



**Isolierung gastrointestinal wirksamer Inhaltsstoffe aus
Casimiroa tetrameria MILLSP., einer yukatekischen
Arzneipflanze der Maya (Mexiko)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Bilkis Heneka
aus Kabul/Afghanistan

2000

Dekan: Prof. Dr. H. Kleinig
Leiter der Arbeit: Prof. Dr. H. Rimpler
Verantwortlicher Betreuer für die Fakultät: Prof. Dr. K.-G. Collatz
Koreferent: Prof. Dr. E. Wellmann

Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 14.02.2001

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rimpler durchgeführt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	<i>Casimiroa tetrameria</i> MILLSP.	3
1.2.1	Systematik, botanische Beschreibung und geographische Verbreitung	3
1.2.2	Verwendung von <i>Casimiroa tetrameria</i> und verwandten Arten	9
1.2.3	Bisherige biologisch-pharmakologische und phytochemische Untersuchungen der Gattung <i>Casimiroa</i> LLAVE & LEX.	10
1.3	Diarrhoe	14
1.3.1	Definition und Ursachen	14
1.3.2	Ionentransportmechanismen am Darmepithel	15
1.3.3	Second messenger und Ionentransport	19
1.3.4	Motorik des Darms	20
1.3.5	Biogene Antidiarrhoika aus Pflanzen	21
1.4	Flavonoide	22
1.4.1	Biosynthese und Einteilung	22
1.4.2	Lokalisation und Bedeutung für die Pflanze	25
1.4.3	Beispiele für biologisch-pharmakologische Wirkungen	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Pflanzenmaterial	29
2.2	Biologische und pharmakologische Testsysteme	29
2.2.1	USSING-Kammer	29
2.2.2	Isoliertes Meerschweinchen-Ileum	35

2.2.3	Antimikrobielle Tests	40
2.2.3.1	Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Candida albicans</i>	40
2.2.3.2	Aktivität gegen <i>Helicobacter pylori</i>	41
2.2.4	Untersuchungen auf Cytotoxizität	43
2.3	Phytochemische Methoden	45
2.3.1	Chromatographie	45
2.3.2	Spektroskopie	50
2.3.3	Extraktion	51
2.3.4	Teezubereitung	52
2.3.5	Isolierung der Verbindungen	52
2.3.5.1	Auftrennung der EtOAc-Phase an Sephadex® LH-20	52
2.3.5.2	Isolierung der Polymethoxyflavone	53
2.3.5.3	Isolierung der Flavonoidglykoside	55
2.3.5.4	Isolierung des Furanocumarins	57
2.3.6	Polymethoxyflavon-Fraktionen für biologische Untersuchungen	57
2.4	Eigenschaften der Verbindungen	60
2.4.1	5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon	60
2.4.2	5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon	60
2.4.3	5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin)	61
2.4.4	5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B)	62
2.4.5	5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1)	62
2.4.6	5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2)	63
2.4.7	5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon	64
2.4.8	5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)	64
2.4.9	5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxypsrolen	65
2.4.10	Kaempferol-3-O-glucosid	66
2.4.11	Kaempferol-3-O-rutinosid	66
2.4.12	Quercetin-3-O-glucosid	66
2.4.13	Quercetin-3-O-rutinosid	67

3	Ergebnisse	69
3.1	Untersuchungen von <i>Casimiroa tetrameria</i> an isolierten Darmabschnitten	69
3.1.1	Auswahl der zu untersuchenden Pflanze	69
3.1.2	Untersuchung der sekretionshemmenden Wirkung von <i>C. tetrameria</i> in der USSING-Kammer	70
3.1.3	Untersuchung der kontraktionsinhibierenden Wirkung von <i>C. tetrameria</i> am isolierten Meerschweinchen-Ileum	74
3.2	Untersuchungen der antimikrobiellen Wirksamkeit von <i>Casimiroa tetrameria</i>	79
3.2.1	Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Candida albicans</i>	79
3.2.2	Aktivität gegen <i>Helicobacter pylori</i>	81
3.3	Untersuchungen zur Cytotoxizität von <i>Casimiroa tetrameria</i>	81
3.4	Phytochemische Untersuchungen von <i>Casimiroa tetrameria</i>	85
3.4.1	Extraktion	85
3.4.2	Isolierung der Polymethoxyflavone	85
3.4.3	Identifizierung der Verbindungen	87
3.4.3.1	5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon	87
3.4.3.2	5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)	90
3.4.3.3	5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin)	93
3.4.3.4	5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B)	94
3.4.3.5	5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1)	96
3.4.3.6	5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2)	97
3.4.3.7	5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon	99
3.4.4	Isolierung der Flavonoidglykoside	102
3.4.5	Identifizierung der Verbindungen	104
3.4.6	Isolierung des Furanocumarins	106
3.4.7	Identifizierung der Verbindung	106
3.5	Biologische Wirksamkeit einer Teezubereitung von <i>Casimiroa tetrameria</i>	109

4	Diskussion	111
5	Zusammenfassung	117
6	Summary	119
7	Resumen	121
8	Literatur	123
9	Anhang	133
	Abbildung der Spektren	134
	Liste der verwendeten Abkürzungen	146

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Durchfallerkrankungen stellen nach wie vor eines der wichtigsten gesundheitlichen Probleme dar. Dies gilt insbesondere für die Bevölkerungen der sogenannten Entwicklungsländer. Hier gehören vor allem Kinder zu den Betroffenen (BERN et al., 1992). Jährlich sterben immer noch etwa 4 - 5 Millionen Kinder unter 5 Jahren an den Folgen akuter Diarrhoe. Auch in Mexiko sind Durchfallerkrankungen von großer Bedeutung. Dort hat sich die Situation in den letzten Jahren, bedingt durch Fortschritte im Gesundheitswesen zwar positiv verändert, jedoch ist Diarrhoe immer noch die Haupttodesursache bei Kindern zwischen 1 und 4 Jahren. 69 % der Todesfälle werden in den ländlichen Gegenden verzeichnet (MARTINEZ et al., 1998). Generell spielt hier die Verwendung traditioneller Arzneipflanzen eine nach wie vor sehr große Rolle. Über deren Art und Verwendung allerdings ist immer noch verhältnismäßig wenig bekannt. Dies gilt auch für die Heilpflanzen der Maya auf der mexikanischen Halbinsel Yucatán. *Casimiroa tetrameria* MILLSP. (Rutaceae) ist eine der Pflanzen, die im Rahmen einer 18 Monate währenden ethnobotanischen Studie in 3 yukatekischen Maya-Dörfern gesammelt und identifiziert wurden. *C. tetrameria* wird von der dortigen Bevölkerung traditionell unter anderem bei gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt, insbesondere bei Diarrhoe (ANKLI, 2000a). Diese Art ist bisher weder bezüglich ihrer Wirksamkeit, noch was ihre Inhaltsstoffe betrifft, untersucht. Durchfallerkrankungen sind generell mit einer erhöhten Elektrolyt- und Wassersekretion verbunden, zudem kann eine verstärkte Darmmotilität eine wichtige Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Rohextrakt von *C. tetrameria* auf seine antisekretorische Wirkung hin untersucht werden. Weiterhin erfolgt die Untersuchung einer möglichen kontraktionsinhibierenden Aktivität. Durch eine an der antisekretorischen Aktivität orientierte Fraktionierung des Rohextrakts sollen aktive Inhaltsstoffe isoliert und mittels NMR-Spektroskopie und MS-Spektrometrie identifiziert werden.

Um die Aktivität bezüglich der Reversion der durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) induzierten Cl⁻-Sekretion am Darmepithel zu untersuchen, wird das *ex vivo*-Modellsystem USSING-

Kammer eingesetzt. Dieses System stellt eine sinnvolle Möglichkeit dar, die Ionentransportvorgänge nachzuvollziehen, wie diese bei der sekretorischen Diarrhoe am Darmepithel beobachtet werden können. Die Transportmechanismen der Mucosa des distalen Colons vom Kaninchen - das Epithel, das in diesem Rahmen verwendet wird - sind sehr gut untersucht und denen des entsprechenden humanen Gewebes sehr ähnlich (CLAUSS, 1993). Das Testsystem ist zeitaufwendig, aber sehr aussagekräftig, da mit Gewebe gearbeitet wird, das noch voll funktionsfähig ist. Mit Hilfe dieses Systems wurde bereits die Wirksamkeit der gerbstoffhaltigen Rindendroge *Guazuma ulmifolia* LAM. gegen die durch Choleratoxin induzierte erhöhte Cl⁻-Sekretion nachgewiesen (HÖR, 1995).

Für die Untersuchung einer möglichen kontraktionsinhibierenden Aktivität wird das isolierte Meerschweinchen-Ileum verwendet. An dessen glatter Muskulatur können durch verschiedene Agonisten (Histamin, PGE₂, Elektr. Feldstimulation, etc.) Kontraktionen ausgelöst werden. Hemmende Substanzen treten in Konkurrenz mit dem jeweiligen Agonisten und können durch Abschwächung der induzierten Kontraktionen nachgewiesen werden.

Mittels der experimentellen Befunde soll die indigene Verwendung von *C. tetrameria* als Arzneipflanze bei gastrointestinalen Beschwerden im vorgegebenen Rahmen beurteilt werden.

1.2 *Casimiroa tetrameria* MILLSP.

1.2.1 Systematik, botanische Beschreibung und geographische Verbreitung

Casimiroa tetrameria MILLSP. gehört zur Familie der Rutaceae, die nach der APG (Angiosperm Phylogeny Group, 1998) zur Ordnung der Sapindales DUMORT. gerechnet wird. Die Familie der Rutaceae (Rautengewächse) umfasst ca. 1650 verschiedene Arten, die in 160 Gattungen zusammengefasst werden (TAKHTAJAN, 1997). Die wichtigste Gattung dieser Pflanzenfamilie stellt *Citrus* dar. Bei den Vertretern der Rutaceae handelt es sich zumeist um aromatisch riechende Bäume und Sträucher, bisweilen lianenartig wachsend, selten um Kräuter. Manche der Pflanzen sind mit Dornen ausgestattet (MABBERLEY, 1997). Die Rutaceae sind besonders reich an ätherischen Ölen, die in schizolysigenen Exkretbehältern gebildet und gespeichert werden (FROHNE und JENSEN, 1998). Die Blätter, die durch die zahlreichen Exkretbehälter oft durchscheinend punktiert erscheinen, sind meist spiralförmig angeordnet, selten gegenständig. In ihrer Form sind sie einfach, geteilt oder zusammengesetzt. Die Blüten sind meist radiärsymmetrisch, zwittrig und 2- bis 5-zählig. Die Staubblätter sind in der Regel diplostemon (selten bis zu 60). Bei einigen Arten ist ein Staubblattring zu Staminodien reduziert. Meistens sind 4 - 5 Fruchtblätter vorhanden. Diese sind entweder am Grund unverwachsen und nur an Griffel oder Narben verwachsen oder sie sind insgesamt verwachsen und bilden ein gefächertes Ovar mit meist 1 – 2 Samenanlagen je Karpell aus. Es entwickelt sich eine Steinfrucht, Beere, Kapsel (meist loculizid) oder eine Spaltfrucht, die in lederartige oder steinfruchtähnliche Teilfrüchte zerfällt. Die Früchte weisen zum Teil einen bis mehrere flügelartige Auswüchse oder Anhängsel auf. Die Beeren besitzen des öfteren eine hochentwickelte Pulpa aus sehr großzelligen, saftreichen Emergenzen der Karpellwände (Citrusfrüchte; MABBERLEY, 1997; ENGLER, 1964).

Die Erstbeschreibung der Gattung *Casimiroa* geht auf PABLO DE LA LLAVE und JUAN MARTÍNEZ LEXARZA (1825) zurück. Der Name ist abgeleitet von CASIMIRO GOMEZ, einem mexikanischen Krieger, der während des mexikanischen Unabhängigkeitskrieges Ende 1815 von königstreuen Truppen gefangengenommen und erschossen wurde (MARTÍNEZ, 1951). Die Gattung umfasst 6 (MABBERLEY, 1997) oder 7 Arten: Der bekannteste und am ausführlichsten beschriebene Vertreter ist *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. (1825). Des

weiteren sind *C. sapota* OERST. (1858), *C. pubescens* RAM. (1896), *C. pringlei* (WATS.) ENGLER (1896), *C. watsonii* ENGLER (1896), *C. tetrameria* MILLSP. (1898) und *C. emarginata* STANDL. et STEYERM. (1944) beschrieben. *C. emarginata* wurde auf Grund eines einzelnen Exemplars, das in Guatemala gefunden wurde, als eigene Art aufgeführt (STANDLEY und STEYERMARK, 1946). Es kann sich durchaus auch um eine Form von *C. sapota* handeln (MARTÍNEZ, 1951). Es existieren möglicherweise noch weitere Arten (H. VIBRANS, pers. Mitteilung). Drei der beschriebenen Arten besitzen essbare Früchte (HOYOS, 1994), wobei die Popularität - vor allem von *C. edulis* und *C. tetrameria* - insbesondere auf deren Verwendung als Medizinalpflanze zurückzuführen ist (MORTON, 1962).

