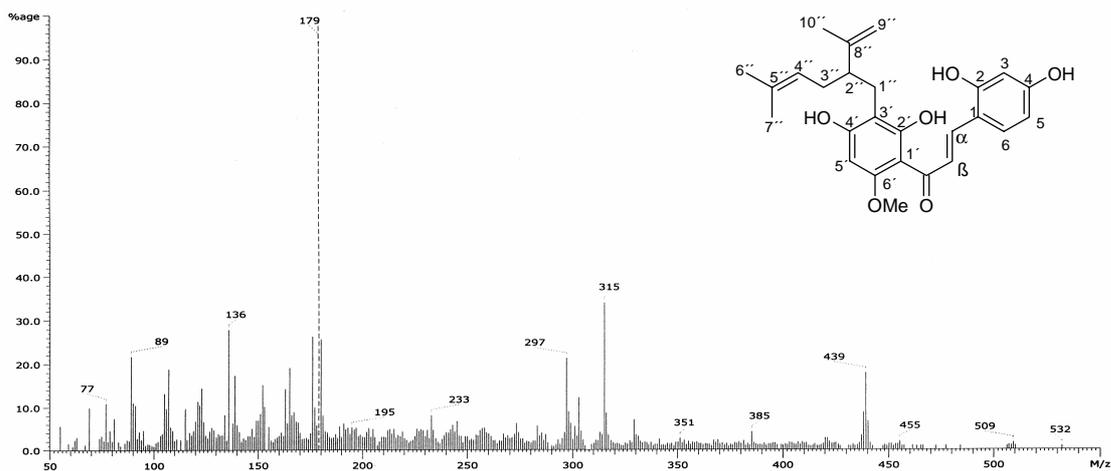


Abb. 113: FAB-Massenspektrum von CH2 (mit NBA als Trägersubstanz)

Im FAB-MS-Spektrum erschien der Pseudomolekülpeak bei m/z 439 ($[M+1]^+$). M/z 315 zeigte das Fragment, das nach Abspaltung einer Lavandulylgruppe

($[M-123]^+$) zustande kam. Den Basispeak bei m/z 179 stellte ein RDA-Fragment des A-Ringes.

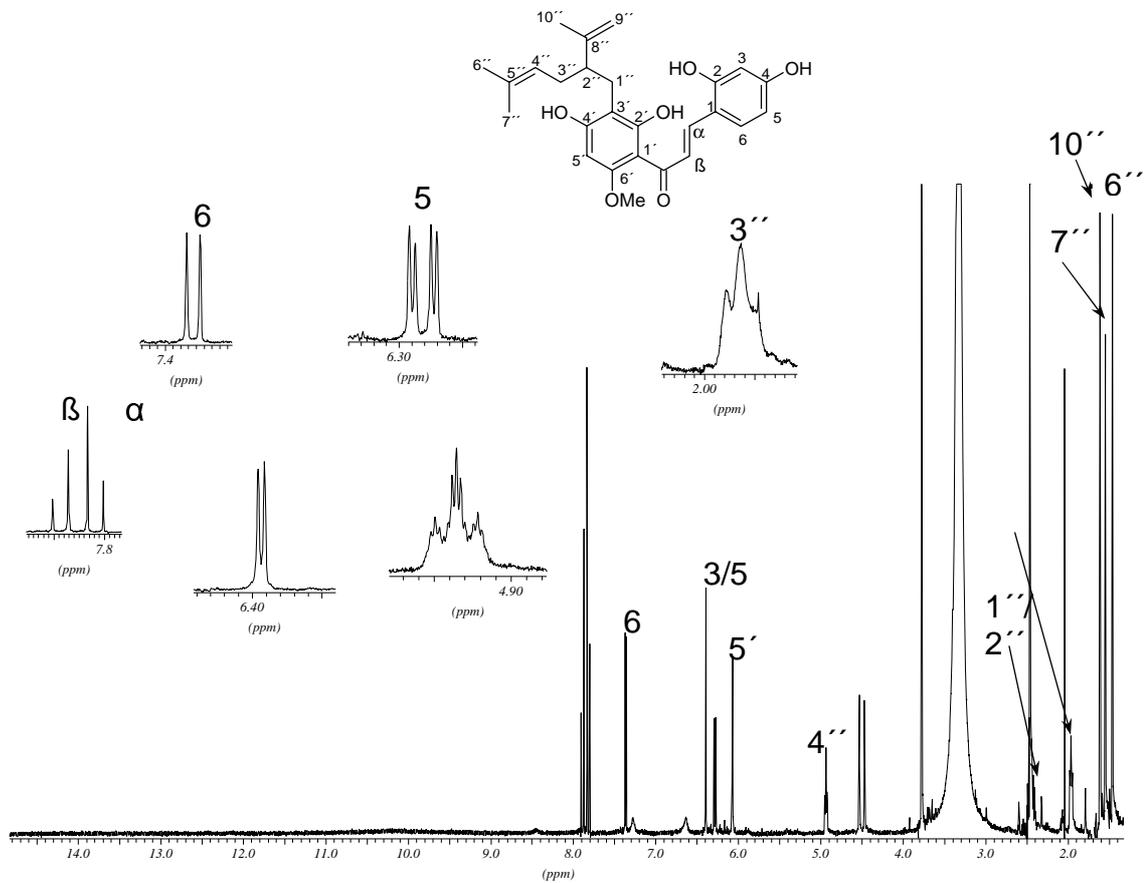


Abb. 114: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von CH2 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von CH2 zeigte große Ähnlichkeiten zu dem von CH1. Der Unterschied bestand lediglich darin, dass im Spektrum kein Singulett für eine chelatisierte Hydroxygruppe auftauchte. Zudem zeigte das Singulett bei 3,82 ppm nach Integration lediglich drei Protonen. Alle anderen Signale des Spektrums entsprachen denen von CH1. Aufgrund der geringen Ausbeute der Substanz konnten keine weiteren Spektren aufgenommen werden. Nach Literaturvergleichen konnte die Verbindung dennoch zweifelsfrei als Kuraridin identifiziert werden.

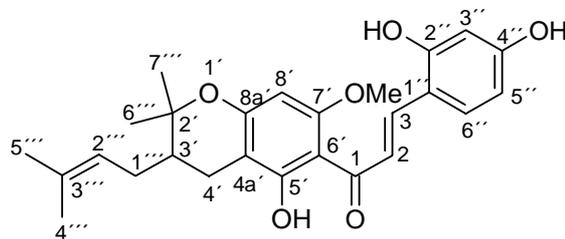
Tab. 52: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von CH2 (500 MHz, in DMSO-d_6) im Vergleich zu Kuraridin (500MHz, in DMSO-d_6) Nach Ryu *et al.*, 1997; δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

H-Atom	^1H	^1H (Lit.)	H-Atom	^1H	^1H (Lit.)
3	6,36 d (2,4)	6,37 d (2,2)	4''	4,96 m	4,95 m
5	6,30 dd (8,6; 2,4)	6,30 dd (8,4; 2,2)	6''	1,64 s	1,64 s
6	7,41 d (8,6)	7,20 d (8,4)	7''	1,50 s	1,49 s
5'	6,01 s	6,03 s	9''	4,49 s 4,56 s	4,49 s 4,56 s
1''	2,48 m	2,50 m	10''	1,58 s	1,58 s
2''	2,44 m	2,45 m	α	7,84 d (15,6)	7,84 d (15,5)
3''	1,99 m	2,00 m	β	7,92 d (15,6)	7,94 d (15,5)
			OCH_3	3,82 s	3,85 s

Kuraridin wurde erstmalig von HATAYAMA *et al.* (1971) als Inhaltsstoff von *Sophora flavescens* beschrieben.

Isolierung von CH3

(3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-[5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-3-(3-methylbut-2-enyl)-chroman-6'-yl]-propenon)



Die Isolierung von CH3 gelang mit einer Ausbeute von 2 mg aus der Grobfraction V. Bereits das UV-Spektrum (Abb. 115) ließ vermuten, dass es sich wieder um ein Chalkonderivat handelte.

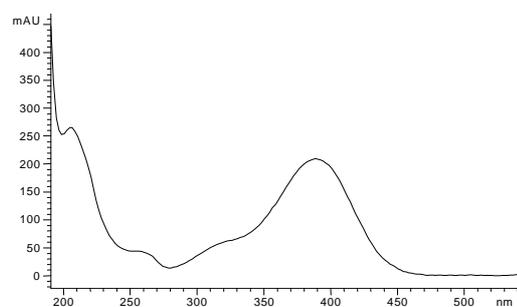


Abb. 115: UV-Spektrum von CH3

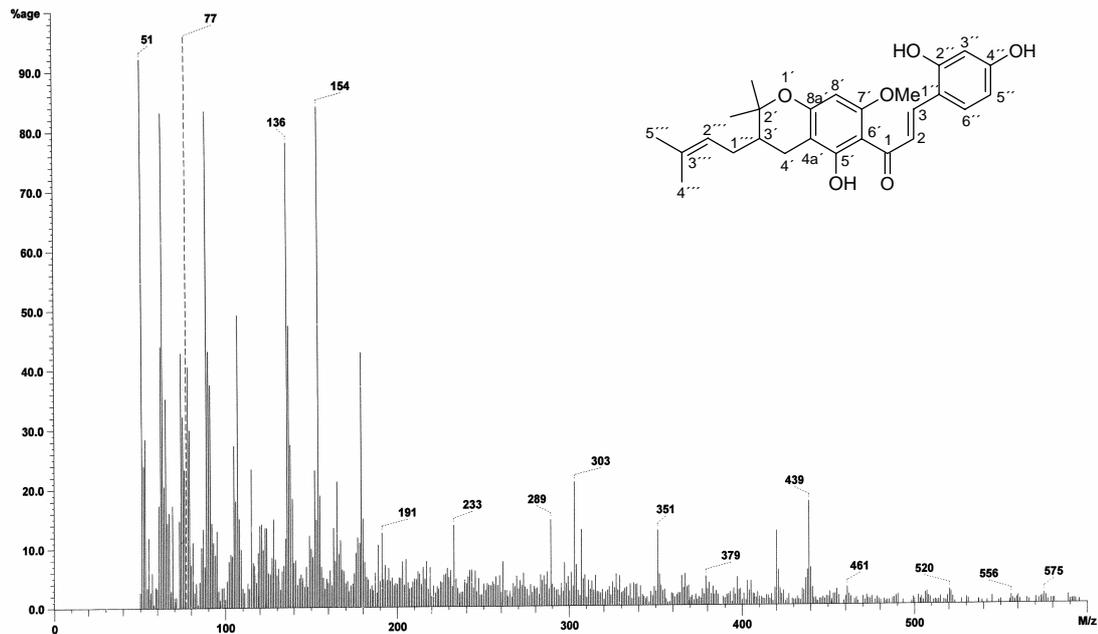


Abb. 116: FAB-Massenspektrum von CH3 (mit NBA als Trägersubstanz)

Das FAB-Massenspektrum (Abb. 116) zeigte ein Pseudomolekülion bei m/z 439 ($[M+1]^+$). Bereits in diesem Massenspektrum tauchten Unterschiede zu den bisher diskutierten Chalkonen auf. Da das Fragment m/z 123 nur mit recht geringer Intensität auftrat und auch das Molekülbruchstück bei m/z 315 ($[M-123]^+$), das die Abspaltung einer Lavandulyl-Seitenkette anzeigt, nicht sehr deutlich zu erkennen war, konnte deren Anwesenheit bereits nahezu ausgeschlossen werden. Bei m/z 421 zeigte sich ein Fragment, dass die Eliminierung von Wasser ($[M+H-H_2O]^+$) andeutete. Das Fragment m/z 351 ist auf die anschließende Abspaltung von 69 Masseneinheiten (dies entspricht der Abspaltung eines Isopentenyl-Restes) zurückzuführen.

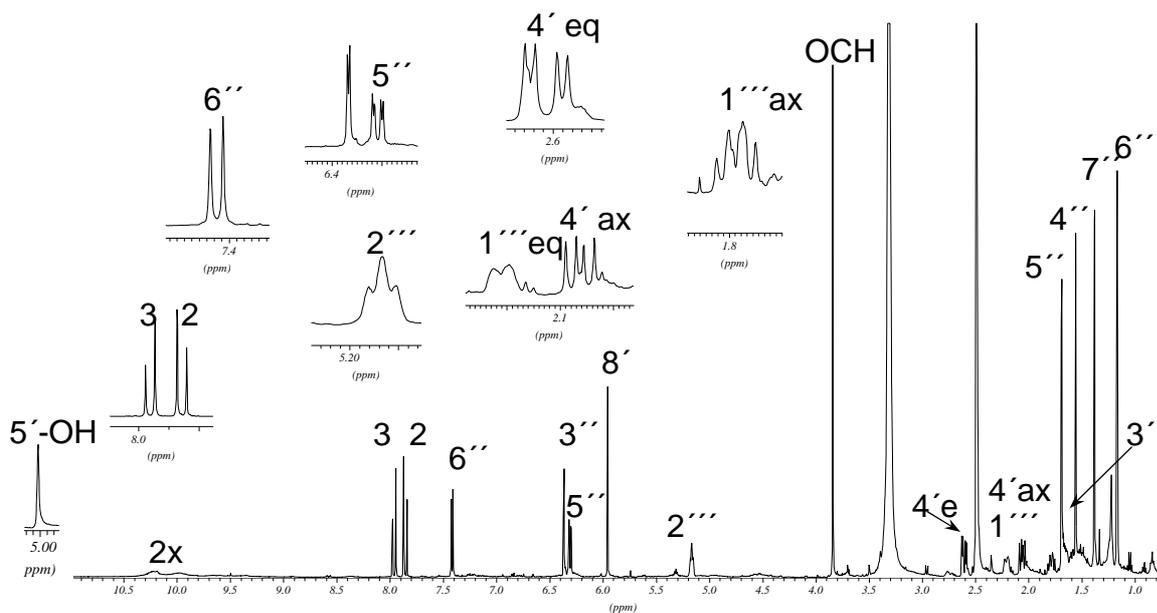


Abb. 117: ^1H -NMR-Spektrum von CH3 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Das ^1H -NMR-Spektrum bestätigte die bisherigen Aussagen zur Struktur- aufklärung von CH3. Im Tieffeld bei 8,00 und 8,06 ppm erschienen die für Chalkonderivate typischen Dubletts des H-2 und H-3 mit einer Kopplungs- konstante von 15,6 Hz. Der B-Ring zeigte eine 1,2,4-Trisubstitution. Eine Lavandulyl-Seitenkette war nicht vorhanden.

Weiterhin fiel auf, dass zum einen die Singuletts der endständigen Exomethylengruppe (H-6'') im Bereich von 4,6 - 4,8 ppm fehlten, zum anderen zeigten sich im Hochfeldbereich vier anstatt drei Singulettsignale für Methyl- gruppen. Zwei Singulettsignale bei 1,65 und 1,78 ppm wurden den Protonen H₃-4''' und H₃-5''' zugeordnet und wiesen damit chemische Verschiebungen auf, wie sie bereits bei Isopentenyl-Seitenketten zuvor beobachtet worden waren. Die anderen Singuletts bei 1,27 und 1,47 ppm traten bisher nicht auf. Sie zeigten im HMBC-Spektrum sowohl eine Korrelation zueinander als auch zu einem quartären C-Atom bei 79,5 ppm (C-2'). Aufgrund dieser Befunde ergab sich, dass es sich um geminale Methylgruppen handelte, die an ein sauerstoff- substituiertes quartäres C-Atom gebunden waren.

Fünf Multipletts im Bereich von 1,6-2,7 ppm waren mit ihrem Aufspaltungs- muster in Protonenspektren bei allen anderen isolierten Substanzen bisher

noch nicht beobachtet worden. Aufgrund der chemischen Verschiebung dieser Multipletts musste es sich um aliphatische Protonen handeln.

Tab. 53: ^1H -NMR-Daten von CH3 (500 MHz, in DMSO- d_6)

H-Atom	^1H	H-Atom	^1H
2	8,00 d (15,6)	1'''ax	1,9 m
3	8,06 d (15,6)	1'''eq	2,31 m
3'	1,75 m	2'''	5,24 m wie br t
4'ax	2,2 dd (16,7; 9,9)	4'''	1,65 s
4'eq	2,75 dd (16,7; 5,4)	5'''	1,78 s
8'	5,98 s	6'''	1,27 s
3''	6,39 d (2,3)	7'''	1,47 s
5'''	6,37 dd (8,6; 2,3)	5'-OH	15,00 s
6'''	7,43 d (8,6)	OCH₃	3,92 s

Zur Lokalisierung der Protonen H3', H4' und H1''' wurde ein $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum herangezogen. Abb. 118 zeigt den dafür wichtigen Ausschnitt mit entsprechenden Kreuzsignalen. Es waren Korrelationen zwischen H-3', H-4'ax, H-4'eq, H-1'''ax und H-1'''eq zu erkennen.

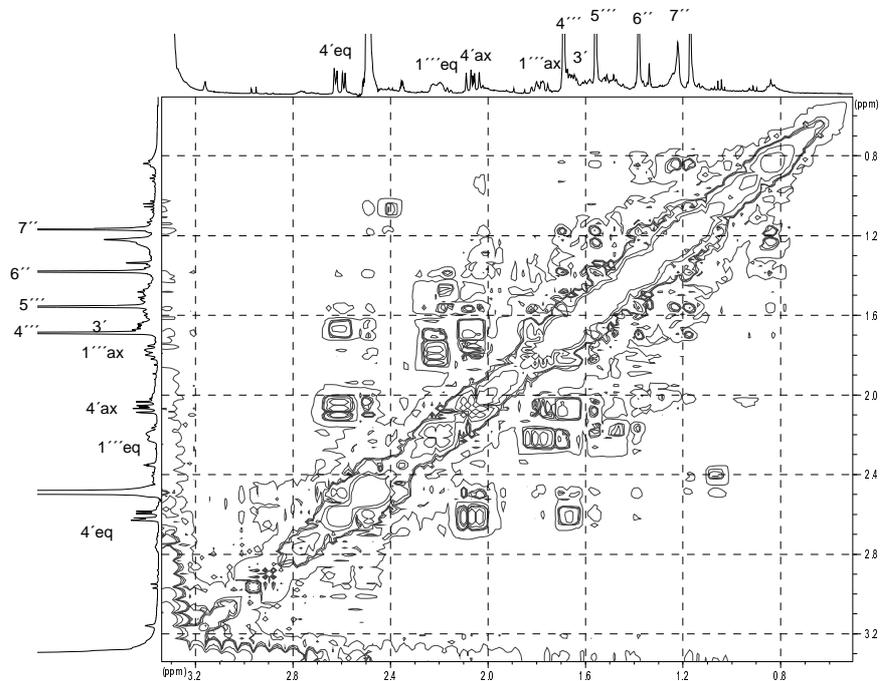


Abb. 118: Ausschnitt des $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrums von CH3 (500MHz, in DMSO- d_6)

Die Art der Substitution im A-Ring wurde durch Auswertung der Kopplungen im HMBC-Spektrum (Abb. 119) erhalten. Das chelatisierte phenolische Proton der Hydroxylgruppe, 5'-OH, (im ^1H -Spektrum als Singulett mit einer chemischen Verschiebung bei 15 ppm) zeigte Korrelationen zu C-4a', C-5' und C-6' (164,8; 105,1 und 101,7 ppm). C-5' korrelierte zusätzlich mit H-4'eq. Die letztere Korrelation war ein Indiz dafür, dass der Dihydropyranring über C-4a' verknüpft sein musste. Somit war das Singulett bei 5,98 ppm im ^1H -Spektrum dem Proton des C-8' (91,8 ppm) zuzuordnen. Im HMBC-Spektrum waren neben der Direktkorrelation C-8'/H-8' Kreuzsignale von H-8' zu C-7', C-8a', C6' und C-4a' zu erkennen. C-4a' korrelierte zudem mit H-4'ax und H-4'eq.

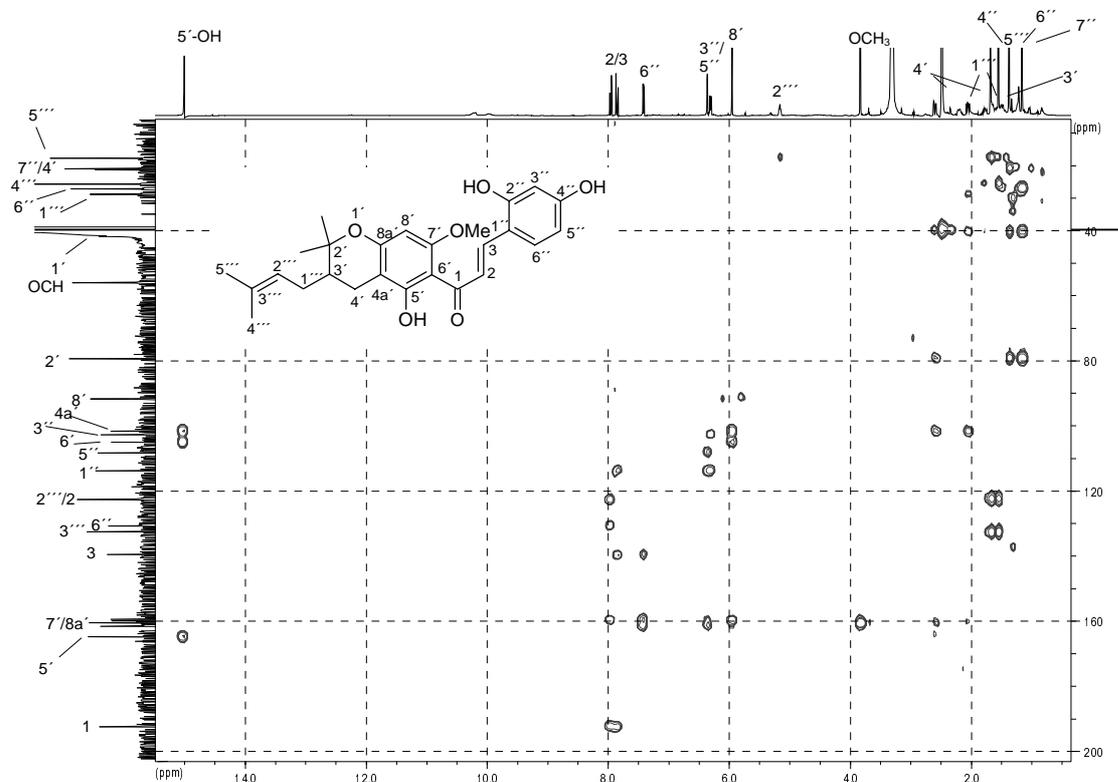


Abb. 119: HMBC-Spektrum von CH3 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d_6)

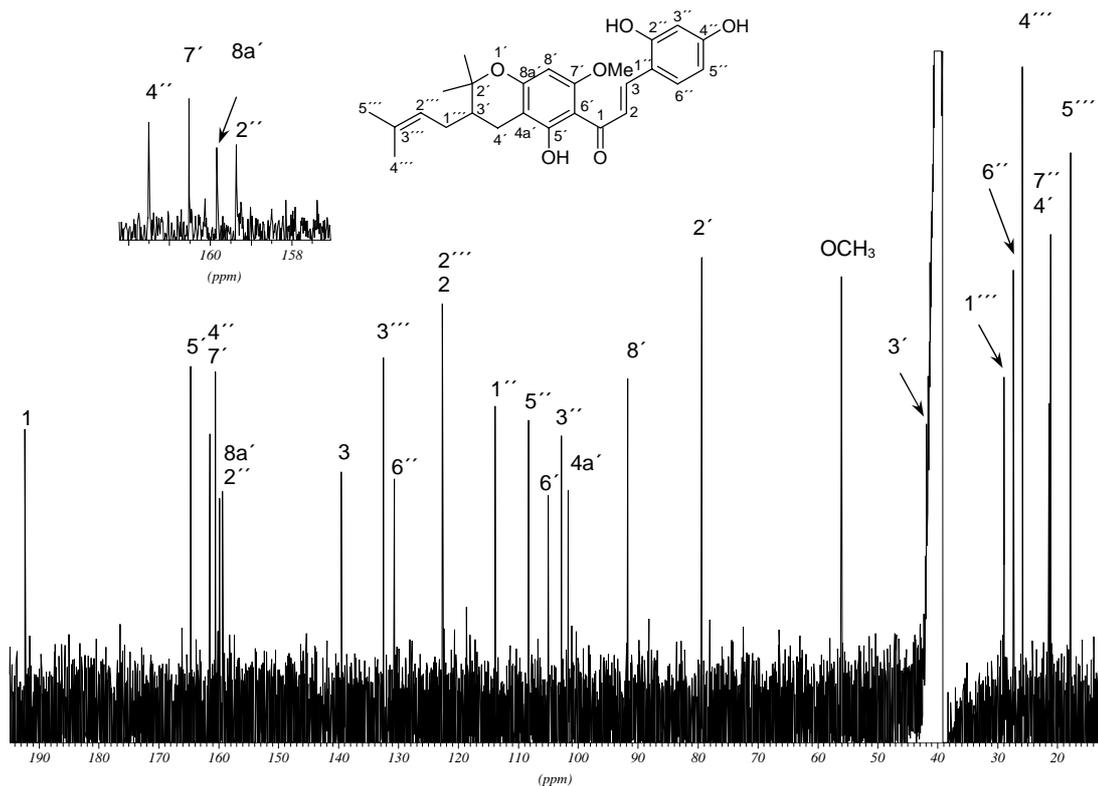


Abb. 120: ^{13}C -NMR-Spektrum von CH3 (125 MHz, in DMSO-d_6)

Im ^{13}C -NMR-Spektrum wirkte sich der Ringschluss unter anderem auch auf die Signallage des C-3' und des C-4' aus. Die Signale erfuhren einen Hochfeldshift um ca. 4 ppm im Vergleich zum Vorliegen innerhalb einer Lavandulyl-Seitenkette. Wie man im HMBC-Spektrum erkennen konnte, war das Signal von C-3' unter dem des Lösungsmittels verborgen.

Abb. 121 zeigt die ^{13}C -Daten des Dihydropyranringes als Substruktur mit seinen Substituenten im Vergleich zu Literaturwerten. Dabei war eine große Übereinstimmung zu sehen.

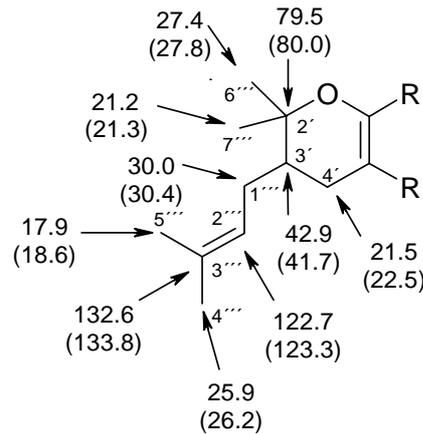


Abb. 121: ^{13}C -NMR-Daten des 2,2-dimethyl-3-(3-methyl-2-butenyl)-dihydropyranringes (125 MHz, in DMSO-d_6) im Vergleich zu Daten der Substruktur von IINUMA *et al.*, 1994, (75 MHz, in Aceton-d_6); δ in ppm; Vergleichsdaten in Klammern

Tab. 54: ^{13}C -NMR-Daten von CH_3 (125 MHz); (a): Methanol- D_4 als Solvens; (b): DMSO-d_6 als Solvens

C-Atom	^{13}C (a)	^{13}C (b)	C-Atom	^{13}C (a)	^{13}C (b)
1	195,2	194,4	2''	160,9	159,5
2	125,5	122,8	3''	103,7	102,9
3	140,8	139,6	4''	160,9	161,6
2'	80,8	79,5	5''	109,4	108,4
3'	42,9	40,9	6''	132,2	130,8
4'	23,1	21,5	1'''	30,8	30,0
4a'	104,1	101,7	2'''	124,1	122,7
5'	162,8	164,8	3'''	134,5	132,6
6'	104,1	105,1	4'''	26,5	25,9
7'	107,1	160,6	5'''	18,4	17,9
8'	93,3	91,8	6'''	28,3	27,4
8a'	166,5	159,9	7'''	22,0	21,2
1''	116,6	113,9	OCH_3	55,6	55,1

Aus den MS- und NMR-Daten konnte gefolgert werden, dass die Lavandulylgruppe, die sich bei Flavonoiden aus *Sophora flavescens* häufig findet, durch Addition an die angrenzende Hydroxylgruppe an C-8a' unter Ausbildung eines 2,2-Dimethyl-3-(3-methylbut-2-enyl)-chromanringes zyklisiert war.

Gemäß dem in der Abb. 122 dargestellten Mechanismus könnte es sich um ein Artefakt von Kuraridin (CH_2) handeln. Grundsätzlich kann man das Vorliegen eines Artefaktes nicht ausschließen, da bedingt durch das Erhitzen bei der Herstellung eines Soxhletextraktes diese Möglichkeit besteht.

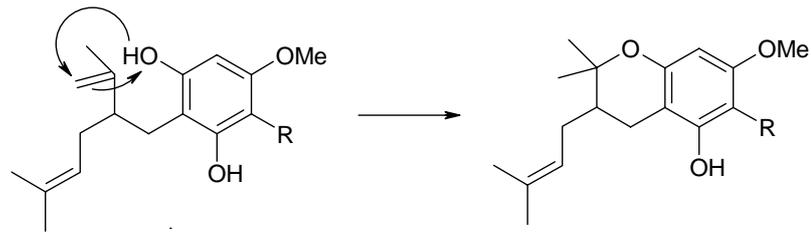


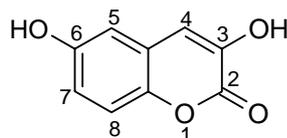
Abb. 122: Denkbare Mechanismus zur Bildung einer Chromanstruktur

Gegen die Möglichkeit, dass es sich bei CH3 um ein Artefakt handelt spricht die Tatsache, dass eine ähnliche Cyclisierung, bei FL4 bis FL13 (mit Ausnahme von FL10 und FL11) zwischen der Exomethylengruppe der Lavandulyl-Seitenkette und der freien Hydroxylgruppe an C-7 möglich wäre, nie beobachtet wurde. Zudem findet sich im HPLC-Chromatogramm des DCM-Extraktes ein Peak mit entsprechender Retentionszeit, der ein ähnliches UV-Chromatogramm besitzt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der vorliegenden Substanz CH3 um einen neuen Naturstoff handelt, der genuin in der Droge vorhanden ist. Als Trivialnamen für 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-[5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-3-(3-methylbut-2-enyl)-chroman-6-yl]-propenon schlagen wir Kushenchroman A vor.

In der Literatur wurde von einem in dieser Art vorkommenden 6,6-Dimethyl-4-(3-methyl-2-butenyl)-dihydropyranring bisher aus *Sophora leachiana* (IINUMA *et al.*, 1991) und aus *Sophora exigua* (IINUMA *et al.*, 1994) berichtet, allerdings handelte es sich dort um eine Substruktur von Flavanonderivaten. Die Frage, ob es sich um ein Artefakt oder genuinen Inhaltsstoff handelte, wurde in den Publikationen nicht diskutiert.

Isolierung von CU1

(3,6-Dihydroxycumarin)



Die Substanz zeigte eine charakteristische blaue Fluoreszenz, die nicht nur auf der DC-Folie, sondern auch schon im Acetonitril-Wasser Gemisch direkt nach der Isolierung per MPLC auffiel. Die UV-Absorptionsmaxima (Abb. 123)

deuteten auf ein Cumarin-Derivat hin, zu dem die beobachtete Fluoreszenz gut passte.

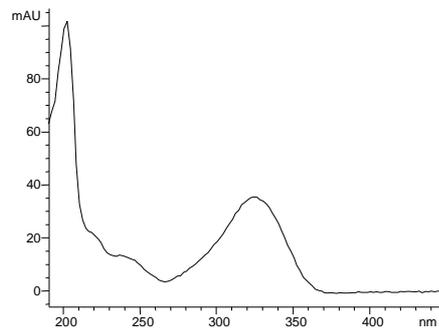


Abb. 123: UV-Spektrum von CU1

Das MS-Spektrum (Abb. 124) wurde geprägt vom Molpeak bei m/z 178. Da nur wenige Fragmente mit jeweils geringen Intensitäten in Erscheinung traten, war davon auszugehen, dass das Grundgerüst der Verbindung relativ stabil sein musste.

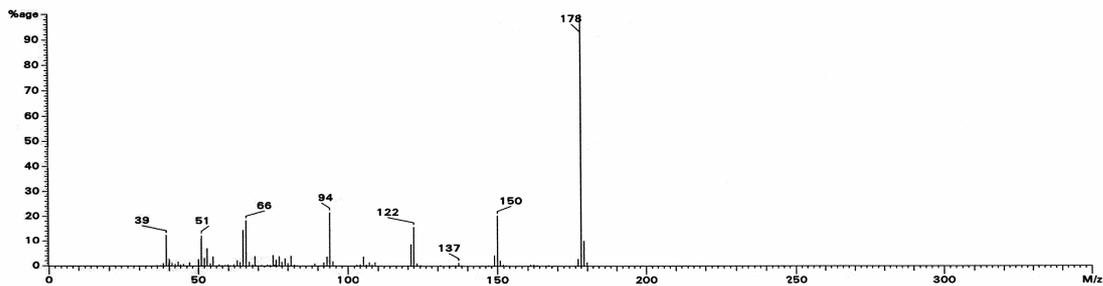


Abb. 124: EI-MS-Spektrum von CU1

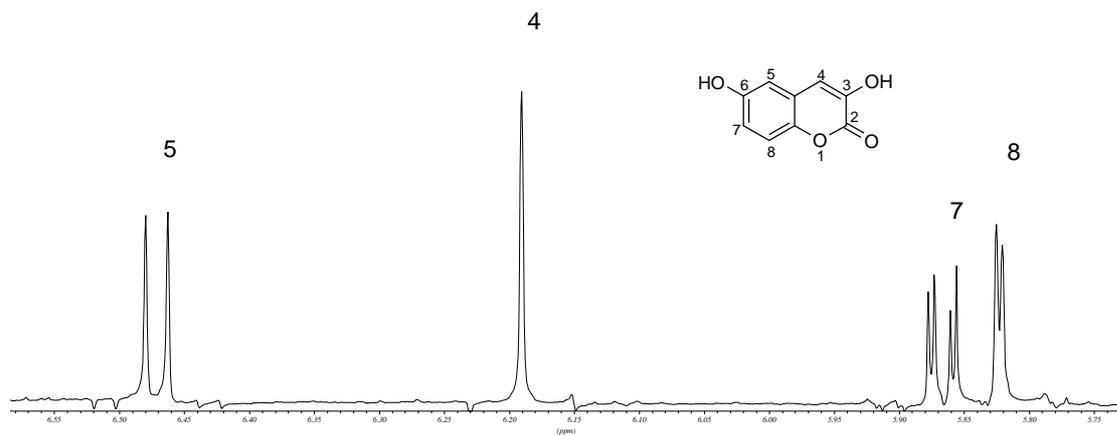


Abb. 125: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von CU1 (500 MHz, in DMSO-d_6)

Die Signale für H-5, H-7 und H-8 zeigten durch ihr Aufspaltungsmuster und entsprechenden Kopplungskonstanten von 8,5 und 2,2 Hz ein ABC-Spinnsystem. Das Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 7,03 ppm wurde

als H-4 zugeordnet. Dies ging aus dem zusätzlich aufgenommenen HMBC-Spektrum hervor (Abb. 126). Das Proton korrelierte mit C-5, C-3, C-8a und mit C-2. Im zweidimensionalen Spektrum konnten ebenfalls Direktkopplungen des H-4 und H-5 zu ihren entsprechenden Kohlenstoffkernen beobachtet werden.

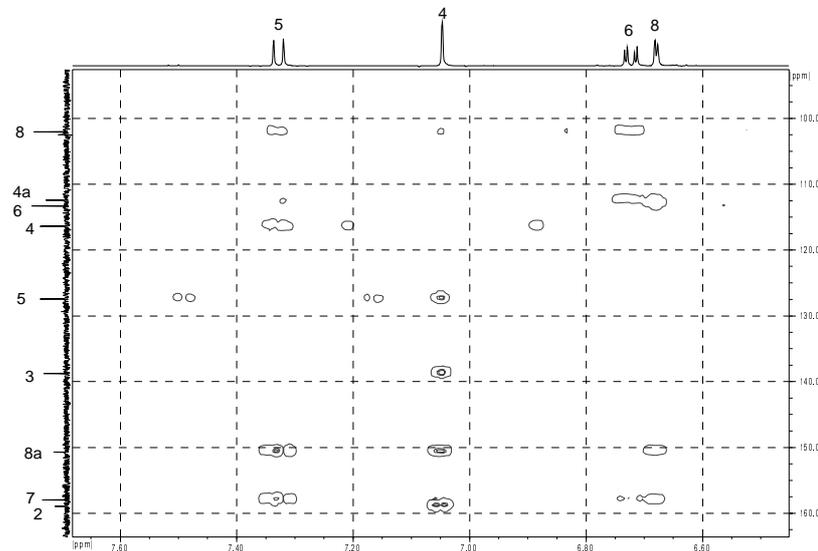


Abb. 126: HMBC-Spektrum von CU1 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆)

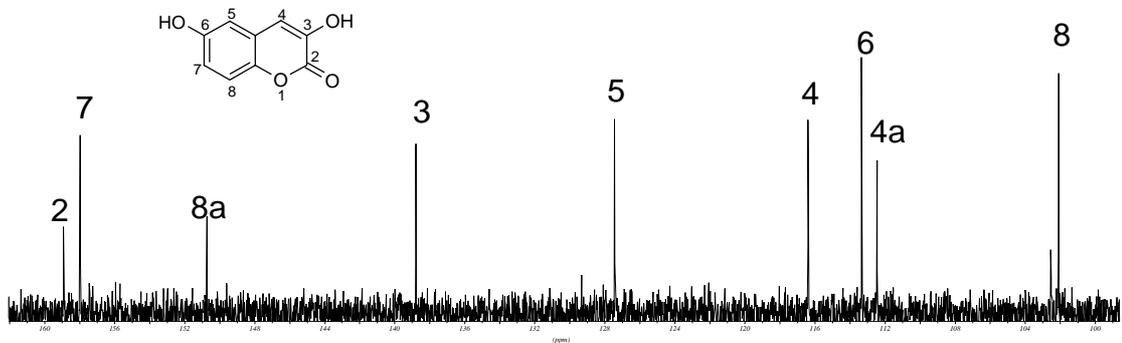


Abb. 127: ¹³C-NMR-Spektrum von CU1 (125 MHz, in DMSO-d₆)

Die Signale des C-6 und C-8 wurden mit Hilfe des HMQC-Spektrums (Abb. 128) eindeutig identifiziert. Die quartären Kohlenstoffzentren konnten anhand des HMBC-Spektrums zugeordnet werden.

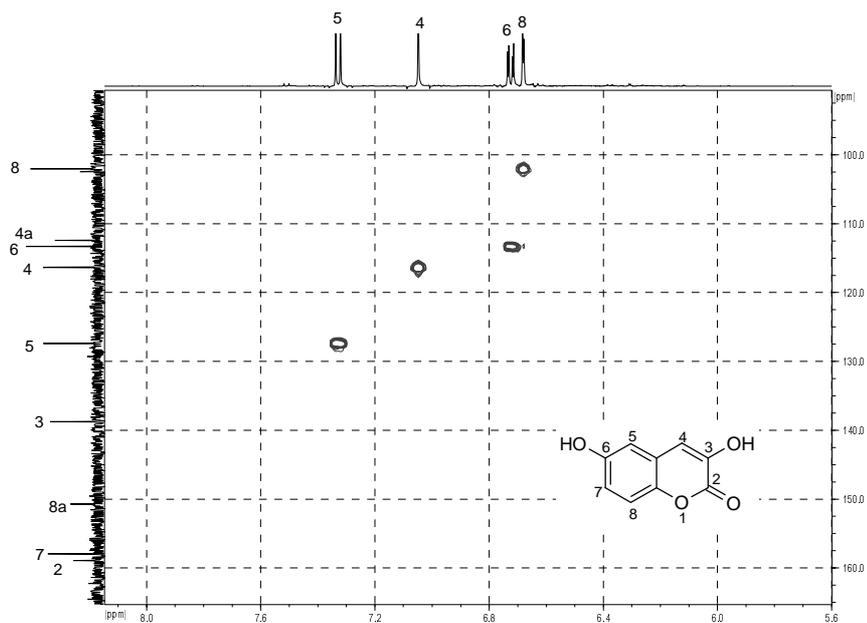


Abb. 128: HMQC-Spektrum von CU1 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆)

Tab. 55: ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von CU1 (500 bzw. 125 MHz, in DMSO-d₆) δ in [ppm], J in [Hz] in Klammern stehend

C-Atom	¹³ C	C-Atom	¹³ C	H-Atom	¹ H
2	158,9	7	158,0	4	7,03 s
3	138,8	8	102,1	5	7,32 d (8,5)
4	116,4	4a	112,4	6	6,72 dd (8,5; 2,2)
5	127,4	8a	150,7	8	6,68 d (2,2)
6	113,3				

Damit handelt es sich bei der Verbindung CU1 eindeutig um 3,6-Dihydroxycumarin. Diese Substanz ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden und stellt somit einen neuen Naturstoff dar.

6. Diskussion

Nachdem im Rahmen eines umfassenden Screenings von Arzneidrogen der TCM die getrockneten Wurzeln von *Sophora flavescens* durch eine starke Leukotrienbiosynthesehemmung aufgefallen waren, wurde diese Droge zur weiteren phytochemischen und pharmakologischen Untersuchung ausgewählt.

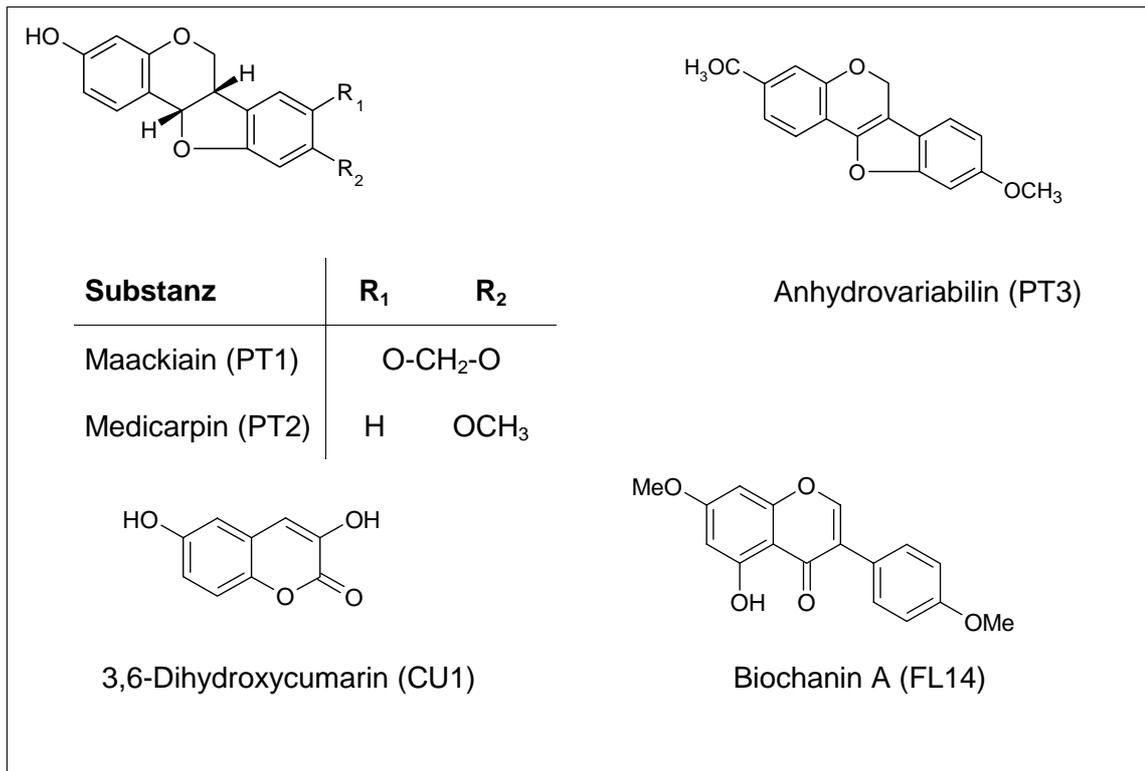
Schon bei der Literaturrecherche fiel auf, dass *Sophora flavescens* bereits sehr intensiv auf ihre Inhaltsstoffführung untersucht worden war. So waren beispielsweise bereits 7 Alkaloide, 42 Flavonoide, 6 Pterocarpanderivate und 6 Saponinderivate neben weiteren Inhaltsstoffen identifiziert worden. Auch die Anzahl pharmakologischer Studien, die bis dato durchgeführt worden waren, ließen auf intensive Forschungen schließen. Untersuchungen zur Hemmung der Leukotrienbiosynthese waren allerdings bisher nicht durchgeführt worden.

Zur Identifizierung der in der Wurzel Droge von *Sophora flavescens* enthaltenen Flavonoide wurden eine HPLC- und eine DC-Methode entwickelt, mit denen es gelingt, die Droge von Verfälschungsdrogen wie *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora* abzugrenzen. Darüber hinaus wurde das Alkaloidmuster von *Sophora flavescens* im Vergleich mit anderen Drogenchargen dünnschichtchromatographisch analysiert. Während das Flavonoidmuster bisher noch nicht per HPLC untersucht worden war, existierten mehrere Literaturnachweise zur DC-Analytik der Flavonoide und Alkaloide von CUI *et al.* (1985 und 1986), XIE *et al.* (1993) und LOU *et al.* (1995). Durch Modifizierung des Fließmittelgemisches war es möglich die Flavonoide und die Alkaloide im gleichen Trennsystem zu untersuchen. Der Chargenvergleich (n = 6) zeigte ein sehr einheitliches Inhaltsstoffmuster. Die Zuordnung der Hauptpeaks und -zonen wurde anhand von Eigenisolaten vorgenommen.

Die Herstellung von Extrakten mit unterschiedlichen Auszugsmitteln (*n*-Hexan, Dichlormethan, Chloroform, Methanol und Wasser) ergab nach DC-Untersuchung, dass die in *Sophora flavescens* enthaltenden Alkaloide vor allem im Chloroformextrakt und wässrigen Dekokt enthalten waren. Diese Tatsache beruht wahrscheinlich auf der Amphiphilie dieser Substanzen. Auch in der

Literatur finden sich Hinweise für das Vorliegen von Alkaloiden in Dekokten der Wurzeldroge von *Sophora flavescens*. Es existiert eine von LEE *et al.* (2001) gemachte Studie, bei der der wässrige Extrakt von *Sophora flavescens* präventive Effekte gegen cardiovaskuläre Anaphylaxie zeigte. Die Autoren gingen davon aus, dass die Wirkung des untersuchten Extraktes auf den Inhaltsstoffen Matrin und Oxymatrin beruhte, da diese Alkaloide bereits in anderen Untersuchungen ähnliche Effekte gezeigt hatten (ZHAO *et al.*, 1983; WU *et al.*, 1988 und LI *et al.*, 1989). Der Hinweis von BENSKY *et al.* (1993), dass die Droge bei Patienten nicht injiziert werden sollte, steht wahrscheinlich mit der herzwirksamen Wirkung der Chinolizidinalkaloide im Zusammenhang. ZHU (1998) berichtet in einem Übersichtsartikel von dosisabhängigem Nachlassen der Kontraktionskraft des Herzens bei Kaninchen (weiterführende Literatur ist dort zu finden).

Zu den pharmakologischen Eigenschaften der in *Sophora flavescens* enthaltenen Chinolizidinalkaloide existierten in der Literatur zahlreiche weitere Untersuchungen (siehe S. 33-37 im *Allg. Teil* der Arbeit). Neben antiulcerativen Eigenschaften von Oxymatrin (YAMAZAKI *et al.* 1993) wurde bei Matrin eine antiasthmatische Wirkung nachgewiesen (YAMAZAKI *et al.* 2000). Daher wurden die beiden Inhaltsstoffe im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Hemmwirkung beider Cyclooxygenase-Isoenzyme und der 5-Lipoxygenase getestet. Hier zeigten sich allerdings keine bzw. schwache Aktivitäten für beide Alkaloide. Die antiasthmatischen und antiulcerativen Wirkungen dieser Stoffe sind somit nicht auf eine Hemmung der 5-Lipoxygenase bzw. Inhibition der Cyclooxygenasen zurückzuführen. Die von YAMAZAKI *et al.* (2000) nachgewiesene antiasthmatische Wirkung der Alkaloide könnte auf einem parasympholytischen Effekt auf die glatte Muskulatur der Bronchien beruhen. Aus der Blockade von M₃-Cholinorezeptoren (Muscarinrezeptoren), die unter anderem in der glatten Muskulatur der Bronchien lokalisiert sind, kann sich ein vasodilatierender Effekt ergeben. Bedingt durch eine Muscarinrezeptorblockade wird zudem die Motilität der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Kanals gehemmt (FORTH *et al.*, 2001). Eine derartige Hemmung wurde von YAMAZAKI *et al.* (2000) nach intraduodener Gabe von Oxymatrin gefunden.



Tab. 56: Strukturformeln der aus *Sophora flavescens* isolierten Inhaltsstoffe

Anhand der Quantifizierung von fünf Hauptinhaltsstoffen war es möglich, eine Korrelation zwischen der Extraktwirkung und der Wirkung der einzelnen Flavonoide im 5-LOX-Test herzustellen. Im eingesetzten Testsystem hatte der Dichlormethanextrakt der Drogencharge **SF1** mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 6,5 µg/ml eine sehr starke inhibitorische Aktivität gezeigt und war daher weiter phytochemisch untersucht worden. Die sich anschließende Fraktionierung und Isolierung von Inhaltsstoffen erfolgte ausschließlich wirkungsorientiert. Nachdem die IC₅₀-Werte der jeweils untersuchten Inhaltsstoffe durch Testung ermittelt worden waren, konnte der Versuch gemacht werden die Extraktwirkung zu erklären.

Die quantifizierten Hauptinhaltsstoffe machen insgesamt einen Anteil von 38,5 % am Gesamtextrakt aus. Wären ausschließlich diese Inhaltsstoffe im Extrakt enthalten gewesen, müsste der Auszug eine halbmaximale Hemmwirkung von 3,78 µg/ml zeigen. Da aber der Gesamtextrakt auch noch weitere Inhaltsstoffe enthält, wie man z.B. anhand von DC- oder HPLC-Chromatogrammen feststellen kann, die nicht zwangsweise an der Hemmung der Leukotrienbiosynthese beteiligt oder weniger stark wirksam sind, ist es verständlich, dass der IC₅₀-Wert des Extraktes höher sein muss.

Tab. 57: Gehalt der Hauptinhaltsstoffe in der Drogencharge **SF1**, sowie Ergebnisse der pharmakologischen Aktivität im 5-LOX-Test (IC₅₀-Werte)

Substanz	M_R (g/mol)	Gehalt in Droge (%)	Gehalt im Extrakt (%)	IC₅₀ (µM)	IC₅₀ (µg/ml)
Sophoraflavanon G (FL5)	424	0,24	7,84	8,1	3,43
Kurarinon (FL6)	438	0,60	19,61	9,2	4,03
2'-Methoxykurarinon (FL8)	452	0,04	1,31	1,5	0,68
Norkurarinol (FL10)	442	0,10	3,27	8,7	3,85
Kushenol I (FL12)	454	0,20	3,27	9,3	4,22

Geht man davon aus, dass lediglich die Hauptsubstanzen im Gesamtextrakt eine hemmende Wirkung im 5-LOX-Test zeigen, resultiert aufgrund ihres Gehaltes ein IC₅₀-Wert von 9,5 µg/ml. Wie bereits zuvor erwähnt, ergab sich aber für die Extraktwirkung ein IC₅₀-Wert von 6,5 µg/ml. Das bedeutet, dass 68 % der Aktivität des Extraktes allein durch die Hauptsubstanzen Norkurarinol, Kushenol I, Kurarinon, 2'-Methoxykurarinon und Sophoraflavanon G ausgemacht werden. Die Wirkung dieser Inhaltsstoffe wird durch die Hemmeigenschaften der weiteren Substanzen, die auch isoliert und getestet wurden, ergänzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass wahrscheinlich zu über 90 % der Extraktwirkung von den im Rahmen dieser Arbeit isolierten und untersuchten Flavonoiden verursacht wird.

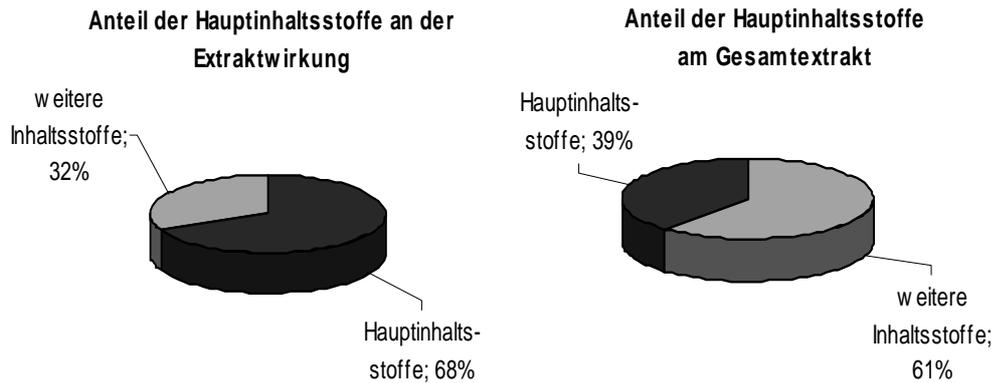


Abb. 129: Anteil der Hauptinhaltsstoffe am Gesamtextrakt (links) und an der Wirkung des Gesamtextraktes (rechts)

Um durch Zytotoxizität falsch positive 5-LOX-Hemmungen ausschließen zu können, wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Hauptsubstanzen jeweils in doppelter IC_{50} -Konzentration einem Zytotoxizitätstest unterzogen wurden. Die dabei erzielten Ergebnisse waren stets negativ. Die nachgewiesene Leukotrienbiosynthesehemmung des DCM-Extraktes und der Reinsubstanzen ist somit nicht zytotoxischer Natur.