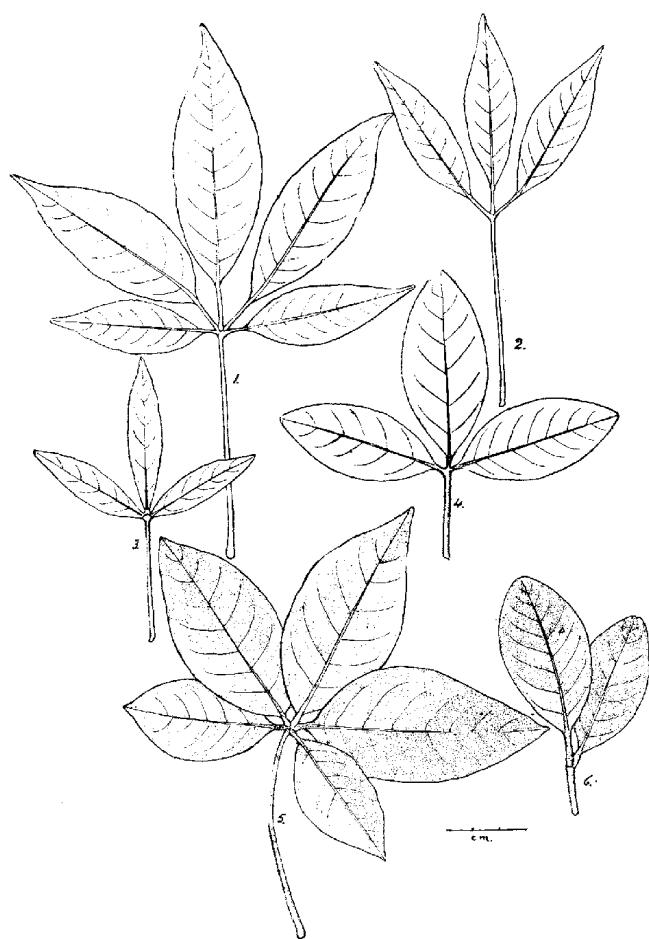


Abb. 1.1: Blattformen verschiedener *Casimiroa*-Arten: 1. und 2. *Casimiroa edulis*, 3. *C. watsonii*, 4. *C. pringlei*, 5. *C. tetrameria*, 6. *C. pubescens* (aus MARTÍNEZ, 1951)

Normalerweise handelt es sich bei den Vertretern dieser Gattung um große Sträucher oder Bäume. Die Blätter sind wechselständig angeordnet. Sie sind gestielt und einteilig bis mehrteilig gefingert (Abb. 1.1). Die Teilblätter sind ganzrandig oder lediglich leicht ge-

kerbt und durchscheinend punktiert. Die seitlichen Teilblätter sind, im Gegensatz zu den mittleren ungestielt oder nur mit kurzen Stielen versehen. Die Blüten sind klein, weißlich und meist 5-zählig (Abb. 1.2). Die Filamente der Staubblätter laufen spitz zu oder haben eine linear-lanzettliche Form, die Antheren sind elliptisch oder oval. Die Ovarien sind meist 4- bis 5-fächerig; jedes Fach enthält jeweils eine Samenanlage. Die Narbe ist normalerweise 5-lappig. Die Frucht erinnert an einen Apfel und ist grün oder gelb. Alle Arten sind in Mexiko bzw. Zentralamerika beheimatet und wachsen vorzugsweise in einer Höhe ab 900 m (STANDLEY und STEYERMARK, 1946).

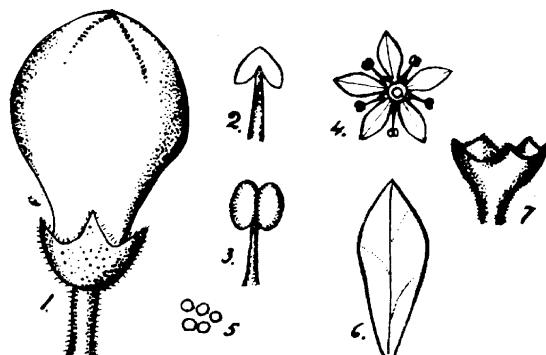


Abb. 1.2: Teile der Blüte der Gattung *Casimiroa*; 1. Knospe , 2. und 3. Staubblatt, 4. Blüte, 5. Pollen, 6. Kronblatt, 7. Kelch (aus MARTÍNEZ, 1951)



Abb. 1.3: Früchte und Blätter von *Casimiroa tetrameria* (aus HOYOS, 1994)

Casimiroa tetrameria wurde 1898 von CH. F. MILLSPAUGH erstmals beschrieben. Es handelt sich bei dieser Art um 6 – 15 m hohe Bäume mit rundlicher Krone und dicken, hellen Ästen.

Die ganzrandigen, bisweilen leicht gezähnten Blätter sind gefingert, mit 4 – 5 (selten 7) bis zu 13.5 cm langen Teilblättern (Abb. 1.5). Von ihrer Form her erscheinen diese abgerundet bis zugespitzt, subelliptisch bis leicht oval. Die Basis der Teilblätter ist abgerundet oder leicht spitz zulaufend. Der Blattstiel hat eine Länge von bis zu 12 cm. Die Blattspreite wird durchsetzt von zahlreichen durchscheinenden Drüsen. Die Oberseite der Blätter ist glänzend und glatt, die Unterseite dicht behaart und heller.

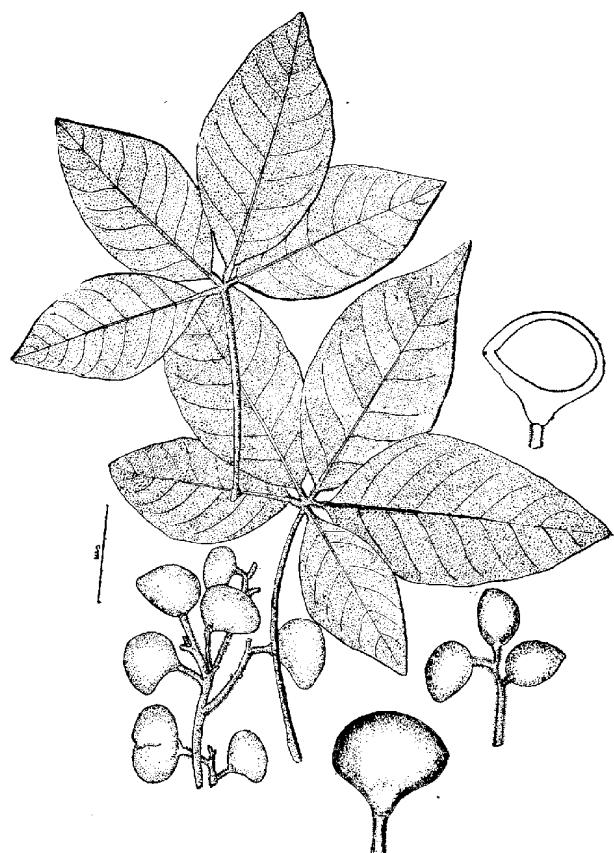


Abb. 1.4: Blätter und Früchte (auch Querschnitt)
von *C. tetrameria* (aus MARTÍNEZ, 1951)

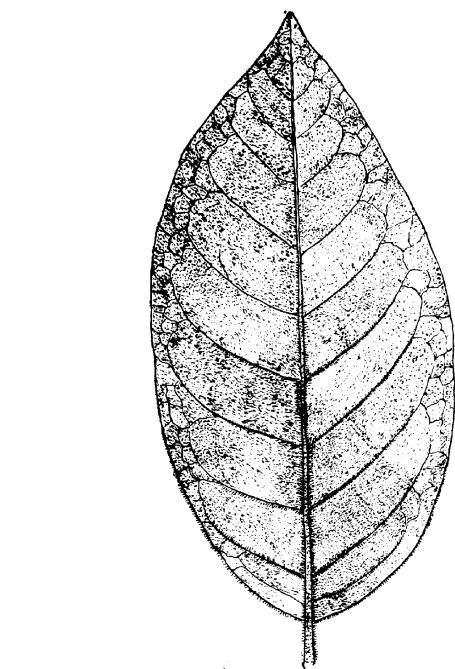


Abb. 1.5: Teilblatt von *C. tetrameria*
(aus MARTÍNEZ, 1951)

Die Blüten von *C. tetrameria* sind monözisch, diklin und in Trauben oder Rispen angeordnet, die meist kürzer als der Blattstiel sind. Die staminaten Blüten sind 5 – zählig, grünlich und in axillären bzw. extraaxillären Infloreszenzen angeordnet. Die Kelchblätter sind behaart und dreieckig. Die dicklichen Kronblätter sind 1.8 – 2 mm lang und umschließen die etwa 2.5 mm langen Stamina. Die karpellate Blüte ist ebenfalls 5 – zählig,

mit behaarten Kelchblättern, ovalen fleischigen Kronblättern, infertilen Staubblättern und einem oberständigen Fruchtknoten, der leicht gebogen erscheint, wobei die Narbe auf der Seite der Mittellinie sitzt, die der Krümmung abgewandt ist (Abb. 1.6). Nach MARTÍNEZ (1951) ist dies die Ursache dafür, daß sich nur eine der 5 Samenanlagen entwickelt. Die reife Frucht hat eine annähernd ovale Form, der Fruchtstiel ist etwa 7 – 9 mm lang und am Fruchtansatz erweitert. Vor ihrer Reife erscheint die Frucht grün-gelb (Abb. 1.7), so-dann verfärbt sie sich rot-orange. Ihre Oberfläche hat eine unregelmäßige Struktur und ist ähnlich der einer Orange drüsig und runzlig.

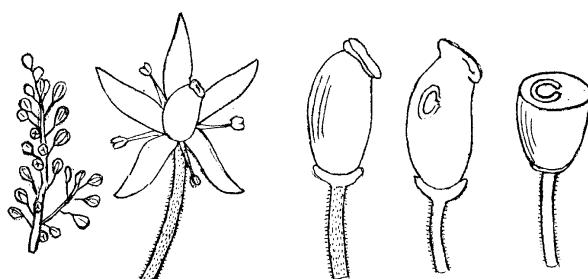


Abb. 1.6: Details der Blüte von *C. tetrameria*: Blütenstand, Einzelblüte, Fruchtknoten, Längs- und Querschnitt durch den Fruchtknoten (aus MARTÍNEZ, 1951)



Abb. 1.7: Unreife Früchte von *C. tetrameria* (aus HOYOS, 1994)

Das Exokarp ist dünn und mit dem Mesokarp verwachsen. Das Endokarp hat eine weiß-gelbliche Färbung und einen süßen Geschmack (Abb. 1.8). Die Frucht enthält nur einen 13 – 14 mm langen Samen, der den Samen anderer *Casimiroa*-Arten ähnlich ist (MARTÍNEZ, 1951).



Abb. 1.8: Reife Früchte von *C. tetrameria* (aus HOYOS, 1994)

Casimiroa tetrameria wird in Zentralamerika „matasano“ („tötet die Gesunden/die Gesundheit“) genannt und hat ihr dichtestes Vorkommen auf der mexikanischen Halbinsel Yucatán. Der Name, der von den Maya in Yucatán für diese Pflanze verwendet wird ist „Yuy“ bzw. „Hyuy“ (BARRERA MARIN et al., 1976; STANDLEY und STEYERMARK, 1946). Des weiteren wächst *C. tetrameria* im mexikanischen Bundesstaat Chiapas und in Belize (MARTÍNEZ, 1951). Außerdem ist sie in Honduras und Costa Rica, etwas seltener in Guatemala zu finden. Kultiviert wird diese Art in Zentralamerika, Florida und Südkalifornien. Bevorzugt wächst sie in einer feuchten bis eher trockenen Umgebung in einer Höhe von 1300 bis 2300 m an Berghängen und in Schluchten (STANDLEY und STEYERMARK, 1946).