Die stets gute bis sehr gute Leukotrienbiosynthesehemmung von Kurarion, Kushenol I und Sophoraflavanon G kann möglicherweise mit einer antioxidativen Wirkung erklärt werden, da im FMLP-Chemielumineszenztest an polymorphkernigen Granulozyten ein entsprechender Effekt nachgewiesen werden konnte. Dieser Test wurde durchgeführt, nachdem ein dünnschichtchromatographischer Nachweis (mit DPPH-Reagenz) auf radikalfangende Eigenschaften der Substanzen hingewiesen hatte. Aufgrund mangelnder Testkapazitäten konnte die Prüfung auf antioxidative Wirkung lediglich für drei der isolierten Substanzen durchgeführt werden. Es ist jedoch aufgrund von Voruntersuchungen mit weiteren Flavonoiden (Radikalfängertest mit DPPH-Reagenz.) wahrscheinlich, dass auch bei anderen Verbindungen die Hemmung der Leukotrienbiosynthese mit antioxidativen Wirkungen in Zusammenhang steht.

Substanz	R'	R''	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Sophoraflavanon B (FL1)	A	H	H	H	H	OH	H
Exiguaflavanon K (FL2)	A	H	H	H	OCH ₃	OH	H
Kushenol E (FL3)	A	A	H	OH	H	OH	H
Kushenol B (FL4)	B	A	H	OH	H	OH	H
Sophoraflavanon G (FL5)	B	H	H	OH	H	OH	H
Kurarinon (FL6)	B	H	CH ₃	H	H	OH	H
Isokurarinon (FL7)	B	H	H	OCH ₃	H	OH	H
2'-Methoxykurarinon (FL8)	B	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
Kushenol A (FL9)	B	H	H	OH	H	H	H
Norkurarinol (FL10)	C	H	H	OH	H	OH	H
Kushenol P (FL11)	C	H	H	OCH ₃	H	OH	H
Kushenol I (FL12)	B	H	CH ₃	OH	H	OH	OH
Kushenol M (FL13)	B	A	H	OH	H	OH	OH

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃
Kushenol D (CH1)	OH	OCH ₃	OCH ₃
Kuraridin (CH2)	OCH ₃	OH	OH

Tab. 58: Strukturformeln der aus *Sophora flavescens* isolierten Inhaltsstoffe (Forts. von Tab. 56)

Da die 15 isolierten Flavanon-, Flavanonol- und Chalkonderivate (FL1-FL13 und CH1-CH2) in ihren Grundgerüsten recht ähnlich sind (Tab. 58), lag es nahe, Überlegungen zu **Struktur-Wirkungs-Beziehungen** bezüglich der Hemmung im 5-LOX-Assay anzustellen.

Wie bereits zuvor von MÜLLER-JAKIC (1995) beschrieben, müssen Inhibitoren der 5-Lipoxygenase einen lipophilen Rest besitzen, damit die Penetration durch die Zellmembran und die Annäherung an das Reaktionszentrum des Enzyms ermöglicht werden kann. Diese Voraussetzung war bei allen untersuchten wirksamen Verbindungen durch die Anwesenheit der Lavandulyl- und/oder der Isopentenyl-Seitenkette gegeben.

Generell konnte festgestellt werden, dass die Hemmwirkung der Substanzen mit cyclisiertem C-Ring (Flavanone und Flavanonole) stärker war als die der Chalkonderivate. Die IC_{50} -Werte der Chalkone lagen in einem Bereich von 22-30 μM , bei Flavanonen und Flavanonolen ergaben sich halbmaximale Hemmwerte von 1-15 μM . Beispielsweise hatte Kuraridin, das als entsprechendes Chalkonderivat von Kurarinon angesehen werden kann, einen IC_{50} -Wert von 29,4 μM im Gegensatz zum Flavanon (Kuraridin) mit 9,2 μM .

Innerhalb der Gruppe der Flavanone und Flavanonole fiel auf, dass sich das Fehlen einer Hydroxylgruppe in 4'-Position (am B-Ring) nachteilig auf die Hemmaktivität der getesteten Substanz auswirkte (Beispiel: Kushenol A mit $IC_{50} = 14,8 \mu\text{M}$ und Sophoraflavanon G mit $IC_{50} = 8,1 \mu\text{M}$).

Das zusätzliche Vorhandensein von Hydroxylgruppen in 5''- oder 3-Stellung hatte keine steigernde oder mindernde Hemmwirkungen zur Folge, scheint in diesem Zusammenhang also keine Rolle zu spielen. Dazu wurden Sophoraflavanon G ($IC_{50} = 8,1 \mu\text{M}$) mit Norkuraridin ($IC_{50} = 8,7 \mu\text{M}$) und Kushenol I ($IC_{50} = 9,3 \mu\text{M}$), sowie Kushenol M ($IC_{50} = 8,4 \mu\text{M}$) mit Kushenol B ($IC_{50} = 8,3 \mu\text{M}$) verglichen.

Die Substitution einer Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe hat eine geringe Abschwächung der Wirkung zur Folge (z.B. Norkuraridin/Kushenol P mit $IC_{50} = 8,7 \mu\text{M}$ bzw. 10,2 μM oder Isokuraridin/Sophoraflavanon G mit $IC_{50} = 12,8 \mu\text{M}$ bzw. 8,1 μM). Interessanterweise bewirkt die Einführung einer zweiten Methoxygruppe, wie es beim 2'-Methoxykurarinon mit $IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ der Fall war, eine recht deutliche Wirkungssteigerung. Dieses Flavanonderivat war von allen untersuchten Stoffen das am besten wirksame. Bereits nach der Vorfraktionierung des DCM-Rohextraktes waren die Grobfraktionen, die 2'-Methoxykurarinon enthielten, durch sehr starke Hemmaktivitäten aufgefallen.

Die Art und Länge der enthaltenen Seitenkette scheint bei der Anwesenheit **einer** Seitenkette im Molekül von untergeordneter Bedeutung zu sein. Beim Vorhandensein von **zwei** Isopentenyl-Seitenketten (Kushenol E mit $IC_{50} = 4,8 \mu M$) in 6- und 8-Position des A-Ringes trat eine Wirkungssteigerung gegenüber der Kombination Isopentenyl- und Lavandulyl-Seitenkette (Kushenol M $IC_{50} = 8,4 \mu M$) auf. Verbindungen mit zwei Lavandulyl-Seitenketten wurden nicht isoliert und damit auch nicht untersucht.

Die zuvor von PRÖBSTLE (1994) und REININGER (2001) gefundenen moderaten Hemmwirkungen von Sophora-Extrakten auf die Hemmung der Cyclooxygenasen konnte nach Testung der isolierten Inhaltsstoffe erklärt werden. Während Sophoraflavanon G und Isokurarinon lediglich starke COX-1-Hemmungen zeigten ($IC_{50} = 0,43 \mu M$ bzw. $6,59 \mu M$), war Sophoraflavanon G auch COX-2 inhibitorisch aktiv ($IC_{50} = 1,82 \mu M$). Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil denen, die von CHI *et al.* (2001) nach Abschluss unserer Arbeiten publiziert wurden. Die Arbeitsgruppe hatte unter anderem Sophoraflavanon G auf COX-1/-2-Hemmung getestet und eine starke COX-1-Hemmung gefunden, jedoch selbst bei einer Testkonzentration von $100 \mu M$ nur eine schwache COX-2-Hemmung festgestellt. Weiterhin wurden Kurarinon und Kuraridin getestet. Auch diese beiden Flavonoide erwiesen sich nach CHI *et al.* als potente Hemmstoffe gegenüber der COX-1, während sie auf die COX-2 keine Wirkung zeigten. Im von uns verwendeten Testsystem auf COX-1/-2-Hemmung erwiesen sich die beiden Substanzen eher als schwache, allenfalls als moderate Hemmstoffe. In Analogie zu CHI *et al.* war ebenfalls eine Präferenz der COX-1-Inhibition gegenüber der COX-2-Hemmung aufgefallen (Kuraridin 41,4 % COX-1-Hemmung, 31,2 % COX-2-Hemmung; Kuraridin 55,6 % und 26,2 % COX-1- bzw. COX-2-Hemmung; jeweils bei einer Testkonzentration von $25 \mu mol/ml$). Die Ursache für die unterschiedlichen Testergebnisse (sowohl COX- als auch 5-LOX-Ergebnisse) dürfte in der Verwendung von verschiedenen Testsystemen liegen. Zudem besteht Zweifel daran, ob es sich bei der Untersuchung von Sophoraflavanon G tatsächlich um diese Verbindung gehandelt hat, denn in der weiterführenden von CHI *et al.* angegebenen Literatur zur Isolierung des Flavanons lässt sich die Identität der Substanz nicht zweifelsfrei klären.

Die Gesamtheit der Flavonoide hat nach den Angaben von ZHANG *et al.* (1979) und WANG *et al.* (1983) auch eine antiarrhythmische Wirksamkeit. Dies kann mit einem Einfluss auf die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle begründet werden. YAMAHARA *et al.* (1990) berichten von einer schwachen Beeinflussung der Calciumkanäle durch Kurarinon. Das würde die 5-LOX-Hemmwirkungen der Inhaltsstoffe und des DCM-Extraktes untermauern, denn auch die Leukotrienbiosynthese wird durch die Blockade von Ca^{2+} -Kanälen beeinflusst, da die Umsetzung von Arachidonsäure mittels der 5-Lipoxygenase ein calciumabhängiger Vorgang ist. Nach GERTNER *et al.* (1992) wurde eine signifikante Hemmung der LTB_4 -Freisetzung aus Darmschleimhautzellen *in vitro* durch Verapamil gefunden. Untersuchungen zu einem Zusammenhang der calciumantagonistischen Wirkung und der 5-Lipoxygenasehemmung wurden auch von Zschocke (1998) mit Nifedipin und verschiedenen Furanocumarinen durchgeführt. Das Dihydropyridinderivat zeigte im 5-LOX-Test jeweils eine ca. 30 %ige Hemmung bei einer eingesetzten Testkonzentration von 50 und 100 μM . Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Calciumkanalblocker offenbar einen konzentrationsunabhängigen und eher unspezifischen Hemmeffekt auf die 5-Lipoxygenase bewirken. Bei unseren Untersuchungen zur Hemmung der Leukotrienbiosynthese hatte Kurarinon einen dosisabhängigen Hemmeffekt gezeigt. Das bedeutet, dass die von Yamahara gefundene antiarrhythmische Wirkung von Kurarinon vermutlich einen anderen Hemmmechanismus als Nifedipin haben muss.

KITAOKA *et al.* (1998) beschreiben aus der Inhaltsstoffklasse der Prenylflavonoide unter anderem Sophoraflavanon B als phytoöstrogen wirksame Substanz. Die Autoren führen die Aktivität auf die Anwesenheit der Prenyl-Seitenkette zurück, da in gleicher Weise durchgeführte Untersuchungen von Hesperitin oder Naringenin zu negativen Ergebnissen führten. Flavanone mit Lavandulyl-Seitenkette wurden im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Möglicherweise zeigen auch diese Inhaltsstoffe eine östrogene Wirksamkeit.

Mit Biochanin A wurde ein Isoflavon isoliert, das erstmals in *Sophora flavescens* gefunden wurde. Auch diese Substanz wurde auf Hemmung der Leukotrien- und Prostaglandinbiosynthese getestet. Dabei konnte eine signifikante selektive Inhibition der Leukotrienbiosynthese nachgewiesen werden ($\text{IC}_{50} = 17,7 \mu\text{M}$). Hinsichtlich COX-1/-2-Hemmung zeigten sich bei einer eingesetzten

Testkonzentration von 25 μM keine Aktivitäten. YAMAKI *et al.* (2002) hatten im Gegensatz dazu von einigen anderen strukturverwandten Verbindungen, z.B. Daidzein und Genistein ($\text{IC}_{50} = > 30 \mu\text{M}$ bzw. $15 \mu\text{M}$) moderate bis schwache, bei Irisolidon ($\text{IC}_{50} = 2,9 \mu\text{M}$) starke Hemmeigenschaften in Makrophagen von Ratten bezüglich der Prostaglandin E_2 -Biosynthese nachgewiesen. Das Ergebnis wurde mit einer für die Wirkung von Irisolidon notwendigen Methoxygruppe in 6-Position begründet. Da diese Substitution bei Biochanin A nicht vorhanden ist, kann dies erklären, dass keine PGE_2 -Hemmung nachgewiesen werden konnte.

Neben den bisher beschriebenen Flavonoiden konnten mit Maackiain, Medicarpin und Anhydrovariabilin auch drei Pterocarpanderivate isoliert werden (Tab. 56). Die beiden letztgenannten Inhaltsstoffe waren bisher noch nicht für *Sophora flavescens* beschrieben worden. Das Vorkommen von Medicarpin und Anhydrovariabilin wurde erstmalig aus *Swartzia madagascariensis* von HARPER *et al.* (1969) beschrieben. Die drei Inhaltsstoffe wiesen mit IC_{50} -Werten von $32,8 \mu\text{M}$ - $45,0 \mu\text{M}$ eher moderate Hemmwirkungen auf die Leukotrienbiosynthese auf. Auch neun weitere strukturell nah verwandte chemisch synthetisch hergestellte Pterocarpanderivate wurden auf eine Leukotrienbiosynthesehemmung untersucht, zeigten dabei aber auch eher moderate Hemmeigenschaften. Maackiain wurde zudem auf die Hemmung der Cyclooxygenasen getestet und zeigte bei der COX-1-Hemmung nur schwache inhibitorische Wirkung (27,8 %ige Hemmung bei einer Testkonzentration von $25 \mu\text{mol/ml}$). Auf COX-2 wurde keine Hemmaktivität der Substanz nachgewiesen. Maackiain und Medicarpin werden nach HARBORNE (1994) als Phytoalexine mit antifungaler Aktivität beschrieben. HONDA und TABATA (1982) wiesen eine moderate Wirkung von Maackiain gegen Hautpilz nach. Anhydrovariabilin hat eine schwächere antifungale Wirkung (BARRERO *et al.*, 1998). Das gemeinsame Vorkommen der drei Pterocarpanderivate wurde von BARRERO *et al.* auch in *Ononis viscosa* subsp. *breviflora* beschrieben.

3,6-Dihydroxycumarin konnte aus *Sophora flavescens* als neuer Naturstoff isoliert und seine Struktur aufgeklärt werden. Der Inhaltsstoff hatte keinen Einfluss auf den Arachidonsäuremechanismus. Cumarine mit ähnlicher Struktur waren in unserem Arbeitskreis bereits zuvor auf diesbezügliche Hemmaktivitäten untersucht worden, mit dem Ergebnis, dass lediglich Osthol ($\text{IC}_{50} =$

36,2 μM im 5-LOX-Test) eine nennenswerte Wirkung hervorrief (ZSCHOCKE (1997) und LIU *et al.* (1998)). Das jetzt isolierte Cumarinderivat zeigte im 5-LOX-Test vermutlich deshalb keine Wirkung, weil es aufgrund der hohen Hydrophilie die Zellmembran der Granulozyten, mit denen der Test durchgeführt wurde, nicht passieren kann. Beim Osthol hingegen ist dies möglich, da die Verbindung mit einer apolaren Prenyl-Seitenkette ausgestattet ist.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten pharmakologischen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass vor allem die Flavanon- und Flavanonol-derivate eine sehr starke dosisabhängige Hemmung der Leukotrienbiosynthese zeigen. Zudem konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen hergeleitet werden, die die Bedeutung der Prenyl-Seitenkette am Flavanon- bzw. Flavanonolgrundgerüst belegen. Die im 5-LOX-Assay etwas schwächer wirksamen Pterocarpan- und Chalkonderivate leisten bei der Wirkung des Gesamtextraktes einen unterstützenden Beitrag.

Mit Sophoraflavanon G konnte ein stark dual wirkender Hemmstoff gefunden werden, der gleichzeitig die Hemmung von Leukotrien- und Prostaglandinbiosynthese bewirkt.

7. Zusammenfassung

Die Wurzeln von *Sophora flavescens* werden in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) unter anderem zur Behandlung von asthmatischen Erkrankungen angewendet. In einem Screening zur Leukotrienbiosynthesehemmung war *Sophora flavescens* durch eine starke Aktivität aufgefallen. Aus diesem Grund sollten mögliche antiasthmatische Wirkprinzipien isoliert und gleichzeitig Analysenverfahren zur Sicherstellung der Identität der Droge entwickelt werden.

Zur Identitäts- und Qualitätsprüfung der Wurzeln von *Sophora flavescens* wurden eine DC- und eine HPLC-Methode entwickelt, mit denen das Flavonoidinhaltsstoffmuster der Droge eindeutig charakterisiert werden kann und die als Verfälschungsdrogen bekannten Spezies *Sophora tonkinensis* und *Glycyrrhiza pallidiflora* eindeutig abgegrenzt werden können. Mittels HPLC- und DC-Methode wurde zudem ein Chargenvergleich von *Sophora flavescens* mit Drogenmustern unterschiedlicher Herkunft durchgeführt, der qualitativ ein sehr einheitliches Inhaltsstoffmuster der enthaltenen Flavonoide ergab. Der Gehalt der Inhaltsstoffe schwankte allerdings.

Die Analyse von Dekokten ergab, dass darin die ebenfalls in der Droge enthaltenen Chinolizidinalkaloide, vor allem Matrin und Oxymatrin, als Hauptinhaltsstoffe angereichert vorliegen. Auch hier zeigten sich lediglich Unterschiede quantitativer Art.

Unter den zwanzig isolierten Inhaltsstoffen des Dichlormethanextraktes fanden sich drei Pterocarpanderivate, elf Flavanone, zwei Flavanonole, zwei Chalkone und jeweils ein Chroman, Isoflavon und Cumarin. Die Strukturaufklärung der Verbindungen erfolgte sowohl mit Hilfe von UV-, MS-, CD- als auch durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Die Inhaltsstoffe Medicarpin, Anhydrovariabilin, Exiguaflavanon K und Biochanin A wurden aus *Sophora flavescens* zum ersten Mal isoliert und identifiziert. Bei 3,6-Dihydroxycumarin und Kushenchroman A (3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-[5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-3-(3-methylbut-2-enyl)-chroman-6-yl]-propenon) handelt es sich um neue Naturstoffe.

Die pharmakologischen Untersuchungen von Extrakten unterschiedlicher Polarität und der isolierten Inhaltsstoffe wurden *in vitro* anhand von 5-Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-1 und -2-Tests durchgeführt. Bei den Extrakten (hergestellt mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol als Extraktionsmittel), zeigte der Dichlormethanextrakt die stärkste Wirksamkeit im 5-LOX-Assay und wurde daher auf seine Inhaltsstoffführung untersucht. Die sich anschließende Fraktionierung und weitere Isolierung der Inhaltsstoffe erfolgte stets wirkungsorientiert in Bezug auf die Hemmwirkung der Leukotrienbiosynthese. Dabei wurden neben den isolierten Flavonoiden auch die Hemmeigenschaften der Alkaloide Matrin und Oxymatrin untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Flavonoide für den in den Extrakten gefundenen hemmenden Einfluss auf den Arachidonsäuremetabolismus maßgeblich verantwortlich waren. Die Alkaloide zeigten keinerlei Hemmwirkungen auf die Leukotrienbiosynthese und die Cyclooxygenase-Isoenzyme.

Bei der Untersuchung der isolierten Reinstoffe auf Hemmung der 5-Lipoxygenase und der Cyclooxygenasen, stellte sich 2'-Methoxykurarinon als am besten wirksames Flavonoid ($IC_{50} = 1,5 \mu M$) von *Sophora flavescens* heraus. Dabei entpuppte sich der Inhaltsstoff als selektiver Leukotrienbiosynthese-Inhibitor. Bei der Untersuchung in den eingesetzten COX-Tests konnte lediglich eine schwache Hemmung festgestellt werden. Mit Sophoraflavanon G konnte auch ein Hemmstoff mit dualer Wirkung gefunden werden. Neben einer Leukotrienbiosynthesehemmung mit einem IC_{50} von $8,1 \mu M$ zeigte die Substanz eine sehr starke COX-1- und COX-2-Hemmung ($IC_{50} = 0,43 \mu M$ für COX-1 bzw. $1,82 \mu M$ für COX-2-Hemmung), ihre Wirkung ist damit mit der der Referenzsubstanz Indometacin vergleichbar.

Generell konnten für die 5-LOX-Hemmung der untersuchten Flavonoide folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen hergeleitet werden:

ein apolarer Rest, wie eine Isopentenyl- und/oder Lavandulyl-Seitenkette gestellt wird, ist für eine Leukotrienbiosynthesehemmung notwendig

die Art und Länge einer Seitenkette (Isopentenyl- oder Lavandulyl-Seitenkette) ist nahezu unerheblich; die Anwesenheit zweier Isopentenyl-Seitenketten ist günstig

ein vorhandener cyclisierter C-Ring erhöht die Hemmwirkung (Chalkonderivate waren im Vergleich zu Flavanon- und Flavanonolderivaten schwächer wirksam) die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe in 4'-Position des B-Ringes ist günstig Hydroxylgruppen in 5''- oder 3-Stellung haben keine Änderung der Wirkung zur Folge

die Substitution einer Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe mindert die Hemmeigenschaften, die Gegenwart zweier Methylgruppen (in 5- und 2'-Position) bewirkt eine Wirkungssteigerung

Nachdem per HPLC-Analyse eine Quantifizierung von fünf Hauptinhaltsstoffen durchgeführt worden war, konnte eine Korrelation zwischen Extraktwirkung und der Hemmaktivität der Inhaltsstoffe hergestellt werden. Die Gesamtheit der fünf Hauptinhaltsstoffe allein bedingte 68 % der Wirkung des DCM-Extraktes. Daraus und durch Berücksichtigung der weiteren isolierten Inhaltsstoffe ergibt sich, dass sich die Wirkung des untersuchten Dichlormethanextraktes mit mehr als 90 % auf die Hemmeigenschaften der isolierten Inhaltsstoffe zurückführen lässt.

Drei der Hauptinhaltsstoffe (Kurarinon, Kushenol I und Sophoraflavanon G) wurden auf ihr antioxidatives Potential untersucht. Nachdem Hemmwirkungen im unteren mikromolaren Bereich ermittelt wurden, kann man davon ausgehen, dass die Hemmeigenschaften der Inhaltsstoffe im 5-LOX- und im COX-1/-2-Assay mit deren antioxidativen Eigenschaften begründet werden können.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Prinzip zur Hemmung der Leukotriensynthese des Dichlormethanextraktes der Wurzeln von *Sophora flavescens* mit den Hemmwirkungen der enthaltenen Prenylflavonoide erklärt werden kann. Damit ergeben sich mögliche neue Leitstrukturen, die zukünftig bei der Entwicklung von Asthmamedikamenten nützlich sein könnten.

8. Experimenteller Teil

8.1 Herkunft des untersuchten Pflanzenmaterials

Die TCM-Klinik in Kötzing stellte uns freundlicherweise die zur Isolierung erforderliche Menge der Droge *Sophorae flavescens* radix zur Verfügung. Die Identität wurde mit Hilfe des chinesischen Arzneibuches, Drogenatlanten, per DC- und HPLC-Analyse geprüft und von Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie (München) bestätigt. Die weiteren Drogenmuster, die zu analytischen Zwecken genutzt wurden, stammten von unterschiedlichen Drogenmärkten und Drogenhandlungen und wurden auf China-Reisen erworben. Rückstellmuster befinden sich am Institut für Pharmakognosie der Karl-Franzens-Universität Graz (Österreich).

Sophora flavescens

- SF 1** TCM-Klinik Kötzing (Lieferung: Januar 1999)
- SF 2** Apotheke, Peking
- SF 3** Drogenhandlung, Chinatown, L.A. (Lieferung: 2.10.2000)
- SF 4** TCM-Klinik, Kötzing, CH.: 07.06.99
- SF 5** TCM-Klinik, Kötzing, CH.: 26.01.95
- SF 6** Bot. Garten, IMPLAD, Peking (Lieferung: Februar 2001)

Sophora tonkinensis

- ST 1** TCM-Klinik Kötzing

Glycyrrhiza pallidiflora

- GP 1** Bot. Garten, IMPLAD, Peking (Lieferung: Februar 2001)

8.2 Referenzsubstanzen und im 5-Lipoxygenase-Test untersuchte Vergleichsverbindungen

Die chemisch synthetisierten Pterocarpanderivate wurden von Herrn Prof. Dr. Sandor Antus, Institute of Organic Chemistry, Debrecen (Ungarn) zur Verfügung gestellt.

Herr Prof. Xiao Pei-Gen, Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Xi Bei Wang, Peking (China) stellte uns freundlicherweise die Alkaloide Matrin, Oxymatrin und Sophoridin zur Verfügung. Weiterhin übersandte er uns die Drogenchargen SF6, ST1, GP1.

Die Referenzsubstanz Acacetin stammte von der Fa. Roth.

8.3 Chromatographische Methoden

8.3.1 Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Stationäre Phase: DC-Alufolien (20 cm x 20 cm) Kieselgel 60 F₂₅₄ mit 0,2 mm Schichtdicke, Fa. Merck (Art.- Nr. 1.05554)

Mobile Phase: untere Phase des Fließmittelsystems (V/V) aus Chloroform/Methanol/Ammoniak (25 %) (50:10:3); die Mischung wurde vor Gebrauch im Schütteltrichter kräftig geschüttelt und bis zur Bildung zweier Phasen stehengelassen

Probenvorbereitung: Die aufzutragenden Extraktproben wurden mit Ethanol p.a. auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurden 10 µl bandförmig 1 cm breit auf die DC-Folie aufgetragen.

Die Referenzsubstanzen wurden mit Ethanol p.a. zu 1 mg/ml gelöst und ebenfalls mit einem Auftragevolumen von 10 µl und 1 cm Bandbreite aufgetragen.

Durchführung: Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte, vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt, über eine Laufstrecke von 8 cm in DC-Kammern mit Kammersättigung.

Detektion: Die optische Auswertung der Chromatogramme wurde unter UV-Licht bei 254 nm (Beobachtung der Fluoreszenzlöschung), bei UV 365 nm (Eigenfluoreszenz) oder im Tageslicht (VIS) nach Einsatz geeigneter Sprühreagenzien vorgenommen.

Detektionsreagenzien: Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (VS-Reagenz)

0,5 g Vanillin (Fa. Caelo) wurden mit 85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung und Rühren in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig vermischt. Nach Besprühen der entwickelten DC-Platte mit etwa 10 ml des Reagenzes wurde diese ca. 1-2 Min. bei 100 °C bis zur intensiven Farbentwicklung unter Beobachtung erhitzt. Die Flavonoide zeigten unterschiedliche Rot- bzw. Rotbraunfärbungen.

Dragendorff's Reagenz nach Pharm. Eur. 2000

0,85 g basisches Wismutnitrat werden mit 40 ml dest. Wasser, 10 ml Eisessig und 20 ml Kaliumiodidlösung R gemischt. Nach Besprühen bis zur vollständigen Gelbfärbung der Platte erfolgte die Auswertung im VIS. Alkaloide färben sich orangebraun an.

DPPH-(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)-Reagenz

Von der Substanz (Fa. Sigma) wurde eine 1 %ige methanolische Lösung hergestellt zur Prüfung auf radikalfangende Eigenschaften. Dafür wurde die DC-Platte bis zur vollständigen Violettfärbung besprüht. Verbindungen mit radikalfangenden Eigenschaften entfärbten das Reagenz und die Zonen erschienen gelb.

Lösungsmittel: Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und durch einmalige Destillation

aufgereinigt.

R_f-Werte und Detek- Siehe Tab. 59

tionsverhalten:

Tab. 59: R_f-Werte und Detektionsverhalten der aus *Sophora flavescens* im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen (Standardfließmittelsystem)

Substanz	R _f -Wert	UV254 nm	UV365 nm	Vanillin/H ₂ SO ₄ -Rz.
Maackiain	0,76	löschend		altrosa
Medicarpin	0,75	löschend		altrosa
Anhydrovariabilin	0,95	löschend		orange
Kushenol A	0,63	löschend		graugrün
Kushenol B	0,41	löschend		rotbraun
Kushenol E	0,46	löschend		rot
Kushenol P	0,21	löschend		rot
Sophoraflavanon B	0,53	löschend		graugrün
Sophoraflavanon G	0,35	löschend		hellrot
Isokurarinon	0,66	löschend		blutrot
Kurarinon	0,24	löschend		rot
Norkurarinol	0,14	löschend		rot
Exiguaflavanon K	0,51	löschend		rot
2'-Methoxykurarinon	0,51	löschend		rot
Kushenol I	0,17	löschend		rot
Kushenol M	0,32	löschend		rot
Kushenol D	0,41	löschend		rotbraun
Kurarinidin	0,34	löschend		orangerot
Kushenchroman A	0,34	löschend		rotbraun
3,6-Dihydroxycumarin	0,61	-	blau	-

8.3.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Vor der Verwendung der DC-Alufolien (siehe S.193) wurden diese für die präparative Arbeitsweise mit Methanol vorentwickelt und anschließend 1 Stunde im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Diese Operation diente zur Entfernung von Klebstoff- und Weichmacherresten bedingt durch den Herstellungsprozess. Auf diese Platten wurde eine konzentrierte Lösung der zu trennenden Substanzen mit einer Glaskapillare über eine Strecke von 18 cm bandförmig aufgetragen. Nach der Entwicklung über eine Laufstrecke von 15 cm wurden die entsprechenden Zonen der zu isolierenden Substanzen, die unter UV_{254nm} fluoreszenzlöschend erschienen, markiert und anschließend das

entsprechende Kieselgel von den Alufolien abgekratzt. Die Verbindungen wurden unter Zusatz von Dichlormethan (3 x 40 ml) mit Hilfe eines Magnetrührers erschöpfend extrahiert. Die Abtrennung von Kieselgelresten in den Eluaten erfolgte per Filtration durch einen Blaubandfilter (Fa. Schleicher & Schuell) und anschließender Filtration über eine Säule mit wenig Sephadex LH-20.

8.3.3 Offene Säulenchromatographie (SC)

Säule: Es wurde eine Glassäule mit Glasfritte und fein regulierbarem Auslasshahn verwendet.

Stationäre Phase: Kieselgel 60, Korngröße 0,04-0,063, 200-400 mesh ASTM, (Fa. Merck)

Anmerkung: Die Masse des benutzten Kieselgels betrug das Hundertfache der Masse der zu trennenden Fraktion.

Füllung der Säule: Das Trennmaterial wurde vor dem Füllen der Säule mit CH_2Cl_2 homogen aufgeschlemmt. Anschließend wurde die Suspension bei geöffnetem Hahn kontinuierlich und luftblasenfrei eingegossen und so lange Eluens nachgefüllt, bis die Füllhöhe konstant blieb. Die Säule samt Füllung wurde über Nacht stehengelassen.

Probenaufgabe: Vor der Probenaufgabe wurde die mobile Phase bis knapp über das Säulenbett abgelassen. Die im verwendeten Lösungsmittel gelöste Probe wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette ohne Aufwirbeln der stationären Phase bei geöffnetem Auslasshahn aufgetragen. Nach dem Einsickern in die oberste Kieselgelschicht wurde mit wenig Eluens nachgespült, mit Seesand abgedeckt und dann mit der Elution begonnen.

Durchführung: Die Eluate wurden mit einem automatischen Fraktionssammler (Fa. Isco) aufgefangen. Dabei betrug der Reagenzglasvorschub alle 30 min pro Reagenzglas. Das

Monitoring der SC erfolgte per DC, wobei der Inhalt jedes dritten aufgefangenen Reagenzglasinhaltes geprüft wurde. Die zusammengehörigen Fraktionen wurden vereinigt.

8.3.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Gerät:	Liquid Chromatograph HP 1050 mit Autosampler und HP Chemstation (Fa. Hewlett-Packard)
Detektoren:	Standarddetektor: Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M (Fa. Hewlett-Packard) Radioaktivitätsdetektor (nur für 5-LOX-Testauswertung, Variante A): Radioaktivitätsmonitor LB 507 B (Fa. EG & G Berthold)
Säulen:	Standardsäule: LiChroCART [®] 125-4 mit LiChroSpher [®] 100 RP (5µm) mit Vorsäule LiChroCART [®] 4-4 mit LiChroSpher [®] 100 RP (5µm), (beide Fa. Merck) Semipräparative Trennungen: Hibar [®] 250mm x 10mm, mit LiChroSorb [®] RP18 (7µm) (Fa. Merck)
Säulentemperatur:	40°C
Flussrate:	1,0 ml/min (sofern nicht anders angegeben)
Mobile Phasen:	A Wasser (Aqua ad injectabilia, Fa. Braun) B Acetonitril (HPLC-Qualität, Fa. Baker) C Wasser (Aqua ad injectabilia, Fa. Braun) mit 0,1 % (V/V) 10 N ortho-Phosphorsäure p.a. (Fa. Fluka) D Acetonitril (HPLC-Qualität, Fa. Baker) mit 0,1 % (V/V) 10 N ortho-Phosphorsäure p.a. (Fa. Fluka)

- Trennmethoden: LC1.m Standardmethode
- Fließmittel A + B; 40 % B isokratisch in 15 min, 40-90 % B linear in 15 min, 90 % B isokratisch in 10 min, vor jedem Lauf 10 min Equilibrierungszeit bei Startbedingungen
- LC2.m Auswertung des LOX-Tests (Variante A)
- Fliessmittel C + D; 50-90 % D linear in 20 min, 90 % isokratisch in 6 min; 40 µl Injektionsvolumen
- LC3.m Semipräparative Trennungen:
- Fließmittel A + B mit dem jeweiligem Trennsystem angepasstem Fließmittelprogramm
- Semipräp. HPLC: 25-100 µl der zu trennenden Fraktion wurden in konzentrierter Lösung mehrmals injiziert und mit Hilfe des DAD-UV-Detektors manuell-peakorientiert aufgefangen.
- Probenvorbereitung: Alle Proben wurden in Ethanol p.a. gelöst und vor dem Einspritzen durch einen Sterilfilter (Ø 13 mm, Porengröße 45 µm, Fa. Merck) filtriert.
- Extrakte und Fraktionen wurden für analytische Untersuchungen in Konzentrationen von 5-10 mg/ml eingesetzt, Reinsubstanzen wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml eingespritzt (Injektionsvolumen 1-10 µl, problemabhängig).
- Retentionszeiten: Die HPLC-Retentionszeiten der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen (Methode LC 1) sind in Tab. 60 angegeben.

Tab. 60: HPLC-Retentionszeiten von isolierten Substanzen aus *Sophora flavescens* ($\pm 0,3$ min, Methode LC 1)

Substanz	Retentionszeit (min)
Maackiain	5,6
Medicarpin	5,7
Anhydrovariabilin	25,8
Kushenol A	21,6
Kushenol B	27,0
Kushenol E	23,3
Kushenol P	8,4
Sophoraflavanon B	9,9
Sophoraflavanon G	19,0
Isokurarinon	23,3
Kurarinon	8,7
Norkurarinol	4,4
Exiguaflavanon K	12,6
Biochanin A	9,7
2'-Methoxykurarinon	18,6
Kushenol I	6,5
Kushenol M	25,2
Kushenol D	26,6
Kuraridin	24,1
Kushenchroman A	26,9
3,6-Dihydroxycumarin	1,5

8.3.5 Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Geräte: HPLC-Pumpe 64 mit Gradientensteuerung HPLC Programmier 50 und Mischkammer (beide Fa. Knauer)

Multiwellendetektor 860 (Fa. Du Pont Instruments)

2-Kanal-Schreiber 7130 A (Fa. Hewlett-Packard)

Chromatographie-Pumpe B-688 mit Gradientenformer B-687 und Fraktionssammler B-684 (alles Fa. Büchi)

Büchi 660 Fraction Collector, Fa. Büchi)

Lyovac GT2 (Fa. Steris) mit Pumpe Trivac E D10E (Fa. Leybold)

- Säulen: LC-Glassäule 1: Länge: 58 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 6,3 mm (LC-9-MA-29, Fa. Latek)
- LC-Glassäule 2: Länge: 74 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 9,0 mm (LC-6M-23, Fa. Latek)
- LC-Glassäule 3: Länge: 109 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 24,4 mm (Fa. Latek)
- LC-Glassäule 4: Länge: 48 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 25 mm (Code No. 17982, Fa. Büchi)
- Stationäre Phasen: 8 g LiChroprep RP 18, 15-25 μm (Fa. Chromatographie Service) (Säule 1)
- 23 g LiChroprep RP 18, 25-40 μm (Fa. Merck) (Säule 2)
- 260 g LiChroprep RP 18, 25-40 μm (Fa. Merck) (Säule 3)
- 230 g Eurosil bioselect[®] RP 18, 25-40 μm , 100 Å, irregulär (Fa. Knauer) (Säule 4)
- Mobile Phase: Deionisiertes Wasser/Acetonitril p.a.
- Probenaufgabe: Die Proben wurden in 1-2 ml Ethanol p.a. gelöst und aufgegeben.
- Flussraten: 3 ml/min (Säule 1 und 2)
- 5 ml/min (Säule 4 und 5)
- Fraktionierung: Die Fraktionierung erfolgte entweder zeitorientiert per Fraktionssammler, wobei der Reagenzglaswechsel etwa alle 2 Minuten erfolgte oder manuell-peakorientiert mittels angeschlossenen UV-Detektor und Schreiber. Anschließend wurden je 15-25 μl der erhaltenen Lösungen in den Reagenzgläsern dünnschichtchromatographisch auf ihre Inhaltsstoffführung mituntersucht und entsprechend zu größeren Fraktionen vereinigt.
- Besonderheit: Nach der Eliminierung des Acetonitrilanteils in den bearbeiteten Fraktionen (Einengung am Rotationsverdampfer) wurde der Wasseranteil durch Lyophilisation entfernt.

8.3.6 Vakuumflüssigchromatographie (VLC)

Mit der Vakuumflüssigchromatographie als Abwandlung der offenen Säulenchromatographie lassen sich Rohextrakte in recht kurzer Zeit und mit guter Reproduzierbarkeit grob auftrennen (Pelletier, 1986).

Verwendet wurden spezielle Glassäulen aus Borosilikatglas mit Glasfritte (Säulenlänge 30 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 5 cm, Porengröße 3) mit einem darunter liegenden Stutzen zum Anlegen eines Vakuums und einem Kolbenschliff zum Anbringen eines Auffangkolbens. Die Säule wurde trocken mit 180 g Kieselgel 60 (40-63 μm Partikelgröße, Fa. Merck) als stationärer Phase gepackt, nachdem zuvor Seesand (Fa. Merck) und Glaswolle eingefüllt worden waren. Die Probenaufnahme erfolgte als Verreibung von Extrakt/Kieselgel (20 g). Darüber wurde erneut Seesand und etwas Glaswolle gegeben zur Vermeidung von Verwirbelungen des Säulenbettes beim Aufbringen des Elutionsmittels. Als mobile Phase dienten Mischungen aus *n*-Hexan/Ethylacetat mit steigender Hydrophilie. Nach Anbringen eines Schliffkolbens konnte das aufgegebene Fließmittel (jeweils 250 ml) durch Anlegen von Vakuum durch das Säulenbett gesaugt und das Eluat aufgefangen werden. Vor jeder neuen Fließmittelzusammensetzung wurde die Säule stets trockengesaugt.

8.4 Spektroskopische und physikalische Methoden

8.4.1 UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden in der Regel zu analytischen Zwecken online während der HPLC-Analysen mit dem Photodiodenarray-Detektor HP 1040 M (Hewlett Packard; HPLC-Anlage: Liquid Chromatograph HP 1050 (Fa. Hewlett Packard) bei Raumtemperatur aufgenommen. Dazu wurden die Proben zuvor in Ethanol p.a. gelöst.

8.4.2 IR-Spektroskopie

Die Aufnahme des IR-Spektrums erfolgte mit einem FT-Spektralphotometer Typ 1600 (Perkin Elmer). Dabei wurde die Substanz als Kaliumbromidpressling (1,2 mg Substanz in 300 mg KBr, Kaliumbromid für die IR-Spektroskopie, Fa. Fluka) vermessen.

8.4.3 Massenspektroskopie (MS)

Direkteinlass-Elektronenstoßionisation (DEI)-MS

Die Messung der direkt aufgenommenen EI-MS-Spektren erfolgte an den Massenspektrometern Varian MAT 311A und INCOS 50 (Finnigan MAT). Dabei wurden die Proben, die in der Regel nicht GC-gängig waren, direkt in die Ionenquelle eingelassen.

Chemische Ionisation (CI)-MS

Die CI-Massenspektren wurden am Massenspektrometer INCOS 50 (Finnigan MAT) aufgenommen. NH₃ diente als Reaktandgas für die chemische Ionisation nach Direkteinlass der zu messenden Probe.

Fast-Atom Bombardement (FAB)-Spektroskopie

Die Messungen wurden an einem Gerät Finnigan MAT 8200 durchgeführt. Die Probe selbst wurde in eine Matrix von 3-Nitrobenzylalkohol eingebettet.

8.4.4 LC-MS

Geräte:	LC	Liquid Chromatograph Agilent 1100 Series
		Flussrate: 3 µl/min
	MS	Massenspektrometer LC Q Deca Thermo Quest (Fa. Finnigan)
Verneblertemperatur:		350°C
Ionisierung:		Spray voltage 5.0 kV
		Capillary voltage -15.4
Trennmethode:		A: Acetonitril p.a
		B: Wasser + 0,1 % Ameisensäure
		0-5 min 10 % A, 35 - 46 min linear auf 100 % A; 46 - 60 min linear auf 10 % A
		Flussrate: 0,2 ml/min

Bei den HPLC-MS-Messungen wurde die Ionisierung mittels Elektrospray herbeigeführt. Diese sehr schonende Ionisierungsmethode war gut geeignet zur Detektion von Quasimolekülpeaks der untersuchten Substanzen.

8.4.5 GC-MS

Geräte: Gaschromatograph HP 5890 mit Spliteinlasssystem, massenselektivem Detektor HP 5972 Series (Ionisierungsenergie 70 eV) und HP Chemstation (alles von Hewlett Packard); Quarzkapillarsäule OPTIMA 1 DF (25 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Macherey & Nagel); Trägergas Helium (Reinheitsgrad 5.0); Säulenvordruck $1,16 \times 10^5$ Pa; Trägergasstrom (total) 70 ml/min; Säulendurchflussrate 1,5 ml/min (Split 1:47)

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

8.4.6 NMR-Spektroskopie

Standardmäßig wurde ein Kernresonanz-Spektrometer DRX 500 der Fa. Bruker mit der Messfrequenz 500 MHz eingesetzt. Das Gerät war mit einem TBI- Kopf (triple broadband inverse gradient head) zur Aufnahme von in der Arbeit vorgestellten ^1H - NMR, COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren ausgestattet. Die Aufnahme von ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektren erfolgte mit einem QNP-Kopf (quadro nuclear probe) bei einer Frequenz von 125 MHz. Sämtliche ^{13}C -NMR-Spektren sind protonenbreitbandentkoppelt.

Die isolierten Substanzen wurden in DMSO- d_6 (Fa. Merck, Deuterierungsgrad mind. 99,8 %) oder Chloroform- d (Fa. Merck, Deuterierungsgrad mind. 99,8 %) zur Aufnahme der Spektren gelöst. Für Vergleichswerte mit Literaturdaten musste teilweise auf Aceton- d_6 (Fa. Fluka), Methanol- d_4 (Fa. Merck, Deuterierungsgrad mind. 99,8 %) oder einer 1:1-Mischung aus Chloroform- d / Methanol- d_4 ausgewichen werden.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit Stickstoff begast oder gefriergetrocknet. Unmittelbar vor der Messung wurden sie im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und über Glaswolle filtriert.

Die Kalibrierung der Spektren erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals (siehe Tabelle unten). Ausgewertet wurden alle Spektren mit einer speziellen Software

der Fa. Bruker. Dabei sind die Werte für die chemische Verschiebung (δ) in ppm angegeben, die Einheit der Kopplungskonstanten (J) wurde in Hertz (Hz) berechnet.

Tab. 61: Verschiebungen der verwendeten Lösungsmittelsignale bei NMR-Messungen bezogen auf TMS, die zur Referenzierung herangezogen wurden und deren Signalaufspaltung (nach HESSE *et al.*, 1995)

Lösungsmittel	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
Dimethylsulfoxid- d_6	2,49 ppm (Quintett)	39,7 ppm (Septett)
Chloroform-d	7,24 ppm (Singulett)	77,0 ppm (Triplet)
	3,31 ppm (Quintett)	
Methanol- d_4	3,35 ppm (Singulett)	49,3 ppm (Septett)
	4,78 ppm (Singulett)	
Aceton- d_6	2,04 ppm (Singulett)	29,3 ppm (Septett)
		206,3 ppm (Multiplet)

8.4.7 Optische Drehung

Die Messung der spezifischen Drehung erfolgte unter Verwendung einer Quarzküvette mit der Schichtdicke 1 dm (Mikrozelle 0,35 ml) an einem Polari-meter 341 LC (Fa. Perkin-Elmer) bei 20°C und 589 nm. Als Lösungsmittel diente Ethanol p.a.

8.4.8 Circular dichroismus (CD)

Zur Ermittlung der absoluten Konfiguration am C-2 Kohlenstoffzentrum der Flavanonderivate wurden jeweils CD-Messungen an einem Jasco J-600 Spektralphotometer durchgeführt. Die verwendete Küvette hatte eine Schichtdicke von 0,01 cm. Für die Messungen wurden die Proben jeweils in einer Konzentration von 1 mg/ml Ethanol p.a. gelöst.

8.5 Spezielle Arbeitsmethoden

8.5.1 Soxhletextrakte für pharmakologische Testungen und analytische Identitätsprüfungen

Zumeist wurden zur Untersuchung der unterschiedlichen Drogenmuster 5 g Droge pulverisiert (Drogenmühle vom Typ A10, Fa. Janke & Kunkel, IKA-Werk), anschließend in eine Extraktionshülse (Fa. Macherey & Nagel) eingewogen und mit einem Zellstofftuch abgedeckt. Danach erfolgte eine 2 Stunden dauernde Extraktion im Soxhlet-Verfahren. Dazu wurden 150 ml Lösungsmittel (wahlweise *n*-Hexan, Dichlormethan oder Methanol) benutzt. Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt wurde unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt, dessen Ausbeute bestimmt und zur weiteren Verwendung mit Ethanol aufgenommen. Die Aufbewahrung fand bis zur weiteren Bearbeitung generell im Kühlschrank oder im Eisfach unter -20°C statt.

Bei sukzessiv hergestellten Drogenauszügen wurden unterschiedliche Extraktionsmittel ansteigender Polarität ausgewählt. Dabei wurde die Droge zunächst mit *n*-Hexan extrahiert. Nach Trocknung der Soxhlethülse und des darin enthaltenen Drogenrückstandes schloss sich eine weitere Extraktion mit Dichlormethan unter gleichen Bedingungen wie vorher an. Zum Schluss wurde analog mit Methanol als Lösungsmittel verfahren.

8.5.2 Wässrige Auszüge

5 g gemahlene Droge wurden mit 50 ml Wasser (Aqua ad injectabilia, Fa. Braun) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt, anschließend kurz zum Sieden erhitzt und dann 30 Minuten unter Rühren erkalten gelassen. Die so erhaltene Suspension wurde über einen Blaubandfilter (Fa. Schleicher & Schuell) von Drogenrückständen und Schwebstoffteilchen befreit. Zur Extraktion der lipophilen Verbindungen aus dem wässrigen Extrakt wurden 25 ml des Filtrats auf eine Extrelut[®] 20 Fertigsäule (Fa. Merck) gegeben. Dabei war das Volumen so bemessen, dass es genau zur vollständigen Benetzung des Säulenfüllmaterials ausreichte. Nach 30-minütiger Einwirkungszeit konnte mit 60 ml Chloroform extrahiert werden. Das Eluat wurde am Rotavapor zur Trockene eingeeengt, dessen Ausbeute bestimmt und in 1 ml Ethanol p.a. aufgenommen.

8.5.3 Soxhletextrakt zur Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Sophora flavescens* radix

780 g Wurzeldroge (Muster SF1 von der TCM-Klinik in Kötzing geliefert) wurden in einer Drogenmühle (Commercial Blender, FA. Waring) pulverisiert und mit Dichlormethan (doppelt destilliert) erschöpfend im Soxhlet-Verfahren 75 Stunden lang extrahiert. Dabei wurde etwa alle 8 Stunden der erhaltene Extrakt gegen frisches Lösungsmittel ausgetauscht. Es resultierten nach Entfernen des Lösungsmittels 36 g Rohextrakt (dies entspricht ca. 4,6 % bezogen auf die eingesetzten Drogenmenge) als Ausgangsbasis für die weitere Auftrennung. Der Extrakt war dunkelbraun gefärbt, zähflüssig und hatte einen charakteristischen stumpfen Geruch. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Bearbeitung unter *n*-Hexan im Eisfach bei -20°C .

8.6 Fraktionierung des DCM-Extraktes und wirkungsorientierte Isolierung von Inhaltsstoffen

Zunächst wurde eine Grobfraktionierung des Dichlormethanextraktes mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC) an 180 g Kieselgel 60 in einer vom Glasbläser speziell zu diesem Zweck hergestellten Glassäule durchgeführt. Der Extrakt wurde in zwei Portionen aufgeteilt und in jeweils gleicher Weise an VLC vorgetrennt. Dazu wurden je 18 g Extrakt in Dichlormethan gelöst und mit 2 g Kieselgel suspendiert. Die Suspension wurde zur Eliminierung des Lösungsmittels unter dem Abzug 10 Stunden stehengelassen, bevor sie auf das Kieselgelbett aufgegeben werden konnte. Die Eluierung erfolgte mit jeweils 250 ml *n*-Hexan, Ethylacetat und deren Mischungen nach steigender Polarität. Der im Anschluss noch auf der Säule verbliebene Rückstand des Extraktes wurde mit Methanol gespült (Fraktion 22). Allerdings wurden hier beträchtliche Mengen von Kieselgel miteluiert, so dass von einer weiteren phytochemischen Untersuchung dieser Fraktion abgesehen wurde. Es resultierten 22 Fraktionen, deren Inhaltsstoffmuster zunächst dünnschichtchromatographisch und per HPLC untersucht wurde. Fraktionen, die sich kaum voneinander unterschieden, wurden zusammengefasst.

Die nun entstandenen Hauptfraktionen wurden bis auf Fraktion 22 auf deren Hemmung im 5-Lipoxygenasetest geprüft und jeweils die entsprechenden IC₅₀-Hemmwerte bestimmt.

Tab. 62: Grobfractionierung des Dichlormethanextraktes nach VLC

Fraktion	<i>n</i> -Hexan (ml)	Ethylacetat (ml)	Methanol (ml)	Ausbeute (mg)	IC ₅₀ -Wert bei der 5- LOX-Hemmung (µg/ml)
I	1	250	-	1553	
	2	237,5	12,5		
	3	225	25		
	4	212,5	37,5		
	5	200	50		
	6	187,5	62,5		
	7	175	75		
II	8	162,5	87,5	586	21,4
III	9	150	100	865	17,8
IV	10	137,5	112,5	760	7,5
V	11	125	125	951	5,3
VI	12	112,5	137,5	1175	5,7
	13	100	150		6,1
	14	87,5	162,5		6,3
VII	15	75	175	1462	5,9
	16	62,5	187,5		5,4
	17	50	200		5,1
VIII	18	37,5	121,5	2289	5,8
	19	25	225		6,6
	20	12,5	237,5		6,1
	21	-	250		6,8
IX	22	-	-	4 x 250	3275

Die eingesetzten Fließmittelmischungen bei durchgeführten Trennungen mittels MPLC oder semipräparativer HPLC wurden stets dem anstehenden Trennproblem angepasst. Hier orientierten wir uns an zuvor aufgenommenen HPLC-Chromatogrammen (Programm: LC1) der zu bearbeitenden Fraktion.

Eine Übersicht zur Inhaltsstoffführung der einzelnen Fraktionen und Ausbeuten der isolierten Inhaltsstoffe gibt die folgende Abb. 130.

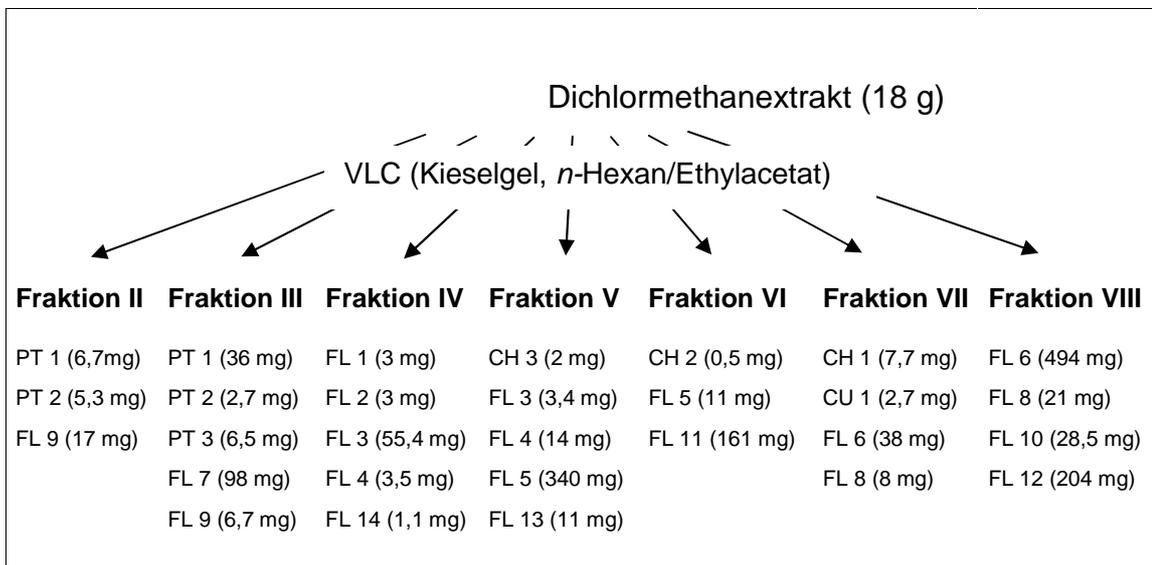


Abb. 130: Isolierte und identifizierte Inhaltsstoffe aus den einzelnen Fraktionen des Dichlormethanextraktes nach VLC-Trennung

8.6.1 Phytochemische Untersuchung der Fraktion II

Die Fraktion II mittels MPLC an RP-18 Material (Säule 3) fraktioniert. Dazu wurde die gesamte Fraktion auf das Säulenmaterial aufgegeben und zur peakorientierten Gewinnung der Unterfraktionen bei UV 220 nm detektiert (Flussrate: 5 ml/min; Dauer der Trennung: 195 min). Nach DC-Prüfung konnten drei Fraktionen (U II1-3) gebildet werden. FL 9 (Kushenol A) konnte aus U II-3 mit 17 mg rein gewonnen werden und bildete nach Eliminierung des bei der Trennung verwendeten Acetonitrilanteils und anschließender Lyophilisation ein gelbes amorphes Pulver.