1.2.2 Verwendung von *Casimiroa tetrameria* und verwandten Arten

Sofern *Casimiroa tetrameria* und verwandte Arten verwendet werden, geschieht dies im Bereich der Volksmedizin. Die Pflanzen sind nicht in der mexikanischen Pharmakopoe aufgeführt (MORTON, 1962). Bei den Maya auf der Halbinsel Yucatán kann die indigene Verwendung der Blätter und der Wurzeln von *Casimiroa tetrameria* in verschiedene Indikationsbereiche eingeordnet werden, wobei diese Arzneipflanze insbesondere bei gastro-intestinalen Beschwerden und Diarrhoe eingesetzt wird. Verwendet wird in diesem Fall ein Decoct der Blätter, das oral angewandt wird (ANKLI, 2000a; MENDIETA und DEL AMO, 1981). Bei Erkältungen werden die Blätter von *C. tetrameria* als Bestandteil einer Mischung verschiedener Heilpflanzen in Wasser erhitzt und zur Inhalation verwendet (ROYS, 1931). Auch wird die Pflanze bei Erkrankungen der Atemwege genutzt, so beispielsweise bei Asthma in Form eines Bads oder als orale Anwendung (ANKLI, 2000a; MENDIETA und DEL AMO, 1981). Außerdem wird *C. tetrameria* bei Schmerzen, vor allem bei rheumatischen Beschwerden und fieberhaften Erkrankungen verwendet (ANKLI, 2000a). Neben der Verwendung als Medizinalpflanze dienen die Früchte von *C. tetrameria*, ebenso wie die der ihr verwandten Arten *C. edulis* und *C. sapota* als Nahrungsmittel (HOYOS, 1994; MORTON, 1981).

Von *Casimiroa edulis* werden die Blätter, die Rinde und insbesondere die Samen als Beruhigungs- und Schlafmittel verwendet. 1 – 2 Teelöffel eines Extraks aus den Samen werden in Form eines Decocts eingenommen, empfohlen wird die Einnahme 1 Stunde vor dem Schlafen. Den Früchten wird eine antirheumatische Wirkung nachgesagt (MORTON, 1962; MARTÍNEZ, 1959). Des weiteren wurden die Früchte als Mittel gegen Würmer eingesetzt. Ebenso sollten die Samen die Wundheilung fördern (POWER und CALLAN, 1911). Die Blätter und die Samen von *C. edulis* werden als blutdrucksenkendes Mittel verwendet. Außerdem wird mit dieser Art eine antikonvulsive Wirkung verbunden (MARTÍNEZ, 1959). In Costa Rica wird ein Decoct der Blätter eingenommen um Diabetes entgegenzuwirken (MORTON, 1962). Neben ihrer Eigenschaft als Medizinalpflanze werden bei der Verwendung von *C. edulis* auch Nebenwirkungen beobachtet (s.o. „matasano“), insbesondere auf Grund der lähmenden Wirkung auf die Atemwege. Des weiteren kann das Herz geschwächt werden. Bei einem länger währenden Gebrauch eines Extraks aus den Samen

können Beschwerden des Gastrointestinaltrakts wie beispielsweise Diarrhoe, Erbrechen, Übelkeit und Magenschmerzen auftreten (MARTÍNEZ, 1959).

Weiterhin wird die insektizide Wirksamkeit der Samen ausgenutzt (MORTON, 1962).

Die Rinden von *C. edulis* und *C. sapota* waren in Mexiko als Fischgift im Gebrauch (PENNINGTON, 1958).

1.2.3 Bisherige biologisch-pharmakologische und phytochemische Untersuchungen der Gattung *Casimiroa* LLAVE ET LEX.

Es lagen bisher keine Ergebnisse von phytochemischen oder biologisch-pharmakologischen Untersuchungen an *Casimiroa tetrameria* vor. Von den beschriebenen Arten der Gattung *Casimiroa* wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich *Casimiroa edulis* biologisch-pharmakologisch und phytochemisch untersucht. Dabei haben sich die pharmakologischen Untersuchungen bisher zumeist auf die antikonvulsive Wirkung von *C. edulis* und deren Verwendung als Hypertensivum konzentriert. Getestet wurde insbesondere der wässrige Extrakt der Samen. Es hat sich gezeigt, daß dieser an Ringen der Rattenorta spontan nicht-persistierende Kontraktionen induziert. Ebenso läßt sich eine kontraktionsinhibierende Wirkung nachweisen. Der Extrakt inhibiert Kontraktionen, die durch Noradrenalin, Serotonin und PGF_{2α} induziert werden. Die Induktion der Kontraktionen erwies sich als konzentrationsabhängig. Die kontrahierende Wirkung konnte durch Histaminantagonisten nicht beeinflusst, wohl aber durch die Blockierung α-adrenerger Rezeptoren vollständig unterdrückt werden (MAGOS et al., 1995). Im Fall von künstlich herbeigeführten Epilepsieanfällen wirkt die orale Gabe des wässrigen Extrakts bei Ratten protektiv (GARZÓN-DE LA MORA et al., 1999). Derselbe Effekte konnte durch einen wässrigen Extrakt aus den Blättern von *C. edulis* hervorgerufen werden. Die Untersuchungen der antikonvulsiven Aktivität an Ratten hat gezeigt, daß die Wirkung vergleichbar ist mit der von Medikamenten, die bei Epilepsie eingesetzt werden (NAVARRO RUÍZ et al., 1995). An Hunden wurden die Wirkungen auf das kardiovaskuläre System untersucht, die durch den wässrigen Extrakt der Samen ausgelöst werden. Es wurde eine relativ lang andauernde Blutdrucksenkung beobachtet, außerdem erfolgte eine Herabsetzung der Herzschlagfrequenz (Bradykardie). Vermittelt werden diese Wirkungen durch H₁- bzw. H₂-

Rezeptoren (VIDRIO und MAGOS, 1991). Ein vergleichbares Ergebnis erbrachten die Untersuchungen, die mit dem ethanolischen Extrakt aus den Samen durchgeführt wurden. Bei betäubten Ratten wurde eine H₁-Rezeptor-vermittelte Blutdrucksenkung bewirkt, einhergehend mit einer Erhöhung der Herzschlagfrequenz. An letzterem Effekt sind zusätzlich β-adrenerge Rezeptoren beteiligt. Diskutiert werden als Wirkstoffe Imidazolderivate, wie diese aus *C. edulis* bekannt sind (MAGOS und VIDRIO, 1991). Eine genauere Untersuchung dieser Verbindungen, die aus dem MeOH-Extrakt der Samen isoliert wurden zeigte bei Ratten, daß die Histaminderivate N-Monomethylhistamin und N,N-Dimethylhistamin zu einer vorübergehenden Absenkung des Blutdrucks führen, die über H₁-histaminerge Rezeptoren vermittelt wird. Außerdem spielt bei N,N-Dimethylhistamin die Freisetzung von NO eine Rolle. Synephrin führt zu einer Blutdruckerhöhung über α- bzw. α,β-adrenerge Rezeptoren. Die gleichfalls isolierten Verbindungen N-Methylprolin, Prolin und γ-Aminobuttersäure führen zu einer starken Blutdrucksenkung. Bei Meerschweinchen ruft das Alkaloid Casimiroedin eine andauernde Erniedrigung des Blutdrucks hervor (MAGOS et al., 1999). Aus dem ethanolischen Extrakt der Samen von *C. edulis* wurden antimutagene Verbindungen isoliert (ITO et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß das Chinolinalkaoid Casimiroin und ein ebenfalls isoliertes Furanocumarin die DMBA (7,12-Dimethylbenz[α]anthracen)-induzierte Mutagenese in *Salmonella typhimurium* inhibieren können.

Isolierte Verbindungen	Herkunft	Literaturnachweis
FLAVONOIDE		
5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon/Zapotin	Samen	KINCL et al, 1956
5,6,2'-Trimethoxyflavon	"	"
5,6,3'-Trimethoxyflavon	"	DREYER, 1968
5,6-Dimethoxyflavon	Rinde	IRIARTE et al., 1956
Cerrosillin	"	DREYER, 1968
Zapotinin	"	KINCL et al, 1956
Rutin	Blätter	ROMERO et al., 1983
CUMARINE, u.a.		
5-Methoxy-8-Geranylpсорален	Samen	DREYER, 1968
Phellopterin	"	"
Isopimpinellin	" / Rinde	IRIARTE et al., 1956
Bergapten	Rinde	"
Scopoletin	"	"
CHINOLINALKALOIDE, u.a.		
Casimiroin	Samen/Rinde	DREYER, 1968
Edulein	" / "	"
Edulin	Samen	"
Edulin und Edulinin	Rinde	IRIARTE et al., 1956
1-Methyl-2-phenyl-4-chinolin	Samen	DREYER, 1968
FUROCHINOLINALKALOIDE		
γ-Fagarin, Dictamnin, Skimmianin	Rinde	IRIARTE et al., 1956
IMIDAZOLALKALOIDE		
Casimiroedin	Blätter/Samen	ROMERO et al., 1983
N-Methyl- und N,N-Dimethylhistamin	" / "	"
Zapotidin	Samen	KINCL et al., 1956
AMIDE		
Palmitinsäureamid	Samen	KINCL et al., 1956
N-Benzyltyramin	"	"
LIMONOIDE BITTERSTOFFE		
Zapoterin	Samen	DREYER, 1968
Deacetylnomilin	"	"
7α-Obacunol	"	"
Obacunon	"	SONDHEIMER et al., 1959
STEROIDE		
β-Sitosterin	Samen	POWER UND CALLAN, 1911

Tab. 1.1: Übersicht über die bisher aus *Casimiroa edulis* isolierten Verbindungen

Phytochemisch untersucht wurden bei *Casimiroa edulis* bis jetzt vor allem die Samen und die Rinde, die Blätter hingegen waren bisher von geringerem Interesse. Eine Übersicht über die bis jetzt bekannten Verbindungen aus *C. edulis* ist aus Tabelle 1.1 zu entnehmen. Exemplarisch sind einige der charakteristischen Verbindungen in Abb. 1.9 dargestellt.

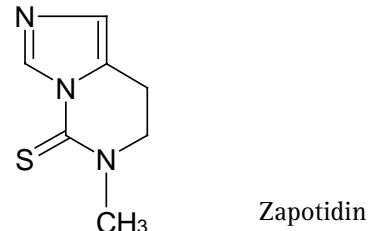
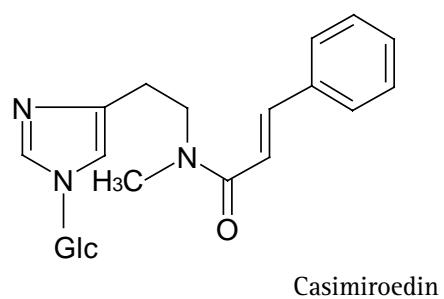
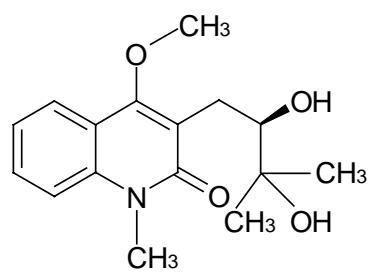
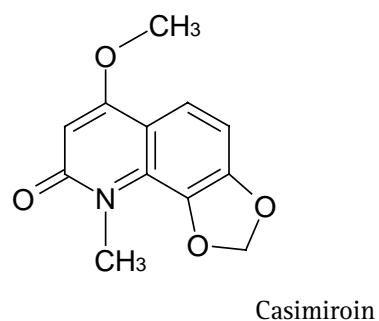
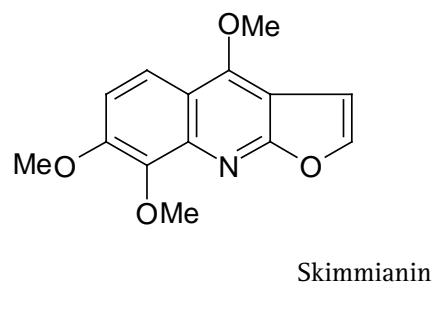
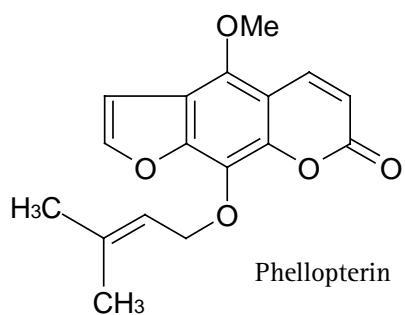
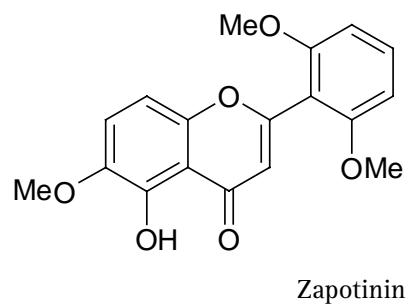
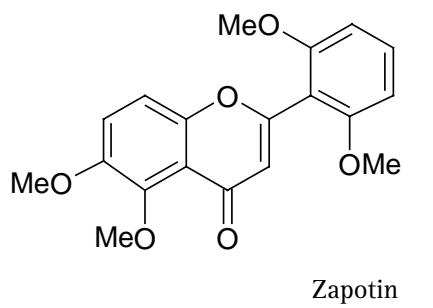


Abb. 1.9: Verbindungen aus *Casimiroa edulis*

1.3 Diarrhoe

1.3.1 Definition und Ursachen

Diarrhoe ist das vorherrschend auftretende Symptom bei Infektionen des Gastrointestinaltrakts. Sie manifestiert sich durch die gehäufte Entleerung (mehr als 3-mal täglich) wässriger oder breiiger Stühle (THEWS et al., 1999). Damit einher geht ein erhöhter Verlust an Flüssigkeit, insbesondere Elektrolyten und Wasser. Es kann generell unterschieden werden zwischen akuter und chronischer Diarrhoe.