Mit einer Unterfraktion (U II-2) (51,4 mg), die die beiden später isolierten Pterocarpanderivate PT 1 und PT 2 beinhaltete, wurde erneut eine MPLC-Trennung an RP-18 Material (Säule 2) durchgeführt. Da hier lediglich eine Anreicherung der Substanzen erzielt werden konnte, schloss sich eine Auftrennung mit semipräparativer HPLC, ebenfalls an Umkehrphase, an. Die Separierung der beiden recht ähnlichen Substanzen erfolgte isokratisch bei 40 % Acetonitril und 60 % Wasser (Flussrate: 3 ml/min, jeweiliges Einspritzvolumen:

100 µl). Dabei wurde sowohl Maackiain (PT1) als auch Medicarpin (PT2) isoliert.

8.6.2 Weitere Auftrennung der Fraktion III

Die Fraktion III wurde in 3 ml Ethanol und 1 Tropfen CH₂Cl₂ als Lösungsmittel gelöst und durch Mitteldruckflüssigchromatographie (Säule 3) aufgetrennt. Bei einem Flow von 5 ml/min konnten nach 5 h zunächst fünf Unterfraktionen (U III1-5) peakorientiert (parallel ablaufende UV-Detektion bei 220 nm) eluiert werden.

Programmeinstellung: 120 min 70-50 % Wasser (linearer Gradient), 120 min 50-10 % Wasser (linearer Gradient), 180 min 10 % Wasser (isokratisch)

Die hydrophilste Unterfraktion (U III-1) wurde über semipräparative HPLC getrennt (Flussrate: 3 ml/min, Einspritzvolumen: 100 µl, Probenkonzentration: 10 mg/ml in Ethanol, Aufgabemenge: 30 mg). Programmeinstellung: 40 min 60-55 % Wasser (linearer Gradient), 20 min 55-35 % Wasser (linearer Gradient). Dabei wurden erneut Maackiain (PT1) und Medicarpin (PT2) gewonnen. Ein weiteres Pterocarpanderivat Anhydrovariabilin (PT3) konnte rein isoliert werden, nachdem eine andere Unterfraktion (U III-2) (18 mg) mit semipräparativer HPLC aufgereinigt worden war (Programmeinstellung: 20 min 30-25 % Wasser, 8 min 25-15 % Wasser (jeweils linearer Gradient), Probenkonzentration: 10 mg/ml in Acetonitril, Einspritzvolumen pro Lauf: 100 µl, Flussrate: 3 ml/min).

Isokurarinon (FL 7) lag bereits nach der ersten MPLC-Trennung (U III-3) rein vor und bedurfte somit keiner weiteren Aufreinigung.

Die vierte Unterfraktion (U III-4) (74,8 mg) war schlecht löslich in Ethanol und wurde daher in Acetonitril gelöst. Die Auftrennung erfolgte per MPLC an RP-18 Material (Säule 2). Dabei konnte neben Kushenol A (FL9) ein weiteres Flavanon, Isokurarinon (FL7), eluiert werden.

Programmeinstellung: 45 min 50-45 % Wasser, 60 min 45-35 % Wasser, 45 min 35-30 % Wasser (jeweils linearer Gradient mit einer Flussrate von 1 ml/min).

8.6.3 Isolierung der Inhaltsstoffe aus Fraktion IV

Auch bei dieser Fraktion erfolgte eine Auftrennung per MPLC (Säule 3). Die Flussgeschwindigkeit wurde während der Trennung auf 3 ml/min reguliert (Fließmittel: Acetonitril/Wasser, Gradient: 10-55% Acetonitril in 120 min, 55 % MeCN isokratisch). Es resultierten vier Unterfraktionen zur Weiterbearbeitung. Aus Fraktion U IV-3 (26,3 mg) konnten via präparativer DC Biochanin A (FL 14), Sophoraflavanon B (FL1) und Exiguaflavanon K (FL2) in reiner Form erhalten werden (Mobile Phase: Standardfließmittel).

Aus der Fraktion U IV-5 gelang es nach erneuter Aufreinigung mittels MPLC (Säule 1) Kushenol E (FL3) rein zu gewinnen. Kushenol B (FL4) konnte nach gleicher Methode (diesmal Säule 2 verwendet) aus U IV-7 eluiert werden.

8.6.4 Die Aufarbeitung der Fraktion V

Die erste Trennoperation bei Fraktion V bestand aus einer MPLC Trennung (Säule 3, Flow: 2,5 ml/min). Nach 14 h Elutionszeit wurde Kushenol M (FL13) rein erhalten.

Zudem wurden sechs Unterfraktionen gebildet, von denen vier weiter bearbeitet werden sollten. U V-2 (525 mg) wurde auf eine Kieselgelsäule (Säulenlänge 55 cm, $\varnothing_{\text{innen}}$ 2 cm, Füllung: 65 g Kieselgel) mit CH_2Cl_2 /Methanol als Fließmittel gegeben und daraus Sophoraflavanon G (FL5) isoliert (eluiert bei CH_2Cl_2 /Methanol 98 + 2, nach prozentualem Anstieg des Methanolanteils). Aus U V-3 (263 mg) konnten nach SC-Trennung, die in gleicher Weise durchgeführt wurde wie bei der Auftrennung von U V-2, Kushenol E (FL3) und Norkurarinol (FL10) rein isoliert werden.

Die Isolierung von Kushenchroman A (CH3) gelang aus Unterfraktion U V-4 (13 mg) nach einem weiteren MPLC-Trennungsschritt (Säule 1, Gradient: 10-40 % Acetonitril in 90 min, 45 min isokratisch bei 40 % Acetonitril, 40-60 % Acetonitril in 90 min, Flow: 2 ml/min) nachdem 1 ml Ethanol p.a. zum Lösen der zu trennenden Menge zugegeben worden war.

8.6.5 Auftrennung der Fraktion VI

Nachdem die Fraktion VI in 1 ml Dichlormethan gelöst worden war, wurde sie säulenchromatographisch an Kieselgel als Adsorbens mit CH_2Cl_2 /Methanol (99

+ 1) als Eluentengemisch aufgetrennt (65 g stationäre Phase, Säulenlänge: 55 cm).

Sophoraflavanon G (FL5) und Kuraridin (CH2) wurden erhalten, nachdem die Teilfraktion U VI-7 (83,5 mg) einer MPLC-Auftrennung (Säule 1, Flow: 2 ml/min) unterzogen worden war. Da allerdings Kuraridin noch stark verunreinigt vorlag, war ein weiterer Reinigungsschritt notwendig und gelang schließlich durch semipräparative HPLC. Dazu wurde die Säule Hibar[®] (siehe S. 187) verwendet (Programmeinstellung: 40-60 % Acetonitril in 5 min, 60 % Acetonitril isokratisch für 10 min, 60-90 % Acetonitril in 5 min, 90-40 % Acetonitril in 5 min).

Aus U VI-8 (161 mg) wurde via MPLC (Säule 2) Kushenol P (FL11) erhalten (Programmeinstellung: 20-40 % Acetonitril in 40 min, 40-60 % Acetonitril in 90 min, 60-80 % Acetonitril in 20 min jeweils als Gradient).

8.6.6 Die Fraktion VII und ihre Inhaltsstoffe

Die Aufarbeitung der Grobfraktion VII geschah via MPLC (Säule 4; Eluentengemisch: Acetonitril/Wasser; Gradient: 10-30 % Acetonitril in 60 min, 60 min isokratisch bei 30 % Acetonitril, 30 – 60 % MeCN in 60 min, Flow: 5 ml/min). Nach DC-Analyse zeigte sich, dass 3,6-Dihydroxycumarin (CU1), Kushenol D (CH1), Kurarinon (FL6) und 2'-Methoxykurarinon (FL8) als Reinstoffe vorlagen. Das Cumarinderivat zeichnete sich durch intensive Eigenfluoreszenz aus, die sowohl bereits im Eluentengemisch Acetonitril/Wasser als auch auf der DC-Folie bei UV 366 nm (nach Direktauswertung) beobachtet werden konnte.

8.6.7 Isolierung der Flavonoide aus Fraktion VIII

Zur Isolierung der Inhaltsstoffe aus dieser Fraktion VIII wurde mit einer MPLC Trennung (Säule 4) begonnen. Dabei führte der verwendete Lösungsmittelgradient (Acetonitril/Wasser) programmgesteuert von 10-90 % Acetonitril in 8,5 h (detaillierte Programmbeschreibung: 10 – 40 % Acetonitril in 140 min als Gradient, 90 min isokratisch bei 40% MeCN, 40-60 % Acetonitril in 60 min (linearer Gradient), 120 min isokratisch bei 60% Acetonitril, nochmals Gradient in 110 min bei 60-90 % Acetonitril; Flussrate: 5 ml/min). Nachdem die Eluate zeitorientiert mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen worden waren, konnten die auch im Gesamtextrakt mengenmäßig dominierenden Inhaltsstoffe Kushenol I

(FL 12) und Kurarinon (FL 6) erhalten werden. Zudem fielen 2'-Methoxykurarinon (FL8) und Norkurarinol (FL10) in reiner Form an.

8.7 Gehaltsbestimmungen der Hauptinhaltsstoffe aus *Sophora flavescens* mittels HPLC

Die Gehalte an Norkurarinol, Kurarinon, Sophoraflavanon G, Kushenol I und 2'-Methoxykurarinon wurden mittels HPLC und externer Standardkalibrierung in den Dichlormethanextrakten sechs verschiedener Chargen von *Sophora flavescens* radix bestimmt.

Eichgerade:

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Verdünnungsreihen der Referenzsubstanzen hergestellt, die jeweils 2x in die HPLC eingespritzt wurden (Methode: LC1, Einspritzvolumen: 10 µl). Aus den Mittelwerten der erhaltenen Peakflächen und der Menge an Substanz in µg wurde durch lineare Regression der Eichfaktor als Steigung der Eichgeraden erhalten. Der Korrelationskoeffizient der Eichfaktoren betrug immer > 0,99.

Gleichung für die Eichgerade:

$$y = m \cdot x + b$$

m = Eichfaktor

x = Menge (µg)

y = Peakfläche

b = y-Achsenabschnitt

Tab. 63: Konzentrationen der Eichlösungen

Substanz	Verdünnungen (µg/ml)					
Norkurarinol	1000	750	500	250	125	-
Kurarinon	1000	750	500	250	125	-
Sophoraflavanon G	800	400	200	100	50	25
Kushenol I	1000	750	500	250	125	50
2'-Methoxykurarinon	800	400	200	100	50	25

Extrakte:

Es wurden die Drogenmuster SF1 – SF6 untersucht. Von jeder Drogencharge wurden 2 x 5 g 2 h lang mit 100 ml Dichlormethan in einer Soxhletapparatur extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt, gewogen und mit Ethanol p.a. auf 50,0 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in die HPLC eingespritzt (Methode: LC1; Einspritzvolumen 10 µl).

8.8 Physikalische und spektroskopische Daten der isolierten Verbindungen

PT1: Maackiain (= Inermin, Demthylpterocarpin, 3-Hydroxy-8,9-methylendioxypterocarpan)

Summenformel:	$C_{16}H_{12}O_5$
Molekulargewicht:	284 g/mol
Aussehen:	weiße Kristalle aus Ethanol
CAS-Nr.:	2035-15-6
Opt. Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = -200,4^\circ$ (c = 0,1, EtOH)
UV _{max} :	λ_{max} (nm). = 215,281, 287, 310 nm (in CH ₃ CN/H ₂ O)
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 284 (100) [M] ⁺ , 267 (11), 253 (4), 241 (4), 162 (26), 151 (16), 147 (21), 134 (24), 115 (16), 105 (7), 91 (13), 77 (16), 69 (19)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 77
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 77
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

PT2: Medicarpin (= Demethylhomopterocarpin, 3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)

Summenformel:	$C_{16}H_{14}O_4$
Molekulargewicht:	270 g/mol
Aussehen:	farbloses amorphes Pulver
CAS-Nr.:	33983-39-0
UV _{max} :	λ_{max} (nm) = - 190,8° (c = 0,1, EtOH)
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 270 (100) [M] ⁺ , 269 (47), 255 (37), 237 (5), 197 (11), 161 (23), 148 (42), 147 (32), 137 (18), 115 (21), 107 (7), 105 (12), 91 (19), 77 (36), 63 (28), 55 (17), 51 (31)

DCI-MS:	m/z (rel. Int.): 288 (21); 271 (100) [M+H] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 81
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 81
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

PT3: Anhydrovariabilin (= 3,6-Dimethoxycarp-6a-en)

Summenformel:	C ₁₇ H ₁₄ O ₄
Molekulargewicht:	282 g/mol
Aussehen:	farbloses amorphes Pulver
CAS-Nr.:	1433-08-5
UV _{max} :	λ _{max} (nm) = 215, 234, 250, 290, 340, 356
GC-MS:	m/z (rel. Int.): 283 (51) [M+H] ⁺ , 282 (100) [M] ⁺ , 281 (84), 267 (82), 141 (50), 133 (15), 63 (10)
DCI-MS:	283 [M] ⁺
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 86
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 86
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

FL1: Sophoraflavanon B (Flavaprenin, 8-C-Prenylnaringenin, 4',5,7-Trihydroxy-8-prenylflavanon)

Summenformel:	C ₂₀ H ₂₀ O ₅
Molekulargewicht:	340 g/mol
Aussehen:	gelbes Öl
CAS-Nr.:	72357-32-5
Opt. Drehung:	[α] _D ²⁰ = -6,9° (c = 0,1, in EtOH)
UV _{max} :	λ _{max} (nm) = 195, 217, 230, 295
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 340 (58) [M] ⁺ , 325 (16), 285 (24), 272 (7), 233 (7), 219 (18), 205 (88), 192 (44), 177 (77), 165 (100), 149 (14), 135 (6), 120 (35), 107 (16), 91 (29), 77 (18), 69 (48), 55 (35), 43 (39)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 93
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 93
CD:	332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer

Cotton-Effekt)

DC: R_f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL2: Exiguaflavanon K (= 4',5,7-Trihydroxy-3'-methoxy-8-prenylflavanon)

Summenformel: $C_{21}H_{22}O_6$

Molekulargewicht: 370 g/mol

Aussehen: gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.: 156281-21-9

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -29,2^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 202, 230$ (sh), 292EI-MS: m/z (rel. Int.): 371 [M+H]⁺ (10); 370 [M]⁺ (43); 355 (10); 327 (13); 315 (16); 219 (19); 205 (93); 177 (65); 165 (100); 150 (47), 137 (27), 135 (33), 107 (25), 91 (19), 77 (36), 69 (51), 55 (44), 43 (45)¹H-NMR: siehe Tab. S. 96¹³C-NMR: siehe Tab. S. 97

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL3: Kushenol E (= Flemiphilippinin D, 2',4',5,7-Tetrahydroxy-6,8-diprenylflavanon)

Summenformel: $C_{25}H_{28}O_6$

Molekulargewicht: 424 g/mol

Aussehen: gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.: 99119-72-9

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -26,4^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 202, 223$ (sh), 295FAB: m/z (rel. Int.): 425 (26) [M+H]⁺, 406 (16), 369 (33), 363 (22), 351 (14), 335 (4), 307 (14), 295 (15), 289 (12), 233 (23), 231 (24), 217 (10), 189 (21), 177 (36), 165 (13), 163 (13), 155 (23), 154 (100), 137 (67), 136 (88), 123 (19), 109 (6), 107 (47), 89 (48), 77 (64), 69 (38), 55 (32)¹H-NMR: siehe Tab. S. 102¹³C-NMR: siehe Tab. S. 103

CD:	332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 50
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

FL4: Kushenol B (2',4',5,7-Tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel:	C ₃₀ H ₃₆ O ₆
Molekulargewicht:	492 g/mol
Aussehen:	gelbes amorphes Pulver
CAS-Nr.:	99217-64-8
Opt. Drehung:	[α] _D ²⁰ = -25,9° (c = 0,1, in EtOH)
UV _{max} :	λ _{max} (nm) = 202, 213 (sh), 298
FAB:	m/z (rel. Int.): 493 (20) [M+H] ⁺ , 437 (18), 370 (24), 369 (100), 351 (19), 313 (12), 295 (43), 233 (27), 177 (41), 154 (46), 137 (30), 136 (42), 123 (13), 107 (27), 77 (51), 69 (17), 55 (15)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 107
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 109
CD:	332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

FL5: Sophoraflavanon G (2',4',5,7-Tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel:	C ₂₅ H ₂₈ O ₆
Molekulargewicht:	424 g/mol
Aussehen:	Schwach gelbes amorphes Pulver
CAS-Nr.:	97938-30-2
Opt. Drehung:	[α] _D ²⁰ = -169,0° (c = 0,1, in EtOH)
UV _{max} :	λ _{max} (nm) = 202, 215 (sh), 296
FAB:	m/z (rel. Int.): 425 (29) [M+H] ⁺ , 301 (100), 289 (27), 283 (71), 219 (14), 165 (93), 154 (16), 138 (12), 137 (22), 136 (21), 123 (20), 107 (16), 77 (14), 69 (19), 55 (10)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 113
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 119
CD:	332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL6: Kurarinon 5-Methoxy-2',4',7-trihydroxy-8-lavandulylflavanon

Summenformel: C₂₆H₃₀O₆

Molekulargewicht: 438 g/mol

Aussehen: Gelboranges amorphes Pulver

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -43,5^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 200, 214$ (sh), 289EI-MS: m/z (rel. Int.): 438 (4) [M]⁺, 423 (5), 422 (19), 353 (2), 315 (9), 299 (52), 179 (33), 154 (10), 153 (100), 134 (11), 124 (25), 123 (10), 110 (31), 109 (86), 77 (9), 69 (13), 55 (16), 43 (20)¹H-NMR: siehe Tab. S. 118¹³C-NMR: siehe Tab. S. 119

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL7: Isokurarinon (Leachianon A, Vexibidin, 2'-Methoxy-4',5,7-trihydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel: C₂₆H₃₀O₆

Molekulargewicht: 438 g/mol

Aussehen: Gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.: 52483-02-0

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -61,4^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 200, 228$ (sh), 292EI-MS: m/z (rel. Int.): 438 (9) [M]⁺, 423 (10), 315 (52), 302 (7), 285 (12), 273 (12), 219 (40), 203 (17), 191 (39), 177 (46), 165 (100), 150 (98), 135 (71), 123 (60), 109 (74), 91 (55), 81 (73), 69 (85), 55 (76)¹H-NMR: siehe Tab. S. 122¹³C-NMR: siehe Tab. S. 123

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: *R_f*-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL8: 2'-Methoxykurarinon (= 5-O-Methyleachiaon A; 4',7-Dihydroxy-,5,2'-dimethoxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel: $C_{27}H_{32}O_6$
Molekulargewicht: 452 g/mol
Aussehen: gelbes amorphes Pulver
Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -45,1^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)
UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 201, 230$ (sh), 289
EI-MS: m/z (rel. Int.): 452 (3) [M]⁺, 422 (5), 329 (10), 276 (10), 179 (16), 154 (13), 153 (100), 124 (12), 123 (4), 110 (33), 109 (17), 81 (20), 69 (21), 55 (24), 43 (24)
¹H-NMR: siehe Tab. S. 126
¹³C-NMR: siehe Tab. S. 127
CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)
DC: *R_f*-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL9: Kushenol A (= 2',5,7-Trihydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel: $C_{25}H_{28}O_5$
Molekulargewicht: 408 g/mol
Aussehen: gelbes amorphes Pulver
CAS-Nr.: 99217-63-7
Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -92,5^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)
UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 195, 230$ (sh), 293
DCI-MS: m/z (rel. Int.): 510 [MH+2 Acetyl] (38), 468 [MH+Acetyl] (51), 409 [MH] (100), 314 (24), 281 (14), 123 (21)
¹H-NMR: siehe Tab. S. 131
¹³C-NMR: siehe Tab. S. 132
CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)
DC: *R_f*-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL10: Norkurarinol (= 4'',5''-Dihydro-5''-hydroxy-2',4',5,7-tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel: $C_{25}H_{30}O_7$

Molekulargewicht: 442 g/mol

Aussehen: Gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.: 52483-02-0

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +50,0^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)

UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 200, 225$ (sh), 298

EI-MS: m/z (rel. Int.): 454 (7) [M]⁺, 331 (29), 313 (21), 303 (38), 179 (100), 165 (5), 153 (56), 123 (52), 107 (5), 69 (27), 55 (15)

FAB: m/z (rel. Int.): 443 (14) [M+H]⁺, 406 (3), 329 (48), 307 (100), 301 (56), 299 (11), 289 (79), 283 (33), 273 (20), 272 (13), 259 (13), 258 (12)

¹H-NMR: siehe Tab. S. 136

¹³C-NMR: siehe Tab. S. 137

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL11: Kushenol P (= 4'',5''-Dihydro-2'-methoxy-5,7,4',5''-tetrahydroxy-8-lavandulylflavanon)

Summenformel: $C_{26}H_{32}O_7$

Molekulargewicht: 456 g/mol

Aussehen: schwach gelbes amorphes Pulver

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -75,1^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)

UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 200, 225$ (sh), 296

FAB: m/z (rel. Int.): 457 (11) [M+H]⁺, 315 (39), 307 (27), 289 (21), 273 (4), 212 (8), 165 (17), 154 (100), 137 (50), 136 (63), 123 (6), 107 (16), 77 (14)

¹H-NMR: siehe Tab. S. 139

¹³C-NMR: siehe Tab. S. 137

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL12: Kushenol I

Summenformel: $C_{26}H_{30}O_7$

Molekulargewicht: 424 g/mol

Aussehen: gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.: 99119-60-4

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 39^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)

UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 202, 224$ (sh), 298

EI-MS: m/z (rel. Int.): 424 (12) [M]⁺, 331 (17), 303 (23), 302 (5), 179 (100), 165 (7), 153 (10), 123 (13), 69 (7), 55 (3)

¹H-NMR: siehe Tab. S. 143

¹³C-NMR: siehe Tab. S. 144

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL13: Kushenol M

Summenformel: $C_{30}H_{36}O_7$

Molekulargewicht: 508 g/mol

Aussehen: gelbes amorphes Pulver

Opt. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = + 47,1^\circ$ (c = 0,1, in EtOH)

UV_{max}: $\lambda_{max.}(nm) = 202, 230$ (sh), 297

EI-MS: m/z (rel. Int.): 508 (0,1) [M]⁺, 385 (0,2), 368 (0,3), 233 (0,4), 191 (0,6), 177 (0,8), 175 (0,4), 136 (0,5), 123 (1), 109 (2), 84 (79), 77 (0,2), 69 (4), 66 (100), 55 (3)

¹H-NMR: siehe Tab. S. 147

¹³C-NMR: siehe Tab. S. 148

CD: 332 nm (positiver Cotton-Effekt); 291 nm (negativer Cotton-Effekt)

DC: R_f-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59

HPLC: Retentionszeit siehe Tab. 60

FL14: Biochanin A (= 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon)

Summenformel:	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Molekulargewicht:	284 g/mol
Aussehen:	schwach gelbes amorphes Pulver
CAS-Nr.:	491-80-5
UV _{max} :	λ _{max} .(nm) = 197, 213 (sh), 261
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 285 (18) [M+H] ⁺ , 284 (100) [M] ⁺ , 283 (20), 269 (17), 255 (5), 184 (8), 152 (21), 132 (58)
¹ H-NMR:	δ(ppm) (500 MHz, DMSO-d ₆) 12,88 (5-OH; s); 8,48 (7-OH; s); 8,25 (1H; s; H-2); 7,48 (2H; d; 8,8 Hz; H-2' und H-6'); 6,98 (2H; d; 8,8 Hz; H-3' und H-5'); 6,21 (1H; br s; H-8); 6,06 (1H; br s; H-6); 3,77 (3H; s; OCH ₃)
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

CH1: Kushenol D (= 2,6'-Dimethoxy-2',4,4'-trihydroxy-3'-lavandulylchalcon)

Summenformel:	C ₂₇ H ₃₂ O ₆
Molekulargewicht:	452 g/mol
Aussehen:	gelbes amorphes Pulver
CAS-Nr.:	99217-65-9
Opt. Drehung:	[α] _D ²⁰ = -19° (c = 0,1, EtOH)
UV _{max} :	λ _{max} .(nm) = 204, 250 (sh), 320 (sh), 381
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 452 (23) [M] ⁺ , 422 (3), 329 (41), 299 (7), 233 (11), 179 (100), 153 (33), 137 (9), 124 (16), 123 (7), 109 (17), 77 (2), 69 (15), 55 (12)
FAB:	m/z (rel. Int.): 453 (4) [M+H] ⁺ , 329 (16), 307 (11), 179 (26), 177 (16), 176 (43), 165 (12), 154 (100), 137 (61), 136 (94), 123 (12), 107 (42), 89 (52), 77 (66), 69 (22), 55 (29)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 153
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 155
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

CH2: Kuraridin (= 2,2',4,4'-Tetrahydroxy-3'-lavandulyl-6'-methoxychalcon)

Summenformel:	C ₂₆ H ₃₀ O ₆
Molekulargewicht:	438 g/mol
Aussehen:	gelbes amorphes Pulver

CAS-Nr.:	34981-25-4
Opt. Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ (c = 0,1, EtOH)
UV _{max} :	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm) = 202, 255 (sh), 320 (sh), 382
FAB:	m/z (rel. Int.): 439 (12) [M+H] ⁺ , 315 (29), 303 (11), 297 (23), 233 (7), 179 (100), 177 (10), 176 (36), 154 (62), 137 (39), 136 (61), 123 (15), 107 (32), 105 (15), 77 (47), 69 (34), 55 (34)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 158
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

CH3: Kushenchroman A (3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-[5-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-3-(3-methylbuten-2-enyl)-chroman-6-yl]-propenon)

Summenformel:	C ₂₆ H ₃₀ O ₆
Molekulargewicht:	438 g/mol
Aussehen:	Intensiv gelb
Opt. Drehung:	$[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ (c = 0,1, EtOH)
UV _{max} :	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm) = 207, 255 sh, 320 sh, 390
FAB:	m/z (rel. Int.): 439 (17) [M+H] ⁺ , 420 (13), 351 (13), 307 (13), 303 (21), 297 (7), 289 (15), 281 (3), 233 (14), 191 (13), 189 (11), 179 (43), 178 (11), 177 (12), 167 (11), 166 (9), 154 (84), 138 (27), 136 (78), 135 (12), 123 (14), 69 (21), 55 (4)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 161
¹³ C-NMR:	siehe Tab. S. 164
DC:	R _f -Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

CU 1: 3,6-Dihydroxycumarin

Summenformel:	C ₉ H ₆ O ₄
Molekulargewicht:	178 g/mol
Aussehen:	farbloses amorphes Pulver
UV _{max} :	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm) = 201,220 sh, 237, 325
EI-MS:	m/z (rel. Int.): 178 (100) [M] ⁺ , 150 (20), 122 (16), 105 (4), 94 (21), 77 (4)
¹ H-NMR:	siehe Tab. S. 168

^{13}C -NMR:	siehe Tab. S. 168
DC:	Rf-Wert und Detektionsverhalten siehe Tab. 59
HPLC:	Retentionszeit siehe Tab. 60

8.9 Pharmakologische Arbeitsmethoden

8.9.1 Der 5-Lipoxygenasetest

Isolierung der Leukozyten aus Schweineblut:

Die für die Tests benötigten Leukozyten wurden stets aus frischem Schweineblut isoliert, das unmittelbar vor der Testdurchführung vom Schlachthof in Düsseldorf geholt worden war. (Bei der Herstellung der zur Isolierung und Test benötigten Lösungen wurde ausnahmslos Aqua ad injectabilia, Fa. Braun verwendet.)

Zur Isolierung der Zellen bedurfte es folgender Pufferlösungen, die jeweils frisch hergestellt wurden:

Lösung 1 Dextranlösung:

1,9 g NaCl (Fa. Merck); 12,0 g Dextran T-500 (Fa. Pharmacia Biotech); H₂O ad 200,0 g

Lösung 2 Waschlösung:

1,48 mg CaCl₂ x 2 H₂O p.a. (Fa. Jansen Chimica); 0,2 g wasserfreie D-Glucose (Fa. Merck); 0,04 g MgCl₂ x 6 H₂O (Fa. Merck); 0,08 g KCl (Fa. Merck); 3,5 g TRIS p.a. (Fa. USB); H₂O ad 160 g
pH-Einstellung (auf pH 7,6) mittels Zusatz von 1 N HCl (Fa. Merck); H₂O ad 200,0 g

Lösung 3 Lysierlösung:

0,17 g NH₄Cl (Fa. Jansen Chimica); 0,2 g TRIS, H₂O ad 80 g,
Einstellung auf pH 7,2 mit 1 N HCl; H₂O ad 100,0 g

Lösung 4 Pufferlösung für den Testansatz Variante A:

4,066 g Na₂HPO₄ (Grüssing Diagnostica); 9,0 g NaCl; H₂O ad 800 g; Einstellung auf pH 7,4 mit HCl; H₂O ad 1000,0 g

Lösung 4a Pufferlösung für den Testansatz Variante B:

5,25 g TRIS p.a.; 2,7 g NaCl; H₂O ad 200,0 g; Einstellung auf pH 7,4 mit HCl; H₂O ad 300,0 g

Lösung 5 Antikoagulans:

1,8 g NaCl; 8,0 g Na-Citrat x 2 H₂O (Fa. J.T. Baker); 20µl Heparin (Liquimin[®], Fa. Roche); H₂O ad 200 g

Lösung 6 Kulturlösung:

2,0 g NaCl; 0,05 g KCl (Fa. Merck); 0,287 g Na₂HPO₄; 0,05 g KH₂PO₄ (Grüssing Diagnostica); 0,45 g Glucose; H₂O ad 200,0 g; Einstellung des pH 7,4 mit 1 N NaOH (Bernd Kraft GmbH); H₂O ad 250,0 g

Das frische Schweineblut (pro Gefäß ca. 400 ml des ersten Blutstrahls eines gerade geschlachteten Schweins) wurde in zwei 500 ml Plastiksraubgefäßen (Charge 1 bzw. 2), in denen je 100 ml der Lösung 5 vorgelegt worden waren, aufgefangen. Diese Mischungen wurden anschließend in zwei 500 ml Glasmesszylinder auf jeweils 100 ml der hypertonen Lösung 1 gegeben und der Ansatz 60 min lang zur Sedimentation der Erythrozyten stengelassen. Bei den anschließenden Arbeitsschritten wurde streng darauf geachtet, dass die beiden Blutchargen nicht vertauscht oder vermischt wurden. Die überstehende Lösung, bestehend aus Leukozyten, Thrombozyten, verbliebenen Erythrozyten und Plasma wurde in 6 Falconröhrchen pro Blutcharge (Fa. Greiner, Labortechnik) überführt und 10 Min. bei 1600 rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C, Modell J-6, Fa. Beckmann) zentrifugiert. Der resultierende Überstand aus Thrombozyten und Plasma wurde verworfen, und das Pellet, welches die Leukozyten enthielt, wurde mit Waschlösung (Lsg. 2) ad 10 ml resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 1600 rpm). Zur Lyse der noch im Pellet befindlichen Erythrozyten wurden nach Verwerfen des Überstandes 10 ml der hypotonen Lösung 3 in jedes Falconröhrchen gegeben und unter gelindem Schwenken 5 min lysiert. Es schloss sich eine erneute Zentrifugation von 5 min mit 1400 rpm an. Wiederum wurde der Überstand verworfen und der Rückstand mit jeweils 10 ml Lösung 2 gewaschen. Danach wurde 15 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Für die sofortige Verwendung wurden die auf diese Weise isolierten neutrophilen Granulozyten in 40 ml Lösung 4 suspendiert (Test-

Variante A). Bei der Durchführung der Test-Variante B wurden die Zellen mit Lösung 4a suspendiert, denn zum Verdünnen der Zellen auf die entsprechende Testkonzentration darf bei Detektion mittels EIA kein Phosphatpuffer verwendet werden. Die zur Aufbewahrung bestimmten Leukozyten der zweiten Blutcharge wurden in 100 ml Lösung 6 aufgenommen und in einer Kultivierungsflasche (Fa. Greiner Labortechnik) bis zum nächsten Tag bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Diese aufbewahrten Zellen dienten zur eventuell notwendigen Testung am darauffolgenden Tag (max. 24 h später). Dazu musste dann die Suspension in Falconröhrchen (Fa. Greiner Labortechnik) überführt, zentrifugiert (15 Minuten bei 1400 rpm) und das Pellet anschließend für die Vitalitätsprüfung und Bestimmung der Zellzahl in ca. 40 ml Pufferlösung für den Testansatz suspendiert werden.

Vitalitätsprüfung der Zellen:

Unmittelbar vor jeder Testdurchführung wurden die isolierten Leukozyten auf ihre Vitalität geprüft. Dabei kann der Farbstoff Trypanblau durch die durchlässigen Zellwände toter Zellen eindringen. Diese Zellen erscheinen dann voluminöser und grenzen sich somit von vitalen Zellen ab.

10 µl Trypanblau (Fa. Merck) wurden mit 50 µl Zellsuspension auf einem Objektträger vermischt und bei 1000-facher Vergrößerung im Mikroskop mit Hilfe von Immersionsöl (Fa. Roth) betrachtet. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{lebende Zellen} \cdot 100}{\text{lebende} + \text{tote Zellen}}$$

Die Leukozyten waren dann für den Test geeignet, wenn ihre Vitalität mindestens 95 % betrug, was in der Regel der Fall war.

Bestimmung der Zellkonzentration:

Die für den Test benötigte Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer-kammer ermittelt. Für die Test-Variante A wurde mit Lösung 4 auf $1,5 \times 10^4$ Zellen/µl eingestellt, bei der Test-Variante B wurden 2×10^4 Zellen/µl benötigt (mit Lösung 4a eingestellt).

Dazu wurden 2 x 10 µl von einer Mischung aus 10 µl Zellsuspension mit 990 µl wässriger Türks-Lösung (Fa. Merck) in eine Neubauerkammer pipettiert. Anschließend wurden bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop zweimal vier Quadrate der Kammer ausgezählt, wobei die Abweichung beider Flächen kleiner als 10 % sein musste.

Test-Variante A

Der Test wurde in abgewandelter Form (Zschocke, 1998), nach der Methode von Wagner und Fessler (1986) bzw. Fessler (1988) durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Bevor die Proben in Ethanol p.a. gelöst wurden, erfolgte eine auf zwei Kommastellen genaue Probeneinwaage in mg.

Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2,6 ml, wovon 50 µl auf das darin enthaltene Probenvolumen entfielen. Somit galt für die Probeneinwaage des jeweiligen zu testenden Extraktes:

$$2,6 \text{ mg Probe pro ml EtOH} \triangleq 50 \mu\text{g Probe pro ml Testansatz}$$

Inkubation:

Die Inkubation erfolgte in 10 ml Zentrifugenschliffgläsern. Der Inkubationsansatz enthielt 2,5 ml Leukozytenzellsuspension, 2 mM CaCl₂, 10 µM 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (Fa. Sigma), 17,6 µM Ca-Ionophor A 23187 (Fa. Boehringer Mannheim), 50 µl Probenlösung bzw. Ethanol für die Kontrollen und 10 µl einer 9 µM (0,1 µCi abs.) ¹⁴C-Arachidonsäurelösung (Fa. Amersham) in Ethanol. Der Ansatz wurde 8 min. im Schüttelwasserbad (Julabo SW-21, Fa. Julabo) bei 37°C und 185 rpm inkubiert. Anschließend wurde mit 10 µl 25 %iger NaOH und 520 µl 1 %iger Ameisensäure (Fa. Riedel-de-Haën) die Reaktion abgestoppt.

Als Positivkontrolle wurde Nordihydroguajaretsäure (Fa. Sigma) mit einem IC₅₀-Wert von 0,5 µM eingesetzt.

Präparierung der Proben für die HPLC-Analyse:

Die Arachidonsäure und ihre Metabolite wurden aus dem Testansatz durch Ausschütteln (75 sec am Whirleymixer) mit 4 ml Ethylacetat (Fa. Baker) extrahiert und nach Eliminierung des Lösungsmittels am Rotavapor in 100 µl Ethanol aufgenommen.

Auswertung der Ergebnisse:

Die Auswertung erfolgte mittels HPLC (Methode LIPO) unter Verwendung des Radioaktivitätsdetektors.

Zur Berechnung der Hemmwerte wurden aus den HPLC-Chromatogrammen jeweils nur die AUC der Peaks von 5-HETE, LTB₄ und Arachidonsäure integriert. Die für eine Probe bestimmte Fläche des LTB₄-Peaks wurde auf die mittlere Fläche der entsprechenden Peaks in gleichbehandelten Ethanolkontrollen (= 100 %) bezogen.

Die durch Inhibitor bewirkte Hemmung der Leukotrienbiosynthese wurde als prozentuale Hemmung (% Inh.) angegeben. Zur Berechnung der prozentualen Hemmung diente folgende Formel:

$$\% \text{ Inh.} = 100 - \frac{\text{AUC}_{\text{LTB}_4} (\text{Probe}) \cdot 100}{\text{AUC}_{\text{LTB}_4} (\text{Kontrolle})}$$

Berechnung des IC₅₀-Wertes (halbmaximale Hemmung):

Um den IC₅₀-Wert eines Extraktes zu ermitteln, wurden mindestens drei Konzentrationen des Inhibitors in mindestens drei Tests eingesetzt. Aus den erhaltenen Mittelwerten für jede der Konzentrationen wurde der IC₅₀-Wert wie folgt für die logarithmische Regression berechnet:

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

$$\text{IC}_{50} = e^{\frac{50 - A}{B}}$$

Test-Variante B

Der Test wurde in Anlehnung an Paulus und Bauer (1999) im Mikrotitermaßstab durchgeführt. Dabei erfolgte die Detektion mittels eines LTB₄ Enzym-Immuno-Assay (EIA) Testkits.

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden in Ethanol p.a. gelöst, nachdem eine auf zwei Kommastellen genaue Einwaage erfolgt war.

Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2,65 ml, wovon 5 µl auf das darin enthaltene Probenvolumen entfielen. Demnach galt für die Proben-einwaage von Extrakten bzw. Fraktionen:

$$2,65 \text{ mg Extrakt/Fraktion pro ml EtOH} \triangleq 50 \text{ µg Extrakt/Fraktion pro ml}$$

Testansatz

Berechnungsgrundlage für Reinsubstanzen:

$$(M_R \text{ der Reinsubstanz} \cdot 0,00265) \text{ mg/ml EtOH} \triangleq 50 \text{ µM/ml Probenkonz. im}$$

Testansatz

Inkubation:

Die Inkubation wurde auf einer Mikrotiterplatte (Fa. Greiner Labortechnik) mit 96 Wells durchgeführt. Dabei enthielt der Inkubationsansatz 225 µl Leukozyten-zellsuspension, 2 mM CaCl₂, 10 µM 5,8,11,14-Eicosatetraensäure, 15 mM Ca-ionophor A 23187, sowie 5 µl Probenlösung bzw. Ethanol für die Kontrollen und 0,12 mM ethanolische Arachidonsäurelösung (Fa. Cayman Chemical). Nach Beendigung einer 10 minütigen Inkubationszeit im Schüttelwasserbad (140 rpm) bei 37°C wurde die Reaktion mit 20 µl 10 %iger Ameisensäure (Fa. Riedel-de-Haën) abgestoppt und die festen Bestandteile durch Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge 15 min bei 1400 rpm abgetrennt. Der resultierende Über-stand wurde vorsichtig abgenommen und mit Pufferlösung 4a (siehe vorne)

1:400 verdünnt. Diese verdünnte Lösung konnte anschließend im EIA-Testkit (Fa. Cayman Chemical) eingesetzt werden.

Als Positivkontrolle wurde 0,53 μM Nordihydroguaiaretsäure (Fa. Sigma) eingesetzt, die in dem verwendeten Testsystem eine halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) von 0,5 μM hat.

Bestimmung der LTB_4 Konzentration:

Die Bestimmung der LTB_4 -Konzentration erfolgte mit einem LTB_4 -EIA-Kit der Firma Cayman Chemical (Best.-Nr. 520111). Die Vorgehensweise war wie in der vom Hersteller beschriebenen Gebrauchsanweisung. Das für die Herstellung der Reagenzien benutzte Wasser musste entionisiertes Wasser sein, damit es nicht zu Nebenreaktionen mit Substanzen des Testkits kommen konnte. Der Testkit basiert auf einem kompetitiven Enzym-Immuno-Assay, mit dem Tracer LTB_4 -Acetylcholinesterase-Konjugat, spezifischen LTB_4 -Antikörpern zur Bindung von LTB_4 bzw. LTB_4 -Tracer und Ellmann's Reagenz zur Detektion. Alle 96 Wells der Mikrotiterplatte sind mit unspezifischen monoklonalen Maus-Anti-Kaninchen Antikörpern beschichtet, die für die Bindung der LTB_4 -Antikörper an die Platte sorgen.

Zur Inkubation wurden spezifische Antikörper, eine definierte Menge an LTB_4 -Tracer und Probe gemischt. Dabei binden die spezifischen Antikörper an die unspezifischen Antikörper der Plattenbeschichtung. In einer kompetitiven Reaktion binden entweder LTB_4 oder LTB_4 -Tracer. Je höher nun die LTB_4 -Konzentration der Probe ist, desto weniger LTB_4 -Tracer wird gebunden. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur wurden durch Waschen der Platte mit Waschpuffer (spezielle Zubereitung aus dem zugehörigen Testkit) alle ungebundenen Reagenzien entfernt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von Ellmann's Reagenz für die UV-Detektion, die nach weiteren 60-90 min Reaktionszeit (unter Lichtausschluss) und Schütteln am Horizontalschüttler (Fa. IKA, Schüttelgeschwindigkeit 400 rpm) stattfand. Wie die unten abgebildete Reaktion zeigt, wird dabei die Enzymaktivität des LTB_4 -Acetylcholinesterase-Konjugates zur Bildung eines gelben Farbstoffes (5-Thio-2-nitrobenzoesäure) ausgenutzt. Dessen Konzentration wurde schließlich spektralphotometrisch mit einem ELISA-Reader (Tecan Rainbow, Firmware

V.1.50) bei einer Detektionswellenlänge von 412 nm computergesteuert (Software easy WIN fitting, Version V4.0a, Fa. Tecan) bestimmt.

Der LTB₄-Gehalt in der Probe ist umgekehrt proportional zur entstandenen Farbstoffmenge, so dass gilt:

Absorption ~ Konz. des gebundenen LTB₄-Tracer ~ 1/LTB₄-Konzentration

Zur Bestimmung des absoluten LTB₄-Gehaltes wurden für jeden Test sechzehn Standardwerte mit acht unterschiedlichen Konzentrationen des LTB₄ erstellt. Daraus wurde eine Standardkurve aufgestellt, worauf die gemessenen Werte bezogen wurden. Für die Berechnung der prozentualen Hemmung gilt:

$$\% \text{ Inh.} = 100 - \frac{\text{LTB}_4 (\text{Probe}) \cdot 100}{\text{LTB}_4 (\text{Kontrolle})}$$

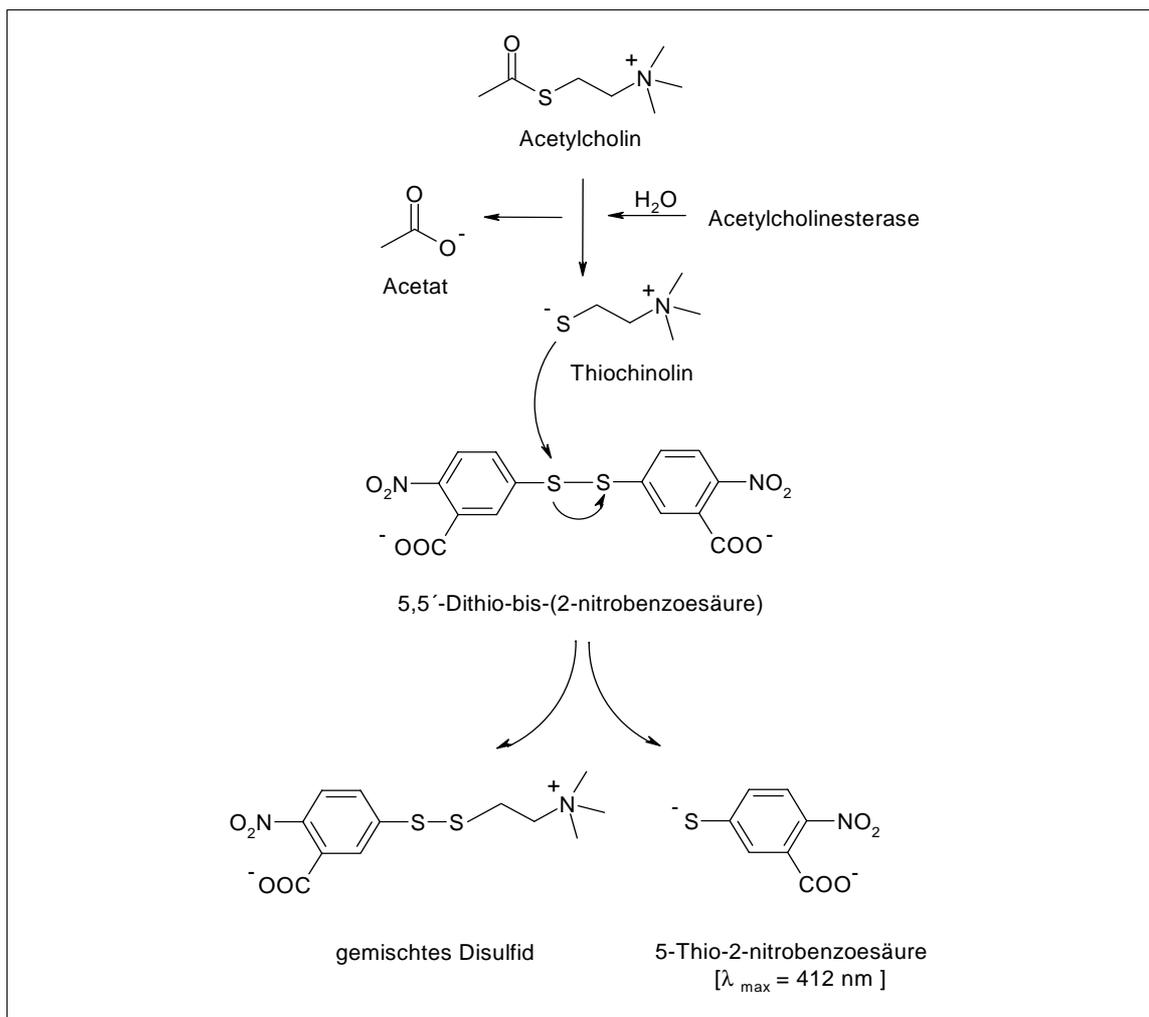


Abb. 131: Detektionsreaktion im verwendeten Assay bei LOX-Testungen

8.9.2 Zytotoxizitätstest mit isolierten Leukozyten aus Schweineblut

2,5 ml Leukozytensuspension wurden mit 50 µl Testlösung (beide genauso vorbereitet wie im 5-LOX-Test) bzw. mit Ethanol als Kontrolle im Schüttelwasserbad 8 min lang bei 37°C und 185 rpm inkubiert. Der Vitalitätstest wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei musste die Vitalität der Kontrollen und die mit der Testlösung behandelten Zellen größer als 95 % sein, ansonsten hätte man von einer zytotoxischen Wirkung der getesteten Substanz in dieser Konzentration auf die Leukozyten ausgehen müssen.

8.9.3 Der Cyclooxygenasetest

Der Test wurde nach der Methode Reininger und Bauer (1999), bzw. Reiniger (2001) durchgeführt.

Im Mikrotitermaßstab konnten auf einer Platte gleichzeitig Untersuchungen zur Hemmung der COX-1 und -2 Enzyme durchgeführt werden. Die benötigten Reinenzyme stammten aus Schafkotyledonen bzw. Schafplazenten und wurden von der Fa. Cayman Chemical bezogen (Johnsen *et al.*, 1995).

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden in Ethanol p.a. gelöst. Zuvor erfolgte die Einwaage auf zwei Kommastellen genau. Da das Gesamtvolumen des Testansatzes 200 µl betrug und von jeder Probe 10 µl einpipettiert wurden, galt:

$$(M_R \text{ der Reinsubstanz} \cdot 0,002) \text{ mg/ml EtOH} \triangleq 100 \text{ µM/ml Probenkonz. im}$$

Testansatz

Inkubation:

Die Inkubation wurde auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells durchgeführt. Der Inkubationsansatz umfasste 20 µl (COX-1-Hemmung) bzw. 10 µl (COX-2-Hemmung), 0,1 mM TRIS/ HCl-Puffer (pH 8,0), 50 µM Na₂EDTA (nur COX-2-Hemmung), 18 mM Adrenalinhydrogentartrat (Fa. Merck), 10 µl Probenlösung bzw. Ethanol für die Kontrollen, 0,2 units Enzympräparation (gelöst in TRIS/ HCl-Puffer, pH 8,0) und 5 µM Hämatin. Nach einer Vorinkubationsphase von 5

Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μM ethanolischer Arachidonsäure gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Schüttelwasserbad (140 rpm) bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 μl 10 %iger Ameisensäure gestoppt. Um die Proben detektieren zu können, wurden sie auf die notwendige PGE_2 -Konzentration (1:15 Verdünnung zur COX-1-Bestimmung; 1:30 bei der COX-2-Bestimmung) mit Assaypuffer (Zubereitung aus dem zugehörigen Testkit) verdünnt und anschließend in die Testkitplatte überführt.

Als Referenzsubstanzen wurden Indometacin (Fa. Sigma) als dualer Hemmstoff beider COX-Enzyme und die spezifischen COX-2-Hemmstoffe Nimesulid und NS-398 (beide Fa. Cayman Chemical) eingesetzt. Die IC_{50} -Werte der Referenzen betragen für die COX-1-Hemmung 0,8 μM , 246 μM und 51 μM (Indometacin, Nimesulid und NS-398) bzw. 0,8 μM , 36 μM und 2,6 μM (Indometacin, Nimesulid und NS-398) für die COX-2-Hemmung.

Bestimmung der PGE_2 -Konzentration:

Die PGE_2 -Konzentration wurde mit einem PGE_2 -EIA-Kit der Firma R&D Systems (Best.-Nr. DE0100) bestimmt. Der Kit wurde nach Firmenbeschreibung angewendet und der Assay nach Gebrauchsanweisung durchgeführt. Die Testgrundlage ist ein kompetitiver Enzym-Immuno-Assay. Der Testkit beinhaltet als Tracer PGE_2 konjugiert gebunden an alkalische Phosphatase, spezifische monoklonale Maus-Antikörper zur Bindung von PGE_2 bzw. PGE_2 -Tracer und p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zur Detektion. Während der Inkubation binden die Maus-Antikörper an polyklonale Anti-Maus-Antikörper mit denen die Innenwände der 96 Wells auf der Mikrotiterplatte ausgestattet sind.

Zur Inkubation wurden eine definierte Menge an PGE_2 -Tracer, spezifische Antikörper und Probe gemischt. In einer kompetitiven Reaktion konkurrieren PGE_2 -Tracer und PGE_2 um die Bindung an die fixierten Anti-Maus-Antikörper auf der Platte. Je höher die PGE_2 -Konzentration ist, desto weniger PGE_2 -Tracer wird gebunden. Während einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde die Platte am Horizontalschüttler (Schüttelgeschwindigkeit 500 rpm bei Raumtemperatur) geschüttelt. Danach schloss sich ein Waschvorgang an, bei dem alle ungebundenen Reagenzien entfernt wurden. In alle leeren Wells wurde pNPP-Substrat gegeben, das in einer enzymatischen Reaktion zum Farbstoff Nitrophenol

umgesetzt wird (siehe Formelschema unten). Es folgte nach 60 Minuten eine computergesteuerte spektralphotometrische Konzentrationsmessung des Farbstoffes mit einem ELISA-Lesegerät bei einer Detektionswellenlänge von 405 nm.

Der PGE₂-Gehalt in der Probe ist umgekehrt proportional zur entstandenen Farbstoffkonzentration, so dass gilt:

$$\text{Absorption} \sim \text{Konz. des gebundenen PGE}_2\text{-Tracer} \sim 1/ \text{PGE}_2\text{-Konzentration}$$

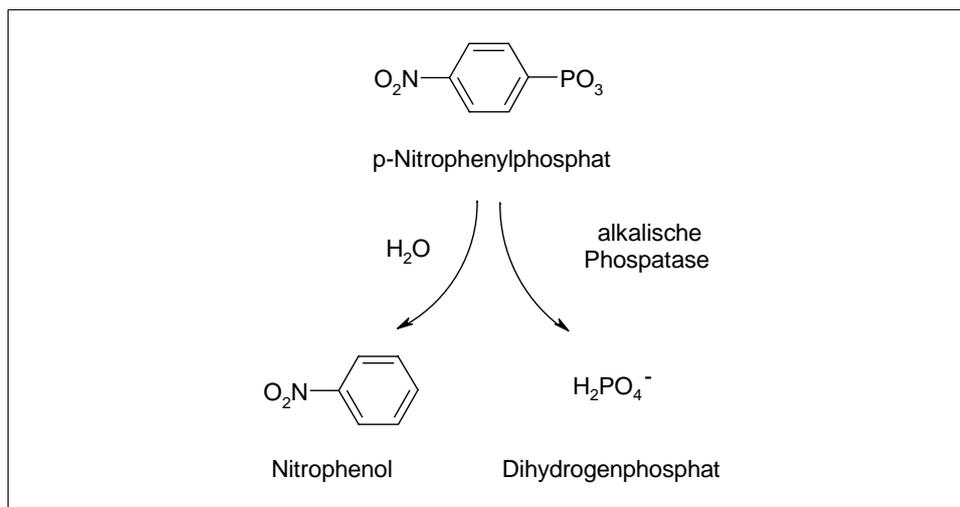


Abb. 131: Stattfindende Detektionsreaktion im verwendeten Assay bei COX-Testungen

Zur Bestimmung des absoluten PGE₂-Gehaltes wurden für jeden Test acht Standardwerte mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen des PGE₂ erstellt. Daraus wurde eine Standardkurve aufgestellt, worauf die gemessenen Werte bezogen wurden. Für die Berechnung der prozentualen Hemmung gilt:

$$\% \text{ Inh.} = 100 - \frac{\text{PGE}_2 \text{ (Probe)} \cdot 100}{\text{PGE}_2 \text{ (Kontrolle)}}$$

8.9.4 DC-Untersuchung auf radikalfangende Eigenschaften mittels DPPH-Reagenz

Bei diesem DC-Nachweis erscheinen Substanzen nach der Reaktion mit 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-(DPPH)-Radikal (Fa. Sigma) als gelblich entfarbte Zonen auf der ansonsten tiefvioletten DC-Platte nach Auswertung im Tageslicht.