Unter pathogenetischen Gesichtspunkten lassen sich mehrere Erscheinungsformen der Diarrhoe unterscheiden. In nahezu allen Fällen kann beobachtet werden, daß bei einem bestimmten Darmabschnitt die sekretiven gegenüber den absorptiven Vorgängen überwiegen (KEUSCH und DONOWITZ, 1983). Die Einteilung erfolgt nach den verschiedenen Auslösemechanismen, wobei oftmals mehrere Ursachen gleichzeitig für die auftretenden Symptome verantwortlich gemacht werden können. Diarrhoe kann zum einen bei Motilitätsstörungen auftreten. Der Darminhalt passiert den Darm mit einer gesteigerten Geschwindigkeit, die Resorption von Wasser wird dadurch erschwert (TURNBERG, 1991). Auslöser können in diesem Fall Stress oder Angst sein, ebenso eine Hyperthyreose oder auch ein Karzinoid, das unter anderem für die Produktion von Prostaglandin E₂ verantwortlich ist (KIMBERG et al., 1974; MISIEWICZ et al., 1969). Eine osmotische Diarrhoe wird verursacht durch Maldigestion (u.a. genetisch bedingter Enzymdefekt, wie z.B. Laktase- mangel) oder Malabsorption (TURNBERG, 1991). Auch die Verabreichung nichtresorbierbarer Substanzen wie Laxantien oder Zuckeraustauschstoffe führen zu dieser Symptomatik. Zahlreiche verschiedene Ursachen können der sekretorischen Diarrhoe zugrunde liegen. In diesem Fall kann an der intestinalen Mucosa eine gesteigerte Sekretion (Cl⁻) bzw. reduzierte Absorption (Na⁺) von Salzen registriert werden. Als Folge wird vermehrt Wasser ins Lumen transportiert (TURNBERG, 1991). Als Sekretagogum können beispielsweise endogene Substanzen wirken. Dazu zählen unter anderem Neurotransmitter wie Acetylcholin oder VIP (vasoactive intestinal peptide) bzw. Hormone wie Sekretin, Substanz P oder PGE₂. Des weiteren kann eine sekretorische Diarrhoe durch verschiedene Bakterienenterotoxine ausgelöst werden, wie z.B. durch die Toxine von *Escherichia coli*, *Yersinia*

enterocolitica, *Shigella dysenteriae* und das sehr gut untersuchte Toxin von *Vibrio cholerae* (ASAKURA und YOSHIOKA, 1994; KEUSCH und DONOWITZ, 1983).

1.3.2 Ionentransportmechanismen am Darmepithel

Die Absorption von Elektrolyten und Wasser stellt den Nettotransport dar, der sich aus den Transportvorgängen in beide Richtungen über die Schleimhaut ergibt. Kleinste Veränderungen bzw. Störungen des gegebenen Gleichgewichts können in einer Nettosekretion resultieren (TURNBERG, 1991). Allgemein gilt, daß die sekretiven Vorgänge zum größten Teil in den Krypten des Darmepithels stattfinden, wohingegen die Absorption in den Villi vor sich geht (DONOWITZ und MADARA, 1982). Bei den Ionentransportmechanismen kann zwischen transzellulärem und parazellulärem Transport unterschieden werden, ebenso gibt es die Möglichkeit des aktiven (energieverbrauchenden) oder passiven (entlang eines Gradienten) Transports (CROWE und POWELL, 1995).

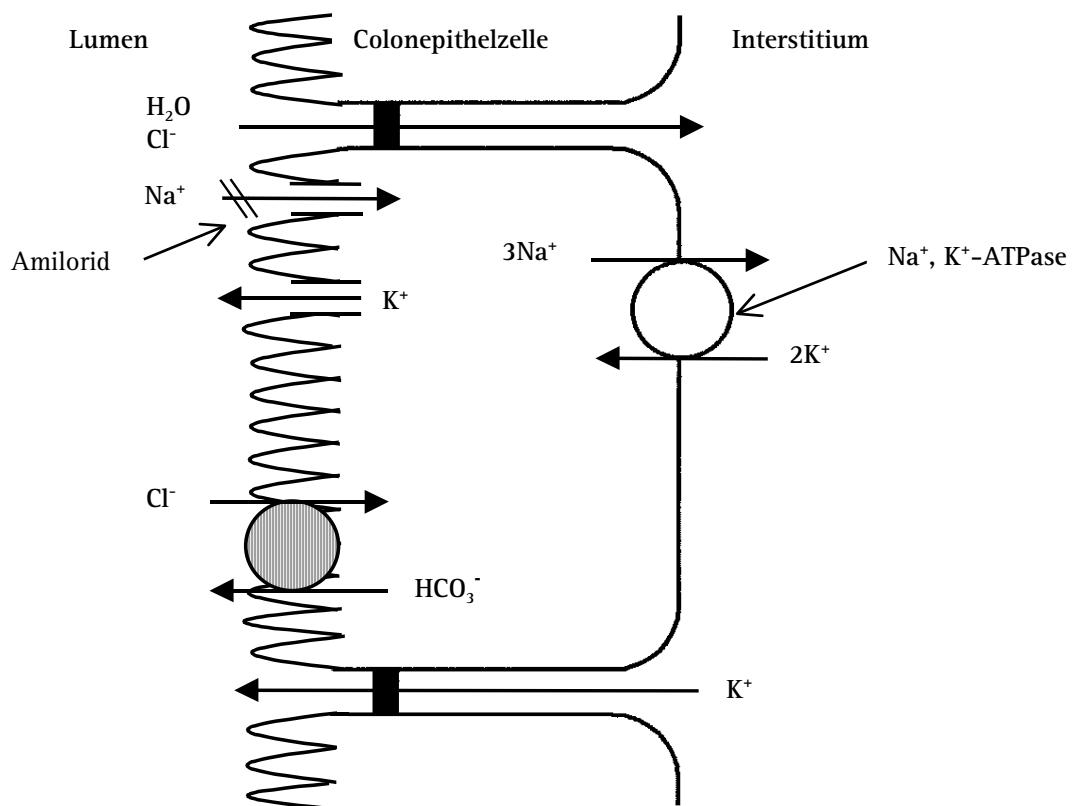


Abb. 1.10: Elektrogene Na^+ - Aufnahme am Dickdarmepithel

Für die Aufnahme von Na^+ aus dem Lumen gibt es drei verschiedene Möglichkeiten, von denen eine je nach Darmabschnitt überwiegt. Im Kolon wird Na^+ überwiegend aktiv aufgenommen (vgl. Abb. 1.10). Es handelt sich um einen elektrogenen Transportmechanismus über Amilorid-sensitive Na^+ -selektive Ionenkanäle in der apikalen Membran der absorptiven Zellen (CAREY et al., 1994). Die Na^+ -Resorption über diese Kanäle wird durch Aldosteron reguliert. Aldosteron steigert die Na^+ -Aufnahme im Colon durch eine Erhöhung der Anzahl der Kanäle (TURNAMIAN und BINDER, 1989). Der Antrieb für diesen Transportmechanismus ist durch die Na^+, K^+ -ATPase in der basolateralen Membran der Epithelzellen gegeben. Diese sorgt für einen Na^+ -Gradienten vom Darmlumen in Richtung Zellinneres abfallend (das Zellplasma ist elektronegativ), indem sie unter Energieaufwand drei Na^+ -Ionen basal aus der Zelle schleust und zwei K^+ -Ionen in die Zelle pumpt (TURNBERG, 1991; KEUSCH und DONOWITZ, 1983). Die Cl^- - Ionen folgen dem Na^+ parazellulär, d.h. passiv von luminal nach serosal oder transzellulär über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher.

Die Na^+, K^+ -ATPase ist auch die Antriebskraft für die beiden anderen Na^+ -Transportmechanismen (Abb. 1.11). Im Dünndarm, der für 85% der Na^+ -Aufnahme (SCHMIDT und THEWS, 1997) verantwortlich ist, herrscht der elektroneutrale carrier-vermittelte Kotransport von Na^+ und Cl^- vor. An diesem Transportvorgang sind zwei verschiedene carrier beteiligt (TURNBERG et al., 1970). Zum einen wird im Austausch gegen Na^+ aus dem Lumen ein H^+ -Ion aus der Zelle geschleust. Zurück bleibt ein Hydroxidion. In einer Karboanhydratase-katalysierten Reaktion wird dieses mit CO_2 zu HCO_3^- umgesetzt. Letzteres wiederum wird im Austausch gegen Cl^- - vermittelt durch den zweiten carrier - ins Darmlumen sezerniert (YOUNG et al., 1994). Vorherrschend im Dünndarm ist der gekoppelte Transport von Na^+ und organischen Molekülen wie Aminosäuren, Gallensäuren, Zuckern etc.. Am besten untersucht ist Na^+ -Glucose-Kotransporter (vgl. Abb. 1.11). Der Na^+ -Gradient, der durch die Na^+, K^+ - ATPase aufrechterhalten wird, ermöglicht die Aufnahme der organischen Moleküle gegen einen Konzentrationsgradienten. Die Existenz dieser Na^+ -Kotransporter und die Tatsache, daß diese während sekretorischer Diarhoeen nicht inhibiert werden, bildet die Grundlage für die Orale Rehydratations-Therapie (ORT). Die Lösungen enthalten Glucose, Aminosäuren etc., die trotz der gesteigerten Sekretion aufgenommen werden können (CROWE und POWELL, 1995). Es muß bezüglich der Na^+ - Transportmechanismen im Dünndarm erwähnt werden, daß lediglich ca. 15% des resorbierten

Na^+ auf die beschriebene Weise transzellulär aufgenommen wird. Der größte Teil (85%) wird parazellulär über das Epithel transportiert. Die Ursache hierfür liegt in der hohen Durchlässigkeit der tight junctions. Deren Porendurchmesser nimmt zum Colon hin ab, das Ausmaß des transzellulären Transports zu (SCHMIDT und THEWS, 1997).