Jeweils 20 µl der zu untersuchenden Reinstoffe wurden in einer 1 %igen ethanolischen Lösung auf Kieselgel DC-Alufolien (siehe S. 193) aufgetragen und über eine Laufstrecke von 8 cm im stets verwendeten Fließmittelsystem entwickelt. Die Detektion erfolgte nach Besprühen mit 10 ml DPPH-Reagenz (Yamasaki *et al.*, 1994, abgewandelt nach Lobitz *et al.*, 1998). Der Test diente als Voruntersuchung für den Chemilumineszenz-Test (nach Heilmann, 1997).

8.9.5 Chemilumineszenz-Test mit polymorphkernigen Granulozyten

Sämtliche Untersuchungen zu antioxidativen Eigenschaften mittels Chemilumineszenz-Tests wurden von Dr. J. Heilmann (Inst. für Pharmakognosie, Zürich) am Institut für Klinische Anästhesiologie der Universitätskliniken Düsseldorf durchgeführt.

Isolierung der menschlichen Granulozyten:

Gesunden männlichen und weiblichen Spendern wurde 10 ml venöses Blut entnommen und jeweils 5 ml davon in einem Gewebekulturröhrchen auf 3 ml PolymorphprepTM (Fa. Nycomed, Oslo) geschichtet. Nach 25-minütigem Zentrifugieren (1740 rpm bei 24°C) konnten die Thrombozyten und Monozyten abpipettiert werden und damit die polymorphkernigen Granulozyten gewonnen werden. In einem sich anschließenden Waschvorgang wurden diese zweimal mit HBSS-Puffer (Hanks balanced salt solution ohne Phenolrot; Fa. Gibco) versetzt und jeweils 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 1,00 ml HBSS-Puffer aufgenommen.

Vitalität und Zellkonzentration:

Zur Überprüfung der Reinheit, Vitalität sowie der Zellzahl pro ml wurden 10 µl der Suspension mit 10 µl Trypanblau angefärbt und in einer Neubauerkammer untersucht. Die Einstellung der Zellzahl auf 5×10^6 Zellen pro ml wurde durch Verdünnen des Ansatzes mit HBSS-Puffer ausgeführt. Ansätze mit geringerer Zellkonzentration, einer Lebensfähigkeit < 95 % oder einer Reinheit < 90 % wurden verworfen. Zur Sicherung gleicher Testbedingungen wurden die einge-

stellten Zellsuspensionen stichprobenartig auf einen einheitlichen pH-Wert überprüft.

Probenvorbereitung:

Von den zu testenden Substanzen wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml Ethanol p.a. hergestellt. Diese wurde durch Verdünnen mit HBSS-Puffer auf die gewünschten weiteren Konzentrationen gebracht. Dadurch lag der Ethanolgehalt in jedem Testansatz unter 0,1 %.

Testdurchführung:

Der Test wurde nach der von Weiss *et al.* (1993) beschriebenen Methode durchgeführt.

50 µl der Granulozyten-Suspension 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. Danach wurde die Reaktion mit FMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin; 5×10^{-7} mol; Fa. Sigma) gestartet. Die Verwendung eines computergesteuerten 6-Kanal-Biolumat LB 9505 (Fa. Berthold) erlaubte die gleichzeitige Messung von fünf verschiedenen Substanzkonzentrationen gegen einen Kontrollwert, bei dem die 50 µl Substanzlösung durch HBSS-Puffer ersetzt wurden. Entsprechend den verschiedenen Reaktionskinetiken der durch FMLP induzierten Radikalbildung wurde die entstehende Chemielumineszenz bei 37°C kontinuierlich über einen Zeitraum von 15 min nach Zugabe des Stimulus FMLP gemessen. Die unterschiedliche Messdauer trägt den verschiedenen Reaktionskinetiken des Stimulus Rechnung.

Auswertung:

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

Reduktion in % = 100 -	Fläche _(Substanz) · 100
	Fläche _(Kontrolle)

Jede Testkonzentration wurde siebenmal getestet. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die maximale (absolute) Standardabweichung lag unter 10 %.

Die Substanzkonzentration bei halbmaximaler Reduktion (IC_{50} -Wert) wurde wie im LOX-Test bei der Methode A beschrieben ermittelt.

9. Literaturverzeichnis

- ABBOTT LABORATORIES: Fachinformation zum Medikament "Zyflo" (1998)
- AGRAWAL P.K. (Ed.): "Carbon-13 NMR of Flavonoids." In: Studies in organic chemistry. Bd. 39. Amsterdam, Niederlande, Elsevier (1989)
- BAKER W.; CHADDERTON J.; HARBORNE J.B.; OLLIS W.D.: A new synthesis of isoflavones Part 1. *J. Chem. Soc.* 1852-1860 (1953)
- BARREO A.F.; CABRERA E.; GARCIA I.R.: Pterocarpanes from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochemistry* **48** (1) 187-190 (1998)
- BATIROV E.; YUSUPOVA S.; SATTIKULOV A.; VODOVIN A.; MALIKOV V.; YAGUDAEV M.: Structure of lehmanningin and of ammottamnidin. *Chem. Nat. Prod.* **23** 429-435 (1987)
- BEDIR E.; CALIS I.; AQUINO R.; PIACENTE S.; PIZZA C.: Trojanoside H: A cycloartane-type glucoside from aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry* **51** 1017-1020 (1999)
- BENSKY D.; GAMBLE A.: Chinese Herbal Medicine. Materia Medica, Estland Press, Seattle, (1993)
- BERLIN M.: The role of leukotriene inhibitors in the management of asthma. *Drug Ther. Topics* **28** (3) 13-18 (1999)
- BERTOLINI A.; OTTANI A.; SANDRINI M.: Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: Critical remarks. *Curr. Med. Chem.* **9** 1033-1043 (2002)
- BOHLMANN F.; ATEŞ N.: Three prenylated flavonoids from *Helichrysum athrixifolium*. *Phytochemistry* **23** (6) 1338-1339 (1984)
- BOHLMANN F.; RAHTZ D.; ARNDT C.: Lupinen-Alkaloide.XI. Die Alkaloide aus *Sophora flavescens*. *Chem. Ber.* **91** 2189-2193 (1958)
- BOHLMANN F.; ZDERO C.; KING R.M.; ROBINSON H.: New prenylflavonoids from *Marshallia grandiflora*. *Phytochemistry* **18** 1246-1247 (1979)
- BROCKLEHURST W.E.: The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J. Physiol.* **151** 416-435 (1960)

- BUSSE W. W.: The role of leukotrienes in asthma and allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* **26** 868-879 (1996)
- CHALMERS A.; RALL G.; OBERHOLZER M.: 13-C NMR of pterocarpan. *Tetrahedron* **33** 1735-1737 (1977)
- CHAUDHURI S.K.; HUANG L.; FULLAS F.; BROWN D.M.; WANI M.C.; WALL M.E.; TUCKER J.C.; BEECHLER C.W.W.; KINGHORN A.D.: Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. *J. Nat. Prod.* **58** (12) 1966-1969 (1995)
- CHEN C.; GUO S. M.; LIU B.: A randomised controlled trial of kurarinone versus interferon- alpha 2a treatment in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis* **7** 225-229 (2000)
- CHEN M.; LUO S.Q.; CHEN J.H.: Studies on the chemical constituents of *Flemingia Philippensis*. *Acta Pharm. Sin.* **26** (1) 42-48 (1991)
- CHEN Y.; TIAN R.; KINJO J.; NOHARA T.; KITAGAWA I.: Three new oleanene glycosides from *Sophora flavescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40** (11) 2990-2994 (1992)
- CHI Y.S.; JONG H.G.; SON K.H.; KANG S.S.; KIM H.P.: Effects of naturally occurring flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* **62** 1185-1191 (2001)
- CHOI S.; KIM K.; CHOI E.; PARK S.; LEE C.; JUNG N.; YOON S.; RYU S.: P-glycoprotein (Pgp) does not affect the cytotoxicity of flavonoids from *Sophora flavescens*, which also have no effects on Pgp action. *Anticancer Res.* **19** 2035-2040 (1999)
- COREY E.J.; LANSBURY P.T. JR.; CASHMAN J.R.; KANTER S.S.: Mechanism of the irreversible deactivation of arachidonate 5-lipoxygenase by 5,6-dehydroarachidonate. *J. Am. Chem. Soc.* **106** 1501-1503 (1984)
- CUI J.; ZHANG G.: Analysis of alkaloid constituents in four *Sophora* species. *Bull. Chin. Mater Med.* **11** 102-103 (1985)
- DAHLEN S.E.; HEDQVIST P.; HAMMARSTRÖM S.; SAMUELSSON B.: Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* **288** 484-486 (1980)
- DEWICK P.M.: Biosynthesis of pterocarpan phytoalexins in *Trifolium pratense*. *Phytochemistry* **16** 93-97 (1977)
- DING Y.; TIAN R.; KINJO J.; NOHARA T.; KITAGAWA I.: Three new oleanene glycosides from *Sophora flavescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40** (11) 2990-2994 (1992)
- DRAZEN J.M.; AUSTEN K.F.: Leukotriene and airway responses. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136** 985-998 (1987)
- DRAZEN J.M.; ISRAEL E.; O'BRYNE P.M.: Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *The New Engl. J. Med.* **340** (3) 197-206 (1999)

- ENGLER A.: Syllabus der Pflanzennamen. 12. Ausgabe; MELCHIOR H. (Hrsg.) Bd.2, Bornträger Verlag, Berlin (1964)
- FANTONE J.C.; WARD P.A.: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* **107** (3), 397-418 (1982)
- FELDBERG W.; KELLAWAY C.H.: Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J. Physiol.* **94** 187-226 (1938)
- FESSLER B.: Biologische in-vitro Untersuchungen über 5-Lipoxygenase-Inhibitoren aus Arzneipflanzen und biologisch-chemische Untersuchungen von *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh., Dissertation, Universität München (1988)
- FORTH W.; HENSCHLER D; RUMMEL W.; FÖRSTERMANN U.; STARKE K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag München · Jena, 8. Aufl. (2001)
- FU J.Y.; MASFERRER J.L.; SEIBERT K.; RAZ A.; NEEDLEMAN P.: The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* **256** 16737-16740 (1990)
- FUKAI T.; NOMURA T.: Structure of 6- or 8-isoprenoid substituted flavanone: Chemical shift of the hydrogen-bonded hydroxyl group. *Heterocycles* **31** (10) 1861-1872 (1990)
- FURUYA T.; IKUTA A.: The presence of *I*-maackiain and pterocarpin in callus tissue of *Sophora angustifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **16** (4) 771 (1968)
- GAFFIELD W.: Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. *Tetrahedron* **26** 4093-4108 (1970)
- GENG J.; HUANG W.; REN T.; MA X.: Klassische und bewährte Rezepturen der Chinesischen Arzneimitteltherapie. Band 3. Praxis der Chinesischen Arzneimitteltherapie Dr. Erich Wühr, Kötzing/ Bayer. Wald (1994)
- GERTNER D.J.; RAMPTON D.S.; STEVENS T.R.J.; LENNARD-JONES J.E.: Verapamil inhibits in-vitro leukotriene B₄ release by rectal mucosa in active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **6**, 163-168 (1992)
- GUPTA I.; GUPTA V.; PARIHAR A.; GUPTA S.; LÜTKE R.; SAFAYHI H.; AMMON H.P.T.: Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchal asthma: Results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. *Eur. J. Med. Res.* **3** 511-514 (1998)
- GUPTA I.; PARIHAR A.; MALHOTRA P.; GUPTA S.; LÜTKE R.; SAFAYHI H.; AMMON H.P.T.: Effects of gum resin of *Boswellia Serrata* in patients with chronic cholitis. *Planta Med.* **67** 391-395 (2001)

- HERATH H.M.T.B.; DASSANAYAKE R.S.; PRIYADARSHANI A.M.A.; DE SILVA S.; WANNIGAMA G.P.; JAMIE J.: Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* **47** (1) 117-119 (1998)
- HA T.J.; YANG M.S.; JANG D.S.; CHOI S.U.; PARK K.H.: Inhibitory activities of flavanone derivatives isolated from *Sophora flavescens* for Melanogenesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **22** (1) 97-99 (2001)
- HARBORNE J.B. (Ed.): The flavonoids: Advances in Research since 1986. London Chapman & Hall (1994)
- HARBORNE J.B.; WILLIAMS C.A.: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55** 481-504 (2000)
- HARPER S.H.; KEMP A.D.; UNDERWOOD W.G.E.; CAMPBELL R.V.M.: Pterocarpoid constituents of the heartwoods of *Pericopsis angolensis* and *Swartzia madagascariensis*. *J. Chem. Soc. (C)* 1109-1116 (1969)
- HATAYAMA K.; KOMATSU M.: Studies on the constituents of Sophora species V. Constituents of the root of *Sophora angustifolia* SIEB. et ZUCC. *Chem. Pharm. Bull.* **19** (10) 2126-2131 (1971)
- HEARTH H.M.T.B.; DASSANAYAKE R.S.; PRIYADARSHANI A.M.A.; DE SILVA S.; WANNIGAMA G.P.; JAMIE J.: Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* **47** (1) 117-119 (1998)
- HEILMANN J.; MERFORT I.: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit* **27** (4) 173-183 (1998)
- HERENCIA F.; FERRANDIZ L.; UBEDA A.; DOMINGUEZ J.; CHARRIS J.; LOBO G.; ALCARAZ M.: Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Letters* **8** 1169-1174 (1998)
- HESSE M.; MEIER H.; ZEEH B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*, 4. Aufl. (1991)
- HONDA G.; TABATA M.: Antidermatophytic substance from *Sophora angustifolia*. *Planta Med.* **46** 122-123 (1982)
- HUANG K.C.: The pharmacology of Chinese herbs: Antiarrhythmic herbs. 63-66 CRC press, Tokyo (1993)
- HYUN S.L.; HACK R.K.; SHI Y.R.; WON K.O.; BO Y.K.; SOON C.A.; TAE I.M.; JONG S.A.: Inhibition of Phospholipase C by the Prenylated Flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* **63** 266-268 (1997)
- IINUMA M.; TANAKA T.; MIZUNO M.; SHIRATAKI Y.; YOKOE I.; KOMATSU M.; LANG F.A.: Two flavanones in *Sophora leachiano* and some related structures. *Phytochemistry* **29** (28) 2667-2669 (1990)

- IINUMA M.; YOKOYAMA J.; OHYAMA M.; TANAKA T.; MITUNO M.; RUANGRUNGSI N.: Seven phenolic compounds in the roots of *Sophora exigua*. *Phytochemistry* **33** (1) 203-208 (1993)
- IINUMA M.; YOKOYAMA J.; OHYAMA M.; TANAKA T.; RUANGRUNGSI N.: Eight phenolic compounds in the roots of *Sophora exigua*. *Phytochemistry* **35** (3) 785-789 (1994)
- Japanese Pharm. XIII* Sophora root (official monograph) 911
- JOHNSON J.L.; WIMSATT J.; BUCKEL S.D.; DYER R.D.; MADDIPATI K.R.: Purification and characterization of prostaglandin-H-synthase-2 from sheep placental cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* **324** 26-34 (1995)
- KANG S.S.; KIM J.S.; SON H.K.; CHANG H.W.; KIM H.P.: A new prenylated flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. *Fitotherapia* **71** 511-515 (2000)
- KANG T.; JEONG S.; KO W.; KIM N.; LEE B.; INAGAKI M.; MIYAMOTO T.; HIGUCHI R.; KIM Y.: Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **63** (5) 680-681 (2000)
- KELLAWAY C.H.; TRETHERWIE E.R.: The liberation of slow-reacting smooth muscle stimulating substance in anaphylaxis. *Quart. J. Exp. Physiol.* **30** 121-145 (1940)
- KIM J.S.; HAN S.J.; BYUN J.H.; XU Y.N.; YOO S.W.; KANG S.S.; SON K.H.; CHANG H.W.; KIM H.P.: Minor constituents from the roots of *Sophora flavescens*. *Natural Product Sciences* **7** (1) 5-8 (2001)
- KITAOKA M.; KADOKAWA H.; SUGANO M.; ICHIKAWA K.; TAKI M.; TAKAISHI S.; IJIMA Y.; TSUTSUMI S.; BORIBOON M.; AKIYAMA T.: Prenylflavonoids: A class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8- isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.* **64** 511-515 (1998)
- KO W.G.; KANG T.H.; KIM N.Y.; LEE S.J.; KIM Y.C.; KO G.; RYU S.Y.; LEE B.H.: Lavandulylflavonoids: a new class of in vitro apoptogenic agents from *Sophora flavescens*. *Toxicology in vitro* **14** 429-433 (2000)
- KOJIMA R.; FUKUSH S.; UENO A.; SAIKI Y.: Antitumor activity of Leguminosae plants constituents I. Antitumor activity of constituents of *Sophora subprostata*. *Chem. Pharm. Bull.* **18** (12) 2555-2563 (1970)
- KOMATSU M.; TOMIMORI T.; HATAYAMA K.; MIKURIYA N.: Studies on the constituents of *Sophora* species.IV. Constituents of the root of *Sophora angustifolia* Sieb. et Zucc. *Yakugaku Zasshi* **90** (4) 463-468 (1970)
- KOMATSU M.; YOKOE I.; SHIRTAKI Y.: Studies on the constituents of *Sophora* species XIII. Constituents of the aerial parts of *Sophora tomentosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **26** (12) 3863-3870 (1978)
- KUROSAWA K.; OLLIS W.D.; SUTHERLAND I.O.; GOTTLIEB O.R.: Variabilin, a 6a-hydroxypterocarpan from *Dalbergia variabilis*. *Phytochemistry* **17** 1417-1418 (1978)

- KUROYANGI K.; HATAYAMA K.; KOMATSU M.: Constituents of Chinese drug *Kushen* (the root of *Sophora flavescens* Ait.). Isolation of five new flavonoids and formonetin. *Chem. Pharm. Bull.* **21** (12) 2733-2738 (1973)
- KUROYANGI M.; ARAKAWA T.; HIRAYAMA Y., HAYASHI T.: Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **62** (12) 1595-1599 (1999)
- KYOGOKU K.; HATAYAMA K.; KOMATSU M.: Constituents of Chinese crude drug *Kushen* (the root of *Sophora flavescens* Ait.). Isolation of five new flavonoids and formonetin. *Chem. Pharm. Bull.* **21** (12) 2733-2738 (1973)
- LANDS W.E.M.; LEE R.; SMITH W.: Factors regulating the biosynthesis of various prostaglandins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **180** 107-122 (1971)
- LEE H.; KO H.; RYU S.; OH W., KIM B.; AHN S.; MHEEN T.; AHN J.: Inhibition of phospholipase C by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* **63** 266-268 (1997)
- LEE H.; PARK K.; KWON K.; MUN B.; SONG C.; SONG Y.; SEO E.; KIM Y.; KIM K.; RYU D.: Anti-allergic activity of the *Sophorae radix* water extract in experimental animals. *Am. J. of Chin. Med.* **29** (1) 129-139 (2001)
- LI X.; LI L.; CHEN S.; QUI X.; YU Y.; PAN D.; ZOU L.; YANG Z.: Inhibitory effects of Sophocarpine on animal tumors. *Acta Pharm. Sin.* **5** (2) 125-130 (1984)
- LI Y.; YAO D.; YU S.; WANG J.; LIU C.; CHENG Y.: Neural mechanism of bronchospasmolytic effect oxysophocarpine hydrobromide. *Acta Pharm. Sin.* **3** (8) 169-171 (1982)
- LIU J.H.; ZSCHOCKE S.; BAUER R.: Inhibitory effects of *Angelica pubescens f. biserata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Planta Med.* **64** 525-529 (1998)
- LOBITZ G.O.; HEILMANN J.; ZSCHOCKE S.; TAMAYO-CASTILLO G.; BAUER R.; MERFORT I.: Bornyl cinnamate derivatives with anti-inflammatory activity from *Verbesina turbacensis*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **8** (3) 115-118 (1998)
- LOU Z.; QIN B.: Species, systematisation and quality evaluation of commonly used Chinese traditional drugs, Joint publisher of Peking Medical University & Union Medical University of China, North-China Ed. Vol.1 343-378 (1995)
- MADHOK R.: Tenidap, *Lancet* **346** 481-485 (1995)
- MABRY T.J.; MARKHAM K.R.; THOMAS M.B. (HRSG.): The Systematic Identification of Flavonoids. New York, Springer (1970)
- MARKHAM K.R.: Techniques of flavonoid identification. Academic Press London (1982)
- MASSEY D.G., CHIEN Y.K.; FOURIER-MASSEY G.: Mamane: Scientific therapy for asthma? *Hawaii med. J.* **53** 350-353 (1994)
- MAXIMO P.; LOURENCO A.: A pterocarpan from *Ulex parviflorus*. *Phytochemistry* **48** (2) 359-362 (1998)

- McCORMICK S.; ROBSON K.; BOHM B.: Flavonoids from *Wyethia Glabra*. *Phytochemistry* **24** (7) 1614-1616 (1985)
- MCMURRY T.B.H.; MARTIN E.; DONNELLY D.M.X.; THOMPSON J.C.: 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpanes. *Pergamon press* **11** 3283-3286 (1972)
- MERCKLE GmbH: Detailinformationen zu ML 3000, Online im Internet URL: <http://www.merckle.de/mercatus/web/index.sfmj> (Stand: 3.6.2002)
- MIAO K.; ZHANG J.; DONG Y.; XI Y.: Research progress on the chemical compounds and pharmacology of *Sophora flavescens*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa Bianjibu* **13** (2), 69-73 (2001)
- MIYAICHI Y.; IMOTO Y.; TOMIMORI T.; LIN C.: Studies on the constituents of *Scutellaria* species IX. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria indica* L. *Chem. Pharm. Bull.* **35** (9) 3720-3725 (1987)
- MIYASE T.; SANO M.; NAKAI H.; MURAOKA M.; NAKAZAWA M.; SUZUKI M.; YOSHINO K.; NISHIHARA Y.; TANAI J.: Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (1). *Phytochemistry* **52** 303-310 (1999)
- NO M.; TANAKA K.; MATSUURA N.; IINUMA M.; PHENGLKAI C.: Flavonoids in the roots of *Euchreasta Horsfieldii* in Thailand. *Phytochemistry* **29** (8) 2663-2665 (1990)
- MSD PHARMA, Fachinformation zum Medikament Singulair (1998)
- MSD PHARMA, Fachinformation zum Medikament Singulair Mini (2001)
- MÜLLER-JAKIC B.: Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von *Zanthoxylum armatum* DC. und *Zanthoxylum chalybeum* Engl., sowie Untersuchungen zur Beeinflussung der Prostaglandin- und Leukotrienbiosynthese durch pflanzliche Inhaltsstoffe. Dissertation, München (1995)
- MUTSCHLER E.; unter Mitarbeit von GEISSLINGER G.; KROEMER H.K.; SCHÄFER-KORTING M.: Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001)
- NIKAIDO T.; OHMOTA T.; KINOSHITA T.; SANKAWA U.; MONACHE F.; BOTTA B.; TOMIMORI T.; MIYAICHI Y.; SHIRATAKI Y.; YOKOE I.; KOMATSU M.: Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids III. *Chem. Pharm. Bull.* **37** (5) 1392-1395 (1989)
- NIKOSIA S.; CAPRA V.; ROVATI G.E.: Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulmonary Pharm. Ther.* **14** 3-19 (2001)
- O'BANION M.K.; SADOWSKI H.B.; WINN V.; YOUNG D.A.: A serum- and glucocorticoid-regulated-4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.* **266** 23261-23267 (1991)
- O'BRYNE P.M.: Leukotrienes in pathogenesis of asthma. *Chest* **111** (Suppl. 2) 27S-34S (1977)

- OHMOTO T.; AIKAWA R.; NIKAIIDO T.; SANKAWA U.; JUN W.L.; UENO A.; FUKUSHIMA S.: Inhibition of Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by components of *Sophora flavescens* Aiton. *Chem. Pharm. Bull.* **34** (5) 2094-2099 (1986)
- OKUDA S.; MURAKOSHI I.; KAMATA H.; KASHIDA Y.; HAGIWIWA J.; TSUDA K.: Studies on lupin alkaloids I. The minor alkaloids of Japanese *Sophora flavescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **13** (4) 482-487 (1965)
- PACHLER K.; UNDERWOOD W.: A proton magnetic resonance study of some pterocarpan derivatives. *Tetrahedron* **23** 1817-1826 (1967)
- PAULUS K.; BAUER R.: Abstract 497 of the Joint Meeting "2000 Years of Natural Product Research", Amsterdam (1999)
- PELLETIER S.W.; CHOKSHI H.P.; DESAI H.K.: Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* **49** (5) 892-900 (1986)
- PELTER A.; STANTON P.; BARBER M.: The mass spectra of some flavonoids *The mass spectra of oxygen heterocycles II* **2** 262-271 (1965)
- PELTER A.; WARD R.; GRAY T.: The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. *Perkin I* 2475-2483 (1976)
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English Edition)*, People's Medical Publishing House, Beijing, China (2000)
- PRÖBSTLE A.: Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen von *Hottuynia cordata* THUNB., einer entzündlichen wirkenden Arzneipflanze in der traditionellen chinesischen Medizin. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München (1994)
- REICH D.P.: Chinesische Heilkunde, Trias Verlag (1995)
- REININGER E.: Vergleichende phytochemische und pharmakologische Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase Isoenzyme mit Arzneidrogen der chinesischen Medizin, insbesondere *Platycodi radix* und *Chaenomelis fructus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2001)
- REININGER E.; BAUER R.: A new PGHS-2 microtiter assay for the screening of herbal drugs. 46th Annual Congress of the Society for Medical Plant Research, Book of Abstracts, J71, Vienna (1998)
- RESCH M.: Zur Inhaltsstoffführung und antiphlogistischen Wirkung der Rhizome von *Atractylodes lancea* und verwandter Arten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (1999)
- RUANGRUNGSI N.; IINUMA M.; TANAKA T.; OHYAMA M.; YOKOYAMA J.; MIZUNO M.: Three flavanones with a lavandulyl group in the roots of *Sophora exigua*. *Phytochemistry* **31** (3) 999-1001 (1992)