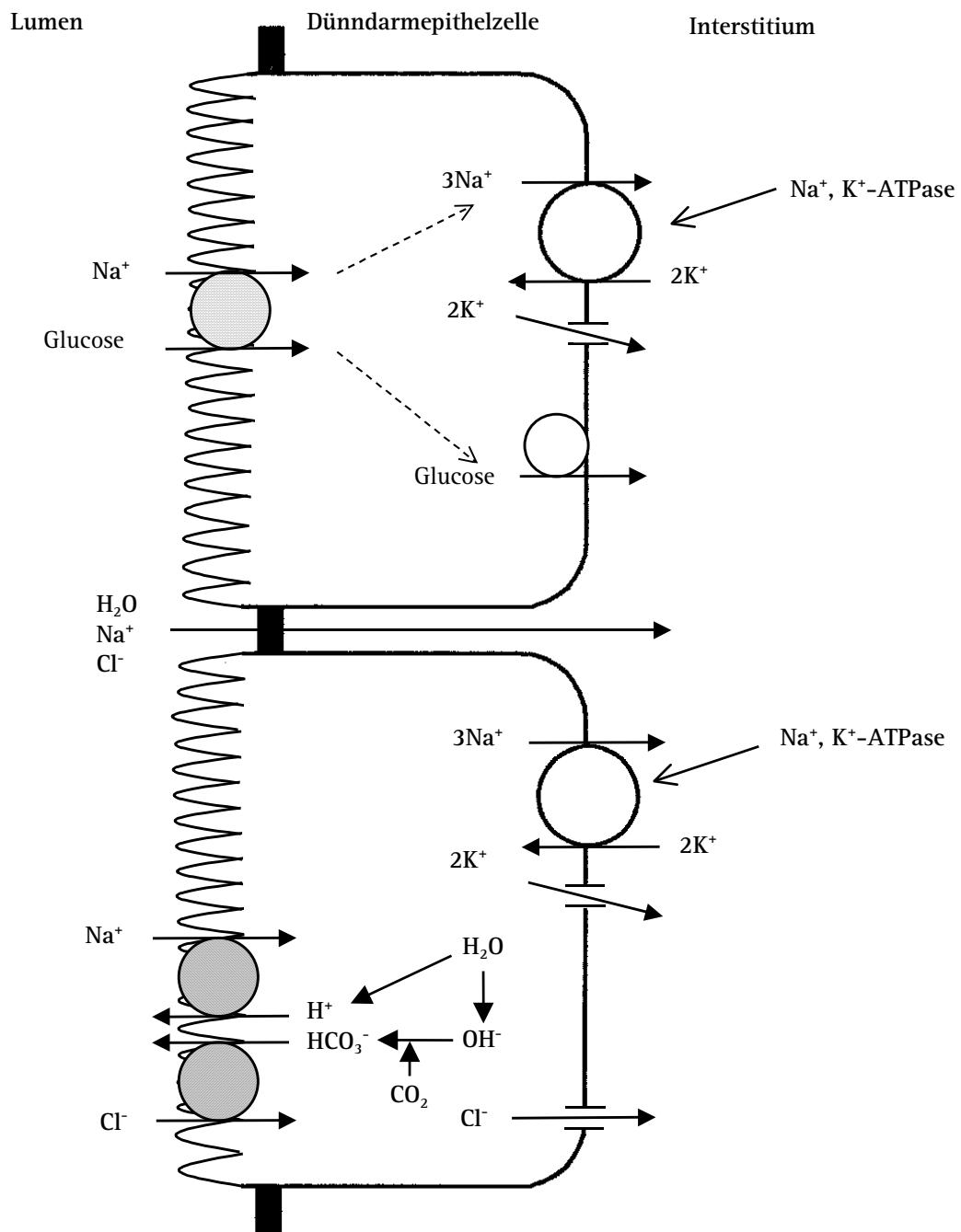


Abb. 1.11: Na^+ - Aufnahme am Dünndarmepithel

Die Cl^- -Aufnahme am Dickdarmepithel erfolgt parazellulär oder transzellulär über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Des Weiteren zeigt eine Untersuchung des distalen Kaninchencolons, daß K^+ über Barium-sensitive Kanäle in der apikalen Membran ausgeschleust werden kann (WILLS, 1985). Der Antrieb dieses Ausstroms ist vor allem durch den basolateralen Einstrom (Na^+/K^+ -ATPase) gegeben.

Neben den resorptiven Prozessen am Epithel findet eine permanente Sekretion statt, jedoch auf einem sehr geringen Niveau, so daß sie im Normalfall nicht relevant ist (FIELD, 1981). Bei den sekretorischen Prozessen spielt insbesondere die Sezernierung von Cl^- eine Rolle (vergl. Abb. 1.12). Cl^- wird an der basolateralen Membran aufgenommen. Dies geschieht mittels eines $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Kotransporters. Den Antrieb für diesen Transportmechanismus liefert wiederum die Na^+, K^+ -ATPase, die Na^+ aus der Zelle schleust. Cl^- wird in der Zelle akkumuliert und verlässt durch Kanäle in der apikalen Membran die Epithelzelle. Dies geschieht auf niedrigem Niveau, da die Cl^- -Kanäle in der apikalen Membran im Normalzustand nur wenig durchlässig für Chloridionen sind (KEUSCH und DONOWITZ, 1983).

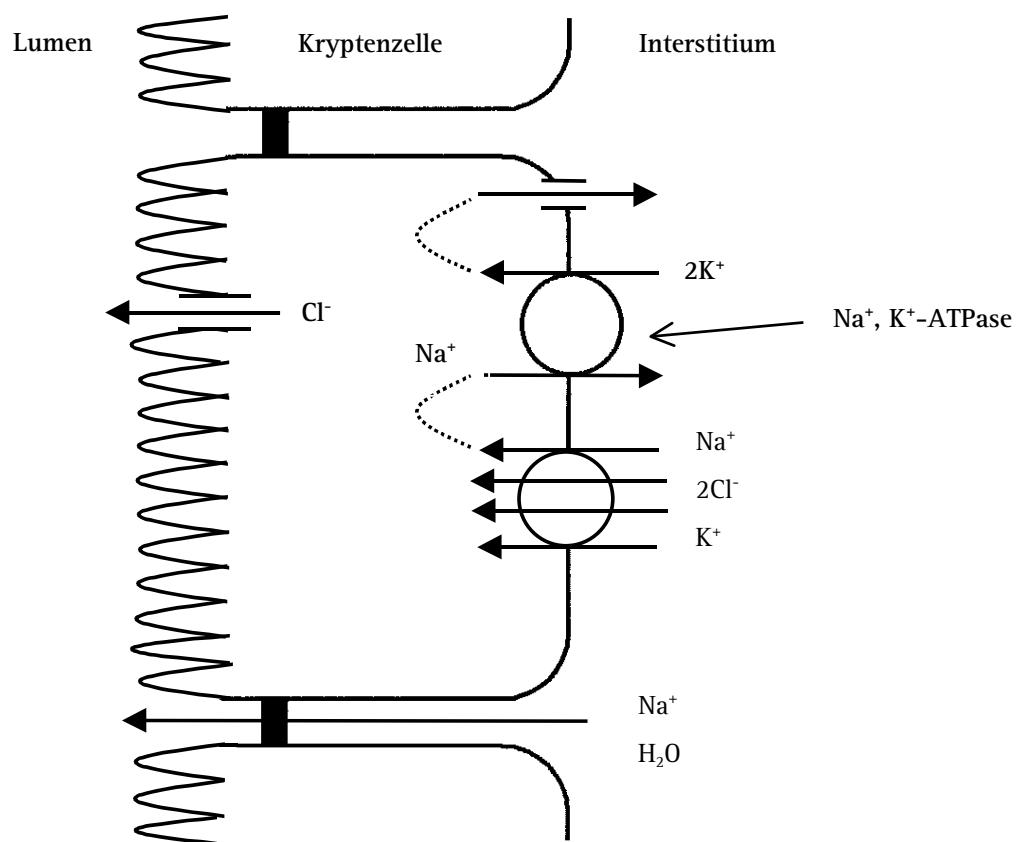


Abb. 1.12: Cl^- -Sekretion am Dünnd- und Dickdarmepithel

Über den parazellulären Transportweg können Na^+ , K^+ und Wasser folgen. Ein Eingriff in die Steuerungsmechanismen der apikalen Cl^- -Kanäle durch endogene oder exogene Faktoren ist die Ursache für die sekretorische Diarrhoe.

1.3.3 Second messenger und Ionentransport

Die Regulation des intestinalen Elektrolyttransports erfolgt mittels intrazellulärer Botenmoleküle, der sogenannten *second messenger*. Deren Modulation hängt von verschiedenen exogenen oder endogenen Stimuli ab. Die Rezeptoren für die endogenen Faktoren befinden sich an der basolateralen Membran der Epithelzellen, die Rezeptoren für die bakteriellen Enterotoxine können an der apikalen Membran nachgewiesen werden. Hat eine Bindung an einen Rezeptor stattgefunden, wird im Innern der Epithelzelle eine Reaktionsabfolge in Gang gebracht, die zu einer Beeinflussung der Ionentransportmechanismen am Epithel führt. Sowohl cAMP und cGMP als auch Ca^{2+} -Ionen spielen eine wichtige Rolle. Erhöht sich die intrazelluläre Konzentration dieser Botenmoleküle, kommt es zu einer Stimulierung der Cl^- -Sekretion bei den Epithelzellen der Krypten und einer Hemmung der elektroneutralen NaCl -Absorption durch die Villus-Zellen (CROWE und POWELL, 1995). cAMP wird von der Adenylylzyklase synthetisiert. Hierbei handelt es sich um ein membrandurchspannendes Enzym, das in der basolateralen Membran der Epithelzellen sitzt. Das Substrat des Enzyms ist ein MgATP^{2-} -Komplex (SMITH und WOOD, 1997). Die Signale, die eine cAMP-Synthese auslösen, werden von einem Rezeptormolekül empfangen, das sich lateral durch die Membran bewegt, ohne direkt in Kontakt mit der Adenylylzyklase zu treten. Die Übertragung des Signals vom Rezeptormolekül auf die Adenylylzyklase erfolgt mittels eines G-Proteins (GILMAN, 1984). cAMP aktiviert die Proteinkinase A. Die katalytischen Untereinheiten dieses Enzyms phosphorylieren Serin-, Threonin- und Tyrosinreste an den Zielproteinen. Zu diesen gehören der Cl^- -Kanal in der apikalen Membran der Enterozyten und der Na^+/H^+ -Austauscher. cGMP wird vom Enzym Guanylylzyklase, das in der apikalen Membran vor allem der Zellen in den Colonkrypten verankert ist, synthetisiert. Die Aktivierung erfolgt entsprechend von der luminalen Seite her (DE JONGE, 1975). Die Guanylylzyklase ist unter anderem der Angriffs punkt für bakterielle Enterotoxine, beispielsweise das hitzestabile Toxin von *E. coli*.

(VAANDRAGER et al., 1993). cGMP ist für die Aktivierung der Proteinkinase G verantwortlich, die wiederum die Phosphorylierung eines Transmembranproteins (Ionenkanal) katalysiert und so in die Regulation der Ionentransportvorgänge eingreift (DE JONGE, 1981).

Es konnte gezeigt werden, daß auch durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle die apikale Cl^- - Sekretion gesteigert wird (LOO und KAUNITZ, 1989). Die Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kann, je nach Signalmolekül auf unterschiedliche Weise erfolgen. Neben einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom an der basolateralen Membran kann der Ca^{2+} -Spiegel über den Ca^{2+} -Ausstrom gesteuert werden, der durch eine Ca^{2+} -ATPase vermittelt wird, die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern oder die Bindung an das Protein Calmodulin (CROWE und POWELL, 1995). Der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert eine Proteinkinase, die unter anderem den apikalen Cl^- - Kanal phosphoryliert, was zu einer Öffnung desselben führt. Des weiteren greift er regulierend in den Stoffwechsel der zyklischen Nukleotide ein. Durch die Erniedrigung der cytosolischen Cl^- - Konzentration erfolgt eine Aktivierung des $Na^+, 2Cl^-, K^+$ - Kotransporters, durch den vermehrt Cl^- zur Verfügung gestellt wird (GREGER et al., 1984).

1.3.4 Motorik des Darmes

Die Motorik des Darmes dient dem Transport der Nahrung und der Vermischung der selben mit Verdauungssekreten. Sie unterliegt einer unwillkürlichen Steuerung. Die Grundlage für die Motorik ist die glatte Muskulatur des Darmes. Diese ist aus mehreren Muskelschichten aufgebaut. Nach außen hin, von der Serosa begrenzt befindet sich die Längsmuskulatur. Von der luminalen Seite her folgt der Mucosa die *Muscularis mucosae*. Zwischen den beiden erwähnten Muskelschichten liegt die Ringmuskulatur. Die Steuerung der Motorik erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen, unter anderem durch die Neuronen des Darmnervensystems. Dieses setzt sich zusammen aus dem *Plexus myentericus* (Auerbach; zwischen Längs- und Ringmuskelschicht), dessen Efferenzen an den glatten Muskelzellen der Längs- und der Ringmuskulatur enden und dem *Plexus submucosus* (Meißner; zwischen Ringmuskulatur und *Muscularis mucosae*), der vorwiegend die sekretorische Funktion der Epithelzellen steuert. Übergeordnet ist das vegetative Nervensystem, das lediglich einen modifizierenden Einfluß auf die Motilität hat. Der Sympathikus

übt über noradrenergische Nervenendigungen einen hemmenden Einfluß aus. Der Parasympathikus fördert die Motorik über cholinergisch-muskarinische Transmission. Als höchste Ebene ist das ZNS für die Regulation verantwortlich. Auf der Ebene des Darmnervensystems sind unter anderem die Mechanorezeptoren, die für die Aufnahme von Dehnungsreizen zuständig sind, relevant. Sie gehören, zusammen mit den Chemo- und den Schmerzrezeptoren, zu den Afferenzen der beiden Plexus. So ist die gesteigerte Motilität bei erhöhtem Füllungsdruck des Darms, beispielsweise bei Diarrhoe zu erklären. Durch eine Dehnung der Magen- bzw. Darmwand werden die afferenten Neuronen erregt. Über sogenannte Interneurone erfolgt eine Umschaltung auf efferente Fasern (effferente Motoneuronen). Die Folge ist eine Kontraktion der Muskulatur vor bzw. eine Er schlaffung der selben hinter dem Speisebrei. Es erfolgt der Transport in aboraler Richtung. Eine Steigerung der Motilität ist durch die Verabreichung von Substanzen möglich, die ihrerseits zu einer gesteigerten Acetylcholin-Freisetzung führen. Eine Herabsetzung wiederum wird erreicht durch eine Stimulierung der Opiatrezeporen (z. B. durch Lopera mid) bzw. eine Aufhebung der Acetylcholinwirkung (Anticholinergika). An der Regulation der Motorik sind unter anderem auch Nervenfasern beteiligt, die weder Noradrenalin noch Acetylcholin, die vorherrschenden Transmitter, als Überträgerstoff aufweisen, sogenannte NANC-Fasern (nicht-adrenerg-nicht-cholinerg). Verbindungen wie Serotonin oder Substanz P führen in diesem Fall zur Muskelkontraktion, NO, VIP oder ATP zur Relaxation (THEWS et al., 1999; SCHMIDT und THEWS, 1997; MURER und BERGER, 1992).