- RÜCKER G.; NEUGEBAUER M.; WILLEMS G.G.: Instrumentelle Pharmazeutische Analytik. 2. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1992)
- RYU S.Y.; KIM S. K.; NO Z.; AHN J.W.: A novel flavonoid from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* **62** 361-363 (1996)
- RYU S.Y.; LEE S.H.; KIM K.Y.; KIM H.S.: Determination of isoprenyl and lavandulyl positions of flavonoids from *Sophora flavescens* by NMR Experiment. *Arch. Pharm. Res.* **20** (5) 491-495 (1997)
- SAFAYHI H.; AMMON H.P.T.: Pharmakologische Aspekte von Weihrauch und Boswelliasäuren. *Pharmazeutische Zeitung* **142** (39) 11-20 (1997)
- SAFAYHI H.; SAILER E.R.; AMMON H.P.T.: Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid. *Mol. Pharmacol.* **47** 1212-1216 (1995)
- SALVI S.S.; KRISHNA M.T.; SAMPSON A.P.; HOLGATE S.T.: The antiinflammatory effects of leukotriene-modifying drugs and their use in asthma. *Chest* **119** 1533-1546 (2001)
- SAMUELSSON B.: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220** 568-575 (1983)
- SATO M.; TSUCHIYA H.; TAKASE I.; KURESHIRO H.; TANIGAKI S.; IINUMA M.: Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytotherapy Res.* **9** 509-512 (1995)
- SHI Y.R.; SANG U.C.; SEONG-KIE K.; ZAESUNG N.; CHONG O.L.; JONG W.A.; SUNG H.K.: In vitro antitumour activity of flavonoids from *Sophora flavescens*. *Phytotherapy Res.* **11** 51-53 (1997)
- SHIBATA S.; NISHIKAWA Y.: Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs VII. On the constituents of the roots of *Sophora subprostata* and *Sophora japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **11** (2) 167-177 (1963)
- SHIRATAKI Y.; MOTOHASHI N.; TANI S.; SAKAGAMI H.; SATOH K.; NAKASHIMA H.; MAHAPATRA S.; GANGULY K.; DASTIDAR S.; CHAKRABARTY A.: In vitro biological activity of prenylflavanones. *Anticancer Res.* **21** 275-280 (2001)
- SHIRATAKI Y.; MATSUOKA S.; KOMATSU M.; OHYAMA M.; TANAKA T.; IINUMA M.: Four isoflavanones from roots of *Sophora tetraptera*. *Phytochemistry* **50** 695-701 (1999)
- SHIRATAKI Y.; YOKOE I.; ENDO M.; KOMATSU M.: Determination of C-6 or C-8 substituted flavanone using long range coupling and revised structures of some flavanones. *Chem. Pharm. Bull.* **33** (1) 444-447 (1985)
- SHIRATAKI Y.; YOKOE I.; NOGUCHI M.; TOMOMORI T.; KOMATSU M.: Studies on the constituents of *Sophora* species XXII. Constituents of the root of *Sophora moorcroftiana*. *Chem. Pharm. Bull.* **36** (6) 2220-2225 (1988)

- SIDDIQUI S.: Constituents of Chana I. Isolation of three new crystalline products from *Chana germ.* *J. Sci. Ind. Res.* **4** 68-70 (1945)
- SNATZKE G.: Cirkulardichroismus und optische Rotationsdispersion- Grundlagen und Anwendung auf die Untersuchung der Stereochemie von Naturstoffen. *Angew. Chemie* **80** (1) 15-26 (1968)
- SNATZKE G.: Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil 1. *Chemie in unserer Zeit* **15** (3) 78-87 (1981)
- Species, systematisation and quality evaluation of commonly used Chinese traditional drugs, North-China Ed. Vol.1 343-378 (1995)
- STEVENS J.; IVANCIC M.; HSU V.; DEINZER M.: Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **44** (2) 1575-1585 (1997)
- STEVENS J.; TAYLOR A.; NICKERSON G.; IVANCIC M.; HENNING J.; HAUNOLD A.; DEINZER M.: Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochemistry* **53** 759-775 (2000)
- STÖGER E.A.: Arzneibuch der Chinesischen Medizin, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (1999)
- SUGINOME H.: Oxygen heterocycles. Maackiain, a new naturally occurring chromanocoumaran. *Experientia* **8** (4) 161-163 (1962)
- SUN F.F.; MCGUIRE J.C.; MORTON D.R.; SPRECHER H.; KUNAU W.H.: Inhibition of platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase by acetylenic compounds. *Prostaglandins* **21** 333-343 (1981)
- TAHARA S.; KATAGIRI Y.; INGHAM J.L.; MIZUTANI J.: Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. *Phytochemistry* **36** (5) 1261-1271 (1994)
- TANAKA T.; KAWAI M.; MIZUNO M.; LANG F.A.: Two complex flavanones from the roots of *Sophora leachiana*. *Phytochemistry* **30** (11) 3773-3775 (1991)
- TANG W.; EISENBRAND G.: Chinese drugs of plant origin. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1992)
- THE MISSOURI BOTANICAL GARDEN: Sophora taxon list, Flora of China Checklist (FCC). Online im Internet: URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/TROPICOS/China/Sophora.html> (Stand: 11.12.2001)
- THUY T.; PORZEL A.; RIPPERGER H.; SUNG VAN T.; ADAM G.: Chalcones and ecdysteroids from *Vitex leptobotrys*. *Phytochemistry* **49** (8) 2603-2605 (1998)
- TUDHOPE S.R.; CUTHBERT N.J.; ABRAM T.S.; JENNINGS M.A.; MAXEY R.J.; THOMPSON A.M., NORMAN P.; GARDINER P.J.: BAY u9773, a novel antagonist of cysteinyl-leukotrienes with activity against two receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **264** 317-323 (1994)

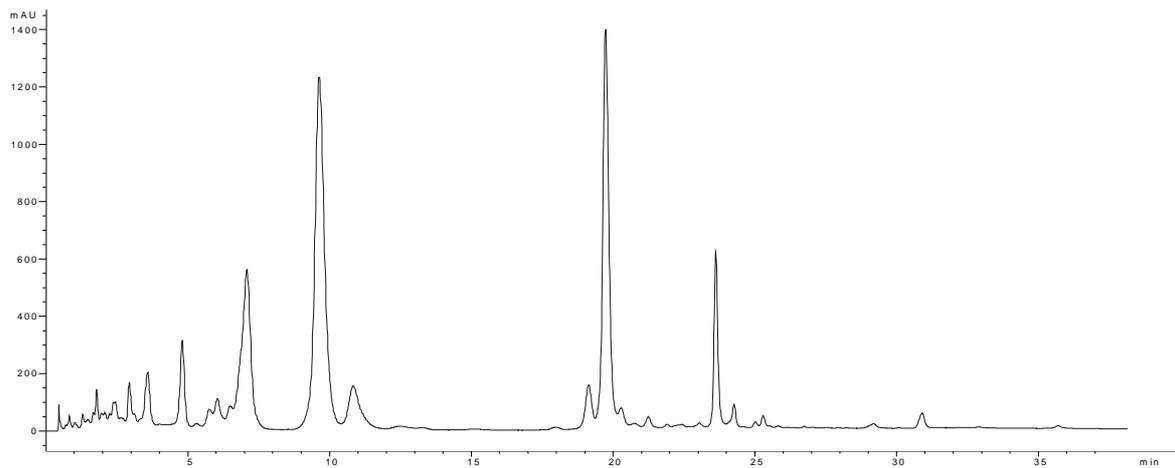
- UENO A.; MORINAGA K.; FUKUSHIMA S.; IITAKA Y.; KOISO Y.; OKUDA S.: Studies on lupin alkaloids VI. Isolation and structure of (+)-isomatrine. *Chem. Pharm. Bull.* **23** (11) 2560-2566 (1975)
- UENO A.; MORINAGA K.; FUKUSHIMA S.; OKUDA S.: Studies on lupin alkaloids VII. Isolation and structure of (-)-dehydrosophoramine. *Chem. Pharm. Bull.* **26** (6) 1832-1836 (1978)
- WAGNER H.; unter Mitarbeit von BAUER R.: Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. 6.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1999)
- WAGNER H.; FESSLER B.: In vitro 5-Lipoxygenasehemmung durch *Eclipta alba* Extrakte und das Coumestan-Derivat Wedelolacton. *Planta Med.* **52** 374-377 (1986)
- WANG B.: Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung (2002)
- WANG B.; PANG Z.; WANG X.; HU X.: Determination of Matrine by Thin Layer Chromatography-Fluorescence Quenching. *Chin. J. of Analytical Chemistry* **16** 693-695 (1997)
- WANG X.; HAN G.: Studies on the flavonoids of *Sophora flavescens*. *Nat. Prod. Res. And Development* **8** (4) 7-9 (1997)
- WEISS M.; MIROV N.; BIRKHAHN A.; SCHNEIDER M.; WERNET P.: Benzodiazepines and their solvents influence neutrophil granulocyte function. *Br. J. Anaesth.* **70** 317-321 (1993)
- WENZEL S.E.: Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. *Pharmacotherapy* **17** (1) 3S-12S (1997)
- WILLIS J.C. THE LATE (rev. By SHAW H.K.A.): A dictionary of the flowering plants and ferns. 8th Ed., Cambridge University Press Cambridge u.a. (1985)
- WOO E.; KWAK J.; KIM H.; PARK H.: A new prenylated flavonol from the roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **61** (12) 1552-1554 (1998)
- WU L.J.; MIYASE T.; UENO A.; KUROYANAGI M.; NORO T.; FUKUSHIMA S.: Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AITON.II. *Chem. Pharm. Bull.* **33** 3231-3236 (1985)
- WU L.J.; MIYASE T.; UENO A.; KUROYANAGI M.; NORO T.; FUKUSHIMA S.: Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AITON.III. *Yakugaku Zasshi* **105** (8) 736-741 (1985)
- WU L.J.; MIYASE T.; UENO A.; KUROYANAGI M.; NORO T.; FUKUSHIMA S.; SASAKI S.: Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AITON.IV. *Yakugaku Zasshi* **105** (11) 1034-1039 (1985)
- WU L.J.; MIYASE T.; UENO A.; KUROYANAGI M.; NORO T.; FUKUSHIMA S.; SASAKI S.: Studies on the constituents of *Sophora flavescens* AITON.V. *Yakugaku Zasshi* **106** (1) 22-26 (1986)
- XIE P.: TLC atlas of traditional Chinese herb drugs in Chinese Pharmacopoeia, Guangdong Science and Technology Publishing House (1993)
- XIE M.; ZHOU W.; ZHANG Y.: The metabolic fate of oxymatrine. *Acta Pharm. Sin.* **16** 481-487 (1981)

- XIE M.; ZHOU W.; ZHANG Y.: Oxymatrine metabolic fate. *Chinese Medical Journal* **96** (2) 145-150 (1983)
- XIN H.; LIU S.: Effects of matrine on myocardial contraction and arrhythmia in isolated heart atria. *Acta Pharm. Sin.* **8** (6) 501-505 (1989)
- YAMAHARA J.; KOBABAYASHI G.; IWAMOTO M.; CHISAKA T.; FUJIMURA H.; TAKAISHI Y.; YOSHIDA M.; TOMIMATSU T.; TAMAI Y.: Vasodilatory active principles of *Sophora flavescens* root. *Journal of Ethnopharmacology* **29** 79-85 (1990)
- YAMAHARA J.; MOCHIZUKI M.; CHISAKA T.; FUJIMURA H.; TAMAI Y.: Antiulcer action of *Sophora* and the active constituent in *Sophora*. II. The antiulcer action of vexibinol. *Chem. Pharm. Bull.* **38** (4) 1039-1044 (1990)
- YAMAHARA J.; MOCHIZUKI M.; FUJIMURA H.; TAKAISHI Y.; YOSHIDA M.; TOMIMATSU T.; TAMAI Y.: Antiulcer action of *Sophora flavescens* root and an active constituent I. *Journal of Ethnopharmacology* **29** 173-177 (1990)
- YAMAKI K.; KIM D.H.; RYU N.; KIM Y.P.; SHIN K.H.; OHUCHI K.: Effects of naturally occurring isoflavones on prostaglandin E₂ production. *Planta Med.* **68** 97-100 (2002)
- YAMAMOTO H.; ICHIMURA M.; TANAKA T.; IINUMA M.; MIZUNO M.: A trifolirhizin YAMAMOTO H.; YATOU A.; INOUE K.: 8-Dimethynaringenin-2'hydroxylase, the crucial cytochrome P 450 mono-oxygenase for lavandulated flavanone formation in *Sophora flavescens* cultured cells. *Phytochemistry* **58** 671-676 (2001)
- YAMAMOTO K.; ARIMOTO K.; IWATA Y.; UJITA K.; SAKURAI K.; SHIMAOKA Y.; TAKAGI K.; TANIYAMA T.; NAKAHARA M. NAKAJIMA K.; NUNOURA Y.; NOGUCHI M.; HAMASHITA Y.; HISATA Y.; HOSODA K.; MISHIMA N.; YAMAMOTO Y.; YOSHIZAKI M.: Analysis of matrine, matrine-N-oxide and sophocarpine-N-oxide in *Sophora* root *kushen*. *Natural Medicines* **48** (3) 180-184 (1984)
- YAMASAKI K.; HASHIMOTO A.; KOKUSENYA Y.; MIYAMOTO T.; SATO T.: Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **42** (8) 1663-1665 (1994)
- YAMAZAKI M.: The pharmacological studies on matrine and oxymatrine. *Yakugaku Zasshi* **120** (10) 1025-1033 (2000)
- YAMAZAKI M.; ARAI A.; SUZUKI S.; TAKEUCHI T.: Protective effects of matrine and oxymatrine on stress ulcer in relation to their effects on the central nervous system. *Yakugaku Zasshi* **104** (3) 293-301 (1984)
- YEN K.Y.: The illustrated Chinese Materia Medica, SMC Publishing Inc. Taipeh (1992)
- YIN X.; LIU D.; WANG H. ZHOU Y.: A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. *Mutation Research* **260** 73-82 (1991)
- 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)

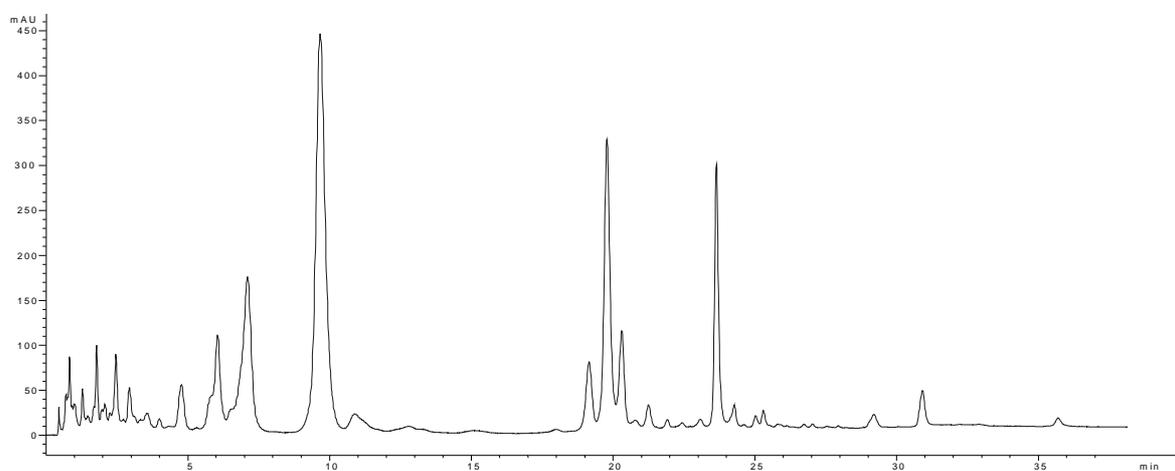
- YOKOMIZO T.; KATO K.; TERAWAKI K.; IZUMI T.; SHIMIZU T.: A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂: A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* **192** (3) 421-431 (2000)
- YOSHIKAWA M.; WANG H.; KAYAKIRI H.; TANIYAMA T.; KITAGAWA I.: Saponin and sapogenol XL. Structure of sophoraflavoside I, a bidesmoside of soyasapogenol B, from *Sophorae radix*, the root of *Sophora flavescens* Aiton. *Chem. Pharm. Bull.* **33** (10) 4267-4274 (1985)
- YOUN H.; NOH J.: Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology* **96** 257-263 (2001)
- ZANDER (Ed.) unter Mitarbeit von ERHARDT W.; GÖTZ E.; BÖDEKER N.; SEYBOLD S.: Handwörterbuch der Pflanzennamen. 16. Auflage, Ulmer Verlag, Stuttgart
- ZHANG B.; WANG N.; LI X.; KONG X.; CAI Y.: Antiarrhythmic effects of matrine. *Acta Pharm. Sin.* **11** (3) 253-257 (1990)
- ZHANG J.; ZHAO Y.; LIU Q.; YE X.: Studies on the chemical constituents from *Sophora flavescens* Ait. *China Journal of Chinese Materia Medica* **25** (1) 37-39 (2000)
- ZHANG B.; SU M.; MA L.; LI Q.: The effects of the total flavone of *Ku-shen* on cardiac arrhythmias. *Acta Pharm. Sin.* **14** (8) 449-454 (1979)
- ZHAO Y.; WANG B.; LEI L.; GUO M.; ZHANG R.; HUANG L.; YI Y.; LOU Z.: Studies on the constituents of the flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* Ait. *Acta Bot. Sin.* **35** (4) 304-306 (1993)
- ZHAO Z.; LI Y.; LIN Z.: Anti-arrhythmic effect of sophocarpine hydrobromide. *Acta Pharm. Sin.* **4** (3) 173-176 (1983)
- 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)

10. Anhang

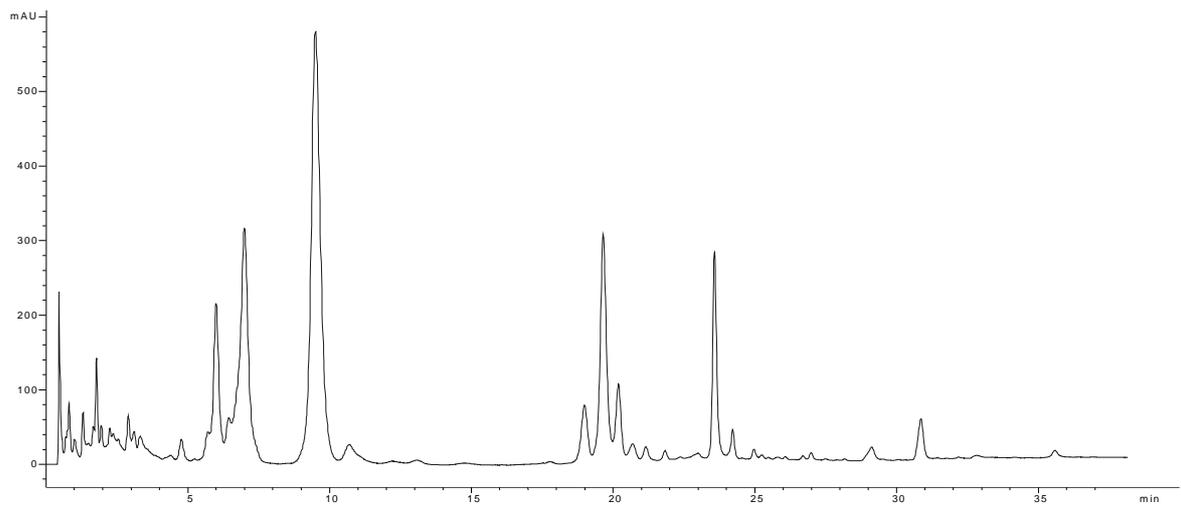
HPLC-Chromatogramme von *Sophora flavescens* Drogenchargen, die bei der vergleichenden qualitativen und quantitativen Untersuchung des Inhaltsstoffmusters der Droge herangezogen wurden.



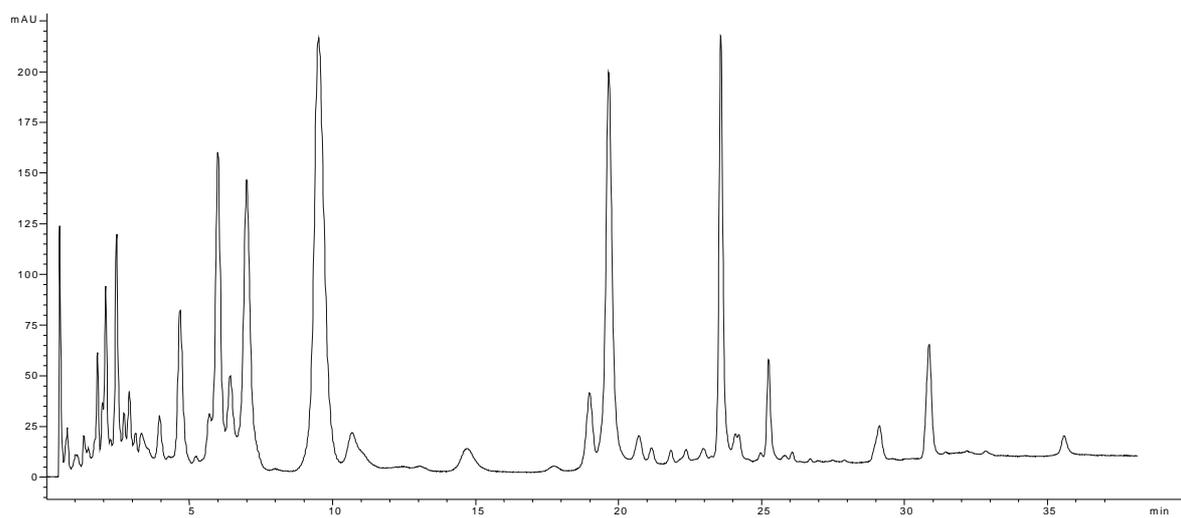
Drogencharge SF2




Drogencharge SF3



Drogencharge SF4



Drogencharge SF5



Drogencharge SF6

Lebenslauf

Name: Anne Marita Schwarte
Geburtsdatum: 21.07.1971
Geburtsort: Geseke
Eltern: Bernfried Schwarte
Anne Schwarte geb. Rasche

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978-1982 Grundschule Störmede
1982-1991 Gymnasium Antonianum Geseke
1991 Abschluss mit dem Abitur

Studium:

1991-1992 Studium Lehramt Sek.1 der Fächer Biologie und Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
1992-1997 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg
Mai 1997-Okt. 1997 Praktikum bei der Fa. Fresenius AG in Friedberg
Nov. 1997-Mai 1998 Praktikum in der Schiller-Apotheke in Hamburg-Altona
Mai 1998 Approbation als Apothekerin

Berufspraxis:

Juni 1998-Sept. 1998 Apothekerin in der Insel-Apotheke Wangerooge
Sept. 1998-Jan.1999 Apothekerin in der Rathaus-Apotheke in Köln-Frechen
Jan. 1999-Juli 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für pharmazeutische Biologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, dabei Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. R. Bauer

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Düsseldorf, den 13.06.2002

(Anne Schwarte)

Danksagungen

Von ganzem Herzen danke ich den Kolleginnen und Kollegen des Institutes für die gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Zudem möchte ich mich bei allen Studentinnen und Studenten für die vorzüglichen Partys bedanken, die mir so viele nette Stunden bereitet haben.

Insbesondere danke ich:

Frau Dr. Birgit Dietz für die tollen morgendlichen Frühstücke, viele fröhliche Stunden im Labor, die Beantwortung tausender Fragen und ihre Freundschaft.

Frau Dr. Kerstin Paulus für die Einführung in pharmakologische Testsysteme, in phytochemische Arbeitsmethoden, ihre Einführung in saarländische Lebensqualität (Saarland-Wochenende) und ihre Freundschaft.

Frau Dr. Friederike Stoll (meiner „Trainerin“) für ihre große Hilfe bei Korrekturleistungen und Freundschaft, die zahlreichen für mich sehr wertvollen Tipps aller Art, die Motivation zum Sport und ihre stets vorbildliche sachliche Meinung zu Problemen größerer und kleinerer Art.

Herrn Dr. Rainer Ebel für seine kompetente Hilfe und Korrekturleistungen, besonders bei Fragen der Strukturaufklärungen.

Frau Dr. RuAngelie Edrada für die theoretische verständliche Einführung in NMR-Geheimnisse und ihre kompetente freundliche Hilfe bei der Aufnahme von LC-MS-Messungen.

Herrn Dr. Thommes und Herrn Bürgel für die Aufnahme von FAB- und vieler DEI-Massenspektren.

Herrn Dr. Jörg Heilmann für die Durchführung der Chemilumineszenz-Tests.

Frau S. Borstel für die Mithilfe bei der Durchführung von 5-LOX-Tests.

Herrn Dr. Bingui Wang und Herrn Dr. Chanyung Wang für die große Hilfe bei Übersetzungen chinesischer Quellentexte.

Frau Dr. Marion Resch für stets wertvolle Tipps, aufbauende und witzige Telefongespräche und e-mails.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Claus Passreiter, Sebastian Stöber und Gero Eck für die gemeinsame Betreuung der Studentenpraktika.

Herrn Dr. Thomas Litz für die Beantwortung analytischer Fragen, besonders zu Problemen der Strukturaufklärung.

Frau Dr. Esther Waschkowitz für die vielen aufbauenden Worte und ihre so tolle Freundschaft.

Frau Bärbel Steffan für die kleinen Pausen und Späße zwischendurch.

Herrn Klaus Lohmann für die Gesellschaft im Labor und der Hilfe bei computertechnischen Fragen.

Frau Mareike Thiel für stets prompte freundliche Hilfe und ihre Zuverlässigkeit im Sekretariat als guter Geist.

Herrn Dr. W. Peters, insbesondere seinen Mitarbeitern Dr. Sven Augner und Dr. Carsten Uhlemann, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie 1 der Universität Düsseldorf, für den Service der Aufnahme aller NMR-Spektren und für die vielen Ausnahmen, die doch so häufig in Anspruch genommen wurden.

Allen Famulantinnen und Famulanten, die mich während meiner praktischen Arbeit so toll unterstützt haben und stets motivierten, namentlich Parissa Kershavarzi, René Säuberlich, Tina Misič, Vera Sonderkamp, Julia Baronski, Friederike Schröder, Gun-Yung Ko und Sonja Kessler.

Herrn Prof. Dr. Sandor Antus für die Bereitstellung von Substanzen zur Testung auf die Leukotrienbiosynthesehemmung.

Herrn Prof. Dr. Xiao Peigen für die Lieferung von Drogenmustern und Referenzsubstanzen.

Der TCM-Klinik in Kötzing für die großzügige finanzielle Unterstützung unseres Arbeitskreises.

Der Fa. Bionorica für den finanziellen Support.

And last but not least! Meiner Mutter für ihre stetige Anteilnahme an meiner Arbeit und ihre tatkräftige Mithilfe bei der Verwirklichung so vieler meiner Wünsche aller (manchmal auch ausgefallener) Art. Ohne sie hätte ich so viele meiner fröhlichen Stunden sicherlich nicht in dem Umfang genießen können.