1.3.5 Biogene Antidiarrhoika aus Pflanzen

Diarrhoe ist eine der Hauptindikationen von Gerbstoffen bzw. gerbstoffhaltigen Pflanzen. Deren Anwendung in diesem Bereich ist seit langem bekannt und weltweit verbreitet. Die biologische Wirkung dieser Verbindungen wurde zumeist ihrer adstringierenden d.h. proteinfällenden Wirkung zugeschrieben. Durch die Eiweißfällung soll es zur Bildung einer schützenden „Haut“ an der Epitheloberfläche kommen. Es gibt allerdings keine Untersuchungen, die diesen Mechanismus tatsächlich belegen. Beispiele für gerbstoffhaltige Drogen, die bei Durchfall verwendet werden und bei denen ein Wirkmechanismus nachgewiesen werden konnte, sind die Blätter von *Camellia sinensis* (Theaceae), dem Schwar

zen Tee und die Rinde von *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae), einer bei Diarrhoe verwendeten Arzneipflanze aus Mexiko. Es konnte gezeigt werden, daß ein Extrakt aus Schwarzem Tee bei Mäusen die durch Cholera-Toxin ausgelöste Sekretion ins Darmlumen um etwa 57 % hemmt. Der Extrakt erwies sich als aktiv bei einer Applikation 5 min nach dem Toxin, nicht aber nach 30 min (TODA et al., 1991). Die antisekretorische Aktivität der Rinde von *G. ulmifolia* wurde am distalen Kaninchencolon in der USSING-Kammer untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß der Rohextrakt dieser Arzneipflanze die durch Cholera-Toxin induzierte Cl^- -Sekretion bei einer mucosalen Applikation vollständig hemmt. Die dosisabhängige antisekretorische Wirkung war ausschließlich der wässrigen Phase des Rohextrakts zuzuschreiben. Verantwortlich für die Aktivität waren polymere Proanthocyanidine mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad zwischen 14 und 32 (HÖR, 1996). Beide gerbstoffhaltige Drogen inaktivieren das Exotoxin von *Vibrio cholerae* und wirken so antisekretorisch. Des weiteren könnte an der antidiarrhoischen Wirkung der Gerbstoffe auch deren nachgewiesene antimikrobielle Wirksamkeit beteiligt sein. Frische Extrakte aus Schwarzen und Grünen Tee hemmen das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* und *Vibrio cholerae* non O1. Darüber hinaus wirken Extrakte des Schwarzen Tees bakterizid gegen *Vibrio cholerae* El Tor (TODA et al., 1991, TODA et al., 1989).

1.4 Flavonoide

Flavonoide stellen Benzo- γ -Pyron-Derivate dar und können in allen Gefäßpflanzen nachgewiesen werden. Sie können als Aglykone bzw. als Glykoside vorliegen.

1.4.1 Biosynthese und Einteilung

Die neueren Untersuchungen im Bereich der Biosynthese der Flavonoide konzentrierten sich vor allem auf die Charakterisierung neuer Enzyme und damit verbunden das Schließen der Lücken in der Synthese. Des weiteren wurden bekannte Schlüsselenzyme wie beispielsweise die Phenylalaninammoniaklyase (PAL) oder die Chalconsynthase (CHS)

bezüglich ihrer Aktivierung, Regulation und gewebespezifischen Expression untersucht. Die einzelnen Syntheseschritte, die zu den Vorstufen der Flavonoide und zu den Strukturen der verschiedenen Klassen dieser Stoffgruppe führen, sind in Abb. 1.13 dargestellt (HELLER und FORKMANN, 1994).

Der B-Ring des Flavonoidgrundkörpers und ein Teil des Heterozyklus (C-Ring) lassen sich von p-Cumaroyl-CoA (4-Hydroxycinnamoyl-CoA) ableiten. Der A-Ring setzt sich aus 3 Acetateinheiten, hervorgehend aus Malonyl-CoA, zusammen. Die Schlüsselreaktion der Synthese der aromatischen Komponente besteht in der Deaminierung der Aminosäure Phenylalanin, die über den Shikimatweg synthetisiert wird. Diese Reaktion wird von der PAL katalysiert. Das Schlüsselenzym für die Synthese des Flavonoidgrundkörpers ist die CHS, die die schrittweise Kondensation von 3 Acetateinheiten aus Malonyl-CoA an p-Cumaroyl-CoA katalysiert. Produkt dieser Reaktion ist das C₁₅-Intermediat 2',4',6',4-Tetrahydroxychalcon. Der Ringschluß, der zum Flavanon Naringenin führt, wird durch die Chalconisomerase katalysiert. Naringenin stellt die Ausgangsverbindung für die verschiedenen Klassen der Flavonoide dar. Flavonsynthase I und II katalysieren eine Dehydrierung an Position 2 und 3, was zur Bildung von Apigenin, einem Flavon führt. Eine Reduktion des Carbonylsauerstoffs des Naringenins an C-4 durch die Flavanon-4-Reduktase führt zu Apiforol, einem Flavan-4-ol. Eine Hydroxylierung des Naringenins an Position 3 durch die Flavanon-3-Hydroxylase hat Dihydrokaempferol, ein Flavanonol als Produkt. Dieses wiederum kann durch die Einführung einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 durch die Flavonolsynthase zu Kaempferol dehydriert oder über die Zwischenstufe des Leucopelargonidins in 2 Schritten zum Anthocyanidin Pelargonidin zunächst reduziert und dann dehydriert werden. Beteilt sind die Dihydroflavanonol-4-Reduktase und die Anthocyanidinsynthase. Entsprechend der Position des Phenylrestes am C-Ring kann zwischen den Flavonoiden im engeren Sinn und den Isoflavonoiden (Phenylrest an Position 3) unterschieden werden. Letztere sind das Produkt, sofern am Naringenin die 2-Hydroxyisoflavanonsynthase und die 2-Hydroxyisoflavanonde-hydratase angreifen. Die dargestellten Zwischenstufen und Endprodukte können durch zahlreiche bisher beschriebene Enzyme hydroxyliert, methyliert, glykosyliert oder acyliert werden, was zu der großen Anzahl verschiedener Flavonoide führt, die bisher charakterisiert werden konnten. Es können ebenso bereits im Laufe des Synthesewegs Modifikationen auftreten, was

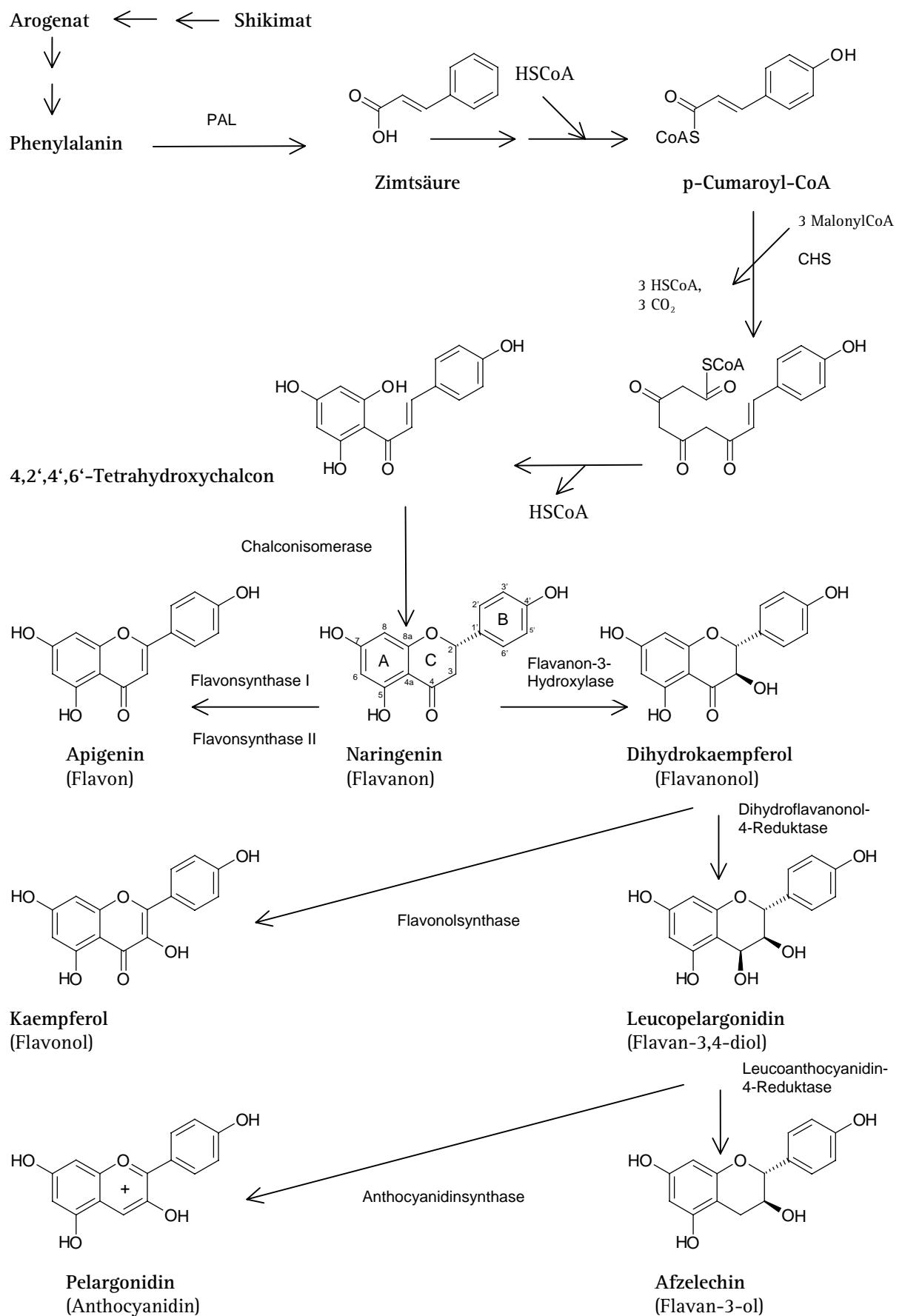


Abb. 1.13: Biosynthese von Flavonoiden

beispielsweise zum relativ ungewöhnlichen Substitutionsmuster am A-Ring bei den 5,6-methoxylierten Flavonen führt. In diesem Fall wurde vorgeschlagen, daß bereits auf der Stufe des Tetrahydroxychalconintermediats eine Hydroxylierung an Position 6 stattfindet, was eine Voraussetzung für die Methylierung an dieser Position im Verlauf der weiteren Synthese ist (DATTA et al., 1969).

1.4.2 Lokalisation und Bedeutung für die Pflanze

Die Lokalisation der Flavonoide auf Zellebene hängt von den Löslichkeitseigenschaften der einzelnen Verbindungen dieser Substanzklasse ab, wodurch sich charakteristische Unterschiede ergeben zwischen den vakuolären Flavonoidprofilen und der Flavonoidzusammensetzung, wie diese z.B. an der Blattoberfläche von Pflanzen zu finden ist. So liegen die Glykoside, hier vor allem die der Anthocyane, zumeist im Zellsaft der Vakuole gelöst vor. Die verhältnismäßig unpolaren Aglykone hingegen kommen, bedingt durch ihre gute Löslichkeit in wachsartiger Umgebung, zumeist epicutikulär vor (WILLIAMS und HARBORNE, 1994). Dies kann durch die Behandlung beispielsweise der Blattoberflächen mit unpolaren Lösungsmitteln nachgewiesen werden. Flavonoide an den Oberflächen finden sich vor allem bei Pflanzen, die in aridem bzw. semiaridem Klima wachsen. Diese Arten weisen gehäuft sezernierende Eigenschaften auf. Es liegt in diesem Fall eine Beschränkung auf bestimmte Taxa vor.

Ein Beispiel für die medizinische Verwendung sind die lipophilen Flavonoide aus dem Exsudat der Knospen bestimmter Pappelarten, die sich in Propolis nachweisen lassen (WOLLENWEBER, 1994).

Bezüglich der Lokalisation besteht weiterhin auch die Möglichkeit einer kovalenten Bindung an die Hemicellulose der Zellwand wie zum Beispiel bei Kaempferol-3-O-glucosid in den Nadeln von *Picea abies* (STRACK et al., 1989). Es hat sich gezeigt, daß die Flavonoide innerhalb eines Organs meist auf bestimmte Gewebe bzw. Zellschichten beschränkt sind. Ein Beispiel dafür sind die Anthocyane, die in den Blättern entweder in der Epidermis oder im Mesophyll in einzelnen Zellschichten nachgewiesen werden können. Bisweilen liegt auch eine Beschränkung der Lokalisation auf einzelne Zellen innerhalb eines

Verbandes vor, was im Fall der Anthocyane beispielsweise zu einer speziellen Färbung führen kann (MCCLURE, 1975).

Flavonoide fungieren insbesondere als Farb- bzw. Schutzpigmente in der Pflanze. Die Schutzfunktion wird vor allem durch die Anthocyane übernommen. Durch ihre Fähigkeit, kurzwelliges UV-Licht (insbesondere UV-B: 280 – 315 nm) zu absorbieren ist der Schutz des Photosyntheseapparats gewährleistet. Dies ist insbesondere für den jungen Keimling wichtig, weshalb die Pigmente in diesem Fall auch als Jugandanthocyane bezeichnet werden (WOLLENWEBER und JAY, 1988). Außerdem sind die Anthocyane für die verschiedenen Blau- und Rottöne der Blüte verantwortlich und für die Herbstfärbung der Blätter. Die Gelbfärbung wiederum wird beispielsweise durch gelbe Flavonole (Gossypetin, Quercetagetin etc.) hervorgerufen. Diese weisen normalerweise eine zusätzliche OH- oder OCH₃-Gruppe an Position 6 bzw. 8 auf. Zum anderen sind Chalcone und Aurone (gemeinsam als Anthochlor bezeichnet) für die gelbe Farbe verantwortlich. Die weiße Blütenfarbe wird durch Flavone wie beispielsweise Luteolin oder Apigenin oder Flavonole wie Kaempferol oder Quercetin verursacht (BROUILLARD und DANGLES, 1994; HARBORNE, 1988). Neben ihrer Eigenschaft als Schutzpigmente und optische Signale für potentielle Bestäuber der jeweiligen Pflanze können Flavonoide auch Geschmacksstoffe sein. Ein Beispiel dafür ist Naringin (7-Neohesperosid des Naringenin), eine bitter schmeckende Verbindung aus *Citrus*. Das Öffnen des Pyronrings dieses Moleküls führt zu einem Produkt, das etwa 500 mal so süß ist wie Saccharose (HOROWITZ, 1964). Flavonoide können auf Insekten als Repellentien wirken (Rutin, Quercitrin, Isoquercitrin bei best. *Lepidoptera*). Oder sie sind Attraktantien für Insekten und erleichtern diesen so das Auffinden ihrer Nahrungsquelle (Isoquercitrin bzw. Morin beim Seidenspinner, *Bombyx mori*; HARBORNE, 1988). Des weiteren spielen bestimmte Flavonoide beim Wachstum der Pflanzen eine wichtige Rolle. So wird beispielsweise die Indolessigsäureoxidase, ein Enzym, das für den Abbau des Auxins Indolessigsäure (IAA), einem pflanzlichen Wuchshormon, mitverantwortlich ist, durch Kaempferol inhibiert (FURUYA et al., 1962).

Flavonoide können Phytoalexine sein, die zur pflanzeneigenen Abwehr gehören, so z. B. Pisatin aus *Pisum sativum* oder Phaseollin aus *Phaseolus vulgaris* (MCCLURE, 1975).

1.4.3 Beispiele für biologisch-pharmakologische Wirkungen

Neben den Funktionen, die Flavonoide für die Pflanze selbst besitzen, können auch eine Vielzahl biologisch-pharmakologischer Wirkungen nachgewiesen und erklärt werden. Bisher allerdings beziehen sich die Aussagen bezüglich der Wirkungen der Vertreter dieser Stoffgruppe fast ausschließlich auf *in vitro*-Untersuchungen. Aus diesen geht hervor, daß im Rahmen ihrer biologischen Aktivität insbesondere ihre Wechselwirkung mit Proteinen wichtig ist. So konnte *in vitro* eine Beeinflussung unterschiedlichster Säugetier-Enzymsysteme durch Flavonoide nachgewiesen werden; in den meisten Fällen zeigte sich eine Struktur-Wirkungsbeziehung (MIDDLETON JR und KANDASWAMI, 1994). Ein wichtiges Beispiel für eine derartige Beeinflussung der Aktivität ist die Wechselwirkung mit Enzymen, die an der Prostaglandin- bzw. Leucotriensynthese beteiligt sind, wie z. B. der Cyclooxygenase oder der Lipoxygenase (HAVSTEEN, 1983). Durch eine Inhibierung dieser Schlüsselenzyme durch verschiedene Flavonoide wird eine Freisetzung der entsprechenden Produkte aus dem Arachidonsäurestoffwechsel herabgesetzt oder verhindert. Die Produkte sind, neben zahlreichen anderen Reaktionen am Entzündungsgeschehen bzw. an allergischen Reaktionen beteiligt. Daraus resultieren Erklärungsansätze für eine Vielzahl der biologischen Wirkungen, die durch Flavonoide hervorgerufen werden, wie beispielsweise der Einfluß auf Schmerzen unterschiedlicher Art (Gelenk-, Kopfschmerzen, Insektenstiche, etc.; HAVSTEEN, 1983). Die Wirkung von Flavonoiden im Bezug auf Allergien, so wird vermutet, kann durch eine Inhibierung der Protonen-ATPase der Mastzellen hervorgerufen werden, wodurch eine Freisetzung von Histamin bzw. Serotonin aus denselben verhindert wird. Die Beeinflussung von Membraneigenschaften durch Flavonoide und davon abgeleitet deren bakterizide und antimykotische Wirkung (HARBORNE et al., 1976) kann unter anderem erklärt werden durch die Interaktion dieser Verbindungen mit ATPasen, Phospholipase A₂ bzw. verschiedenen Kinasen (HAVSTEEN, 1983). Durch die Inhibition dieser Enzyme werden insbesondere die Transporteigenschaften von Biomembranen nachhaltig verändert. Es konnte durch die umfangreichen Untersuchungen in diesem Bereich nachgewiesen werden, daß die Bandbreite der Enzyme, die durch Flavonoide beeinflusst werden sehr groß ist, was der Variabilität dieser Stoffgruppe und den unterschiedlichsten Wirkungen entspricht. Eine weitere Eigenschaft, die der Stoffgruppe der Flavonoide zugesprochen wird, ist die der Antioxidantien. Diese Wirkung kann ver-

mutlich vorrangig auf die Fähigkeit der Flavonoide zurückgeführt werden, freie Radikale abfangen zu können bzw. auf die Fähigkeit, mit zweiwertigen Metallionen Chelatkomplexe zu bilden (MCCLURE, 1975). Neben den bereits erwähnten antiinflammatorischen, antiallergischen, antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften konnte gezeigt werden, daß Flavonoide *in vitro* auch antivirale, antiproliferative und antikarzinogene Wirkungen aufweisen (MIDDLETON JR und KANDASWAMI, 1994). Tatsächlich aber gelten Flavonoide gegenwärtig immer noch als sekundäre nicht essentielle Bestandteile der Nahrung. Klinische Studien in ausreichendem Umfang - um widersprüchliche Ergebnisse abzuklären - stehen noch aus bzw. finden sehr eingeschränkt statt (MANUEL Y KEENOVY et al., 1999; STRUCKMANN, 1999; GRAEFE et al., 1999).

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Zubereitung des ethanolischen Rohextrakts und des Tees wurden die Blätter von etwa 2 – 4 Jahre alten Bäumen verwendet, die von Dr. ANITA ANKLI und PAULINO SIMÁ als *Casimiroa tetrameria* MILLSP. identifiziert wurden. Das Pflanzenmaterial wurde in den Monaten September und Oktober 1996 in der Umgebung von Chikindzonot und Ekpedz, Yucatán (Mexiko) von Dr. ANITA ANKLI gesammelt und im Schatten luftgetrocknet. Herbarbelege mit der Nr. AANK049 befinden sich im Herbar des Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) in Merida, dem National Herbarium of Mexico (MEXU), am Instituto Nacional Indigenista (INI) in Valladolid, an der ETH Zürich und am Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy. The School of Pharmacy. University of London.

2.2 Biologische und pharmakologische Testsysteme

2.2.1 USSING-Kammer

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Kaninchen beiderlei Geschlechts verwendet. Das mittlere Gewicht der Tiere lag zwischen 2000 und 2500 g. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Lösungen

Alle verwendeten wässrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

RINGER-Lösung

Während der Versuchsdurchführung wurden beide Seiten der Mucosa von einer RINGER-Lösung mit folgender Zusammensetzung umspült:

<u>Substanz</u>		<u>Endkonz.</u>
NaCl	(ROTH)	120 mM
NaHCO ₃	(MERCK)	25 mM
K ₂ HPO ₄	(RIEDEL-DE-HAËN)	1.6 mM
KH ₂ PO ₄	(MERCK)	0.4 mM
MgCl ₂	(MERCK)	1 mM
D-Calciumgluconat	(SIGMA)	1.3 mM
D-Glucose	(ROTH)	5 mM
Indomethacin	(SIGMA)	1 µM

Die Nährlösung wurde auf beiden Seiten der USSING-Kammer mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) begast. Dies bewirkte die Einstellung auf pH 7.4. Die Temperatur der RINGER-Lösung wurde mittels eines Umwälzthermostaten konstant bei 37° C gehalten.

Indomethacin-Stammlösung

7.16 mg Indomethacin (SIGMA) wurden in 1 ml EtOH (96%) gelöst. Die Aufbewahrung dieser Stammlösung erfolgte unter Lichtausschluß bei 5°C. Die Zugabe von 100 µl dieser Lösung zu 2 l RINGER-Lösung ergab eine Endkonzentration von 1 µM.

Amilorid-Lösung

45.32 mg Amilorid (SIGMA) wurden in 1 ml DMSO (SIGMA) gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden zur mucosalen Seite des Versuchsaufbaus gegeben. Dies entsprach einer Endkonzentration von 0.1 mM.

PGE₂-Lösung

1 mg PGE₂ (SIGMA) wurden in 18.91 ml H₂O gelöst. Aliquots dieser Lösung von 100 µl wurden bei -20°C aufbewahrt. Je Versuchsansatz wurden 100 µl zur serosalen Seite des Versuchsaufbaus gegeben. Dies entsprach einer Endkonzentration von 1 µM.

Proben-Lösungen

Die zu testenden Pflanzenextrakte, Fraktionen und die Reinsubstanz wurden in möglichst kleinen Volumina DMSO gelöst. Die Maximalkonzentration von DMSO in der USSING-Kammer betrug 3 ml/l. Diese Konzentration hat nach GREGER et al. (1991) keinen Einfluß auf die anderen Messparameter.

Präparation

Die Kaninchen wurden durch Dekapitation in der Regel um 8.00 h, d.h. in der Phase des niedrigsten Aldosteron-Blutspiegels getötet. Anschließend wurde die Abdominalhöhle durch einen Medianschnitt geöffnet und 5 - 7 cm des Teils des *Colon descendens* entnommen, der direkt an das Rektum anschließt. Der Darminhalt wurde durch Spülen mit eiskalter RINGER-Lösung entfernt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das isolierte Organstück in eisgekühlter und mit Carbogen begaster RINGER-Lösung bis zu maximal 5 h aufbewahrt. Zur Präparation der Mucosa wurde ein ca. 1.5 cm langes Mucosa-Stück am Mesenterium der Länge nach aufgeschnitten. Das isolierte Gewebestück wurde auf einer Plastikunterlage so fixiert, daß es mit der serosalen Seite nach unten lag. Mit einem stumpf geschliffenen Objektträger wurde die Mucosa vorsichtig von der Muskulatur abgelöst. Anschließend wurde das Gewebestück mit der mucosalen Seite nach unten auf die linke Hälfte der Plexiglaskammer gelegt und dort möglichst straff plaziert. Danach wurde die rechte Hälfte der Kammer vorsichtig auf die bereits vorbereitete Hälfte gesteckt. Die vollständige Kammer wurde in ihrer Halterung fixiert. Im Anschluß wurde die Kammer durch Strom- und Spannungselektroden mit Pulsgeber und Potentiometer (Werkstatt der Biologischen Institute der Universität Freiburg) verbunden.

Versuchsaufbau

Um die antisekretorische Aktivität der Pflanzenextrakte zu untersuchen, wurde eine modifizierte USSING-Kammer (GREGER et. al., 1991; USSING und ZEHREN, 1951) eingesetzt. Dieses Modell stellt eine Standardmethode für die Untersuchung von Sekretionsvorgän-

gen und deren mögliche Beeinflussung dar (FONDACARRO, 1986; FIELD und SEMRAD, 1993). Die Methode geht auf die Versuche von USSING und ZEHREN an der isolierten Froschhaut im Jahre 1951 zurück. Sie ermöglicht die *ex vivo*-Untersuchung von Ionentransportvorgängen an den verschiedensten Epithelien. In Abbildung 2.1 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Das Colonmucosastück war zwischen den beiden Kammerhälften eingespannt. Die exponierte Mucosaoberfläche betrug 0.64 cm^2 . Zur vollständigen Abdichtung der Kammer wurden die Berührungsflächen der Kammerhälften vor dem Einspannen des Gewebestückes mit wenig Schliffett bestrichen. Die Versuchskammer war durch Kunststoffschläuche, die mit Dreiegehähnen versehen waren, mit dem Glasreservoir der Nährlösung verbunden. Die Glaskörper des Reservoirs waren mit jeweils 15 ml RINGER-Lösung gefüllt. Die doppelwandige Begrenzung der Röhren diente zur Thermostatisierung durch ein Umwälzbad. Des Weiteren verfügte jeder Schenkel über eine Öffnung für die Carbogen-Zufuhr. Durch die beidseitige Begasung war die Durchmischung der RINGER-Lösung in der jeweiligen Kammerhälfte gewährleistet.

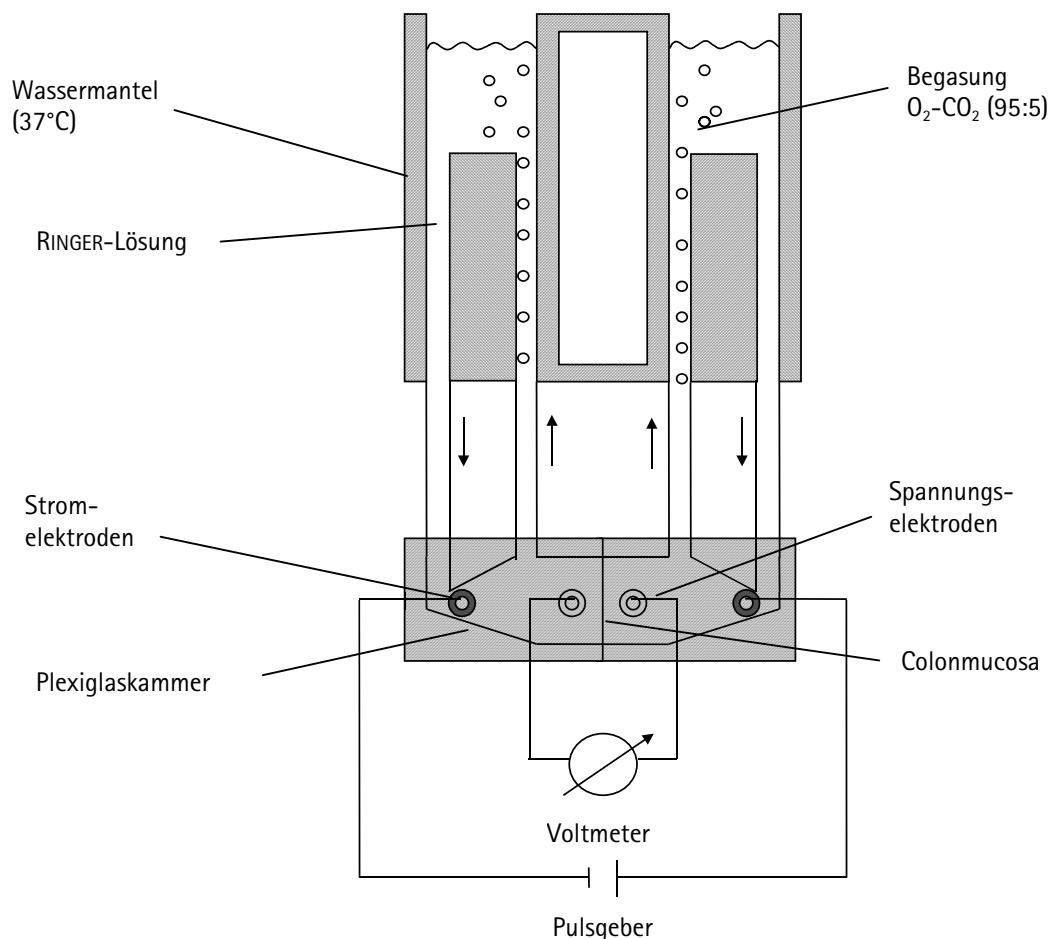


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus – USSING-Kammer

Auf beiden Seiten des Epithels wurden Nährlösung, Temperatur und Druck gleich gehalten. So wurden alle Triebkräfte für einen möglichen passiven Ionentransport eliminiert. Bei der Induktion der Cl^- -Sekretion durch PGE_2 wurde die serosale Seite zum Lichtschutz mit Alufolie abgeschirmt. Die Silberstifte der Elektroden waren über Agarbrücken – ein Gel aus 0.1 M KCl und 2% Agar – mit der Versuchskammer verbunden.

Elektrische Messung

Die Bestimmung des äquivalenten Kurzschlußstroms (I_{sc}), der im beschriebenen Versuchsaufbau dem Ionenfluß über das Epithel entspricht, erfolgte indirekt über die Messung des transepithelialen Potentials (V_{te}) bzw. dessen Änderung (ΔV_{te}) und des transepithelialen Widerstands (R_{te}). Das transepithiale Potential in Abhängigkeit von der Zeit wurde per Computer aufgezeichnet. Die Messung erfolgte alle 20 Sekunden. Mittels Strompulsen (I_{test} : 100 μA ; 10 ms) über die Mucosa in einer Frequenz von 0.1 Hz und der daraus hervorgehenden gemessenen Änderung des transepithelialen Potentials (ΔV_{te}) konnte R_{te} nach dem OHM'schen Gesetz berechnet werden (GREGER et al., 1991):

$$R_{te} = (\Delta V_{te} - \Delta V_{te}^0) \cdot A / I_{test} [\Omega \text{cm}^2]$$

R_{te} : Transepithelialer Widerstand

ΔV_{te}^0 : Änderung des transepithelialen Potentials während des Testpulses in der leeren Kammer

ΔV_{te} : Änderung des transepithelialen Potentials während des Testpulses

I_{test} : Strompuls (100 μA ; 10 ms; 0.1 Hz)

A: Exponierte Oberfläche der Mucosa

Entsprechend wurde der äquivalente Kurzschlußstrom I_{sc} aus dem transepithelialen Potential und dem ermittelten transepithelialen Widerstand berechnet.

$$I_{sc} = V_{te} / R_{te} [\text{A/cm}^2]$$

I_{sc} : Äquivalenter Kurzschlußstrom

V_{te} : Transepithiales Potential

Versuchsablauf

Abb. 2.2 zeigt die Veränderung des transepithelialen Potentials während eines typischen Experiments. Zunächst wurden Kammer und Glasröhren mit RINGER-Lösung gefüllt und der Kammerwiderstand bestimmt. Dem Einlegen der Colonmucosa folgte eine 30- bis 60-minütige Äquilibrierungsphase, in der sich R_{te} und V_{te} stabilisierten. Es baut sich, bedingt durch die aktive Resorption von Na^+ ein messbares Potential auf (FRIZZEL et al., 1976). Durch die Zugabe von Amilorid zur mucosalen Seite des Epithels wird die Na^+ -Aufnahme gehemmt, das transepithiale Potential nimmt daraufhin einen positiveren Wert an, der transepithiale Widerstand nimmt entsprechend zu. Die Zugabe von PGE_2 zur serosalen Seite des Versuchsaufbaus nach etwa 10 min führt rasch zu einem negativen Wert für V_{te} und zu einer Abnahme des transepithelialen Widerstands R_{te} . Sobald das transepithiale Potential und somit auch der negative Kurzschlußstrom I_{sc} konstant ist, wird der zu testende Extrakt bzw. die entsprechende Fraktion oder Reinsubstanz appliziert.

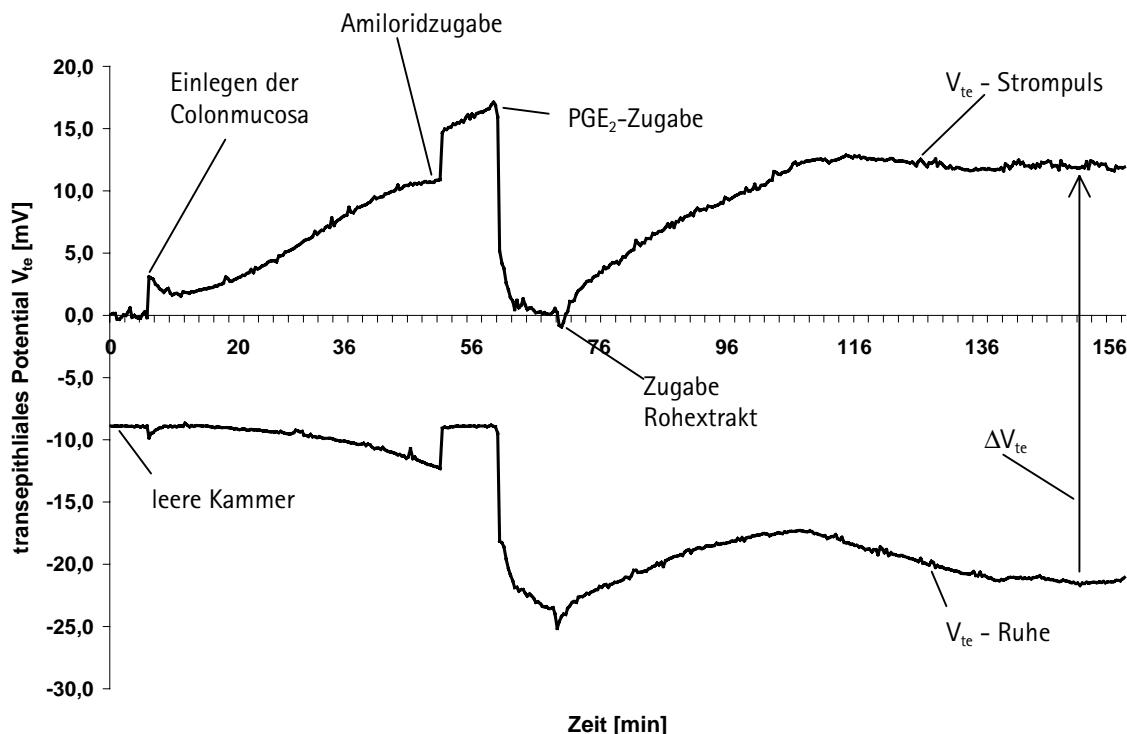


Abb. 2.2: Darstellung des Verlaufs von V_{te} bzw. ΔV_{te} während eines Standardexperiments

Rohextrakt: 500 µg/ml, serosal; PGE_2 -Konzentration: 1 µM, serosal

Die Änderung des transepithelialen Potentials bzw. die von I_{sc} wird beobachtet. Es wird entweder die maximale Reversion des Kurzschlußstroms I_{sc} oder das Ausmaß der Reversion nach 30 min bestimmt.

Auswertung

V_{te} , ΔV_{te}^0 und ΔV_{te} wurden als Gesamt-Datensätze in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel) eingelesen. Alle anderen Werte wurden entsprechend daraus berechnet. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels dem Vorzeichen-Rang-Test von WILCOXON überprüft. Alle Ergebnisse mit $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

2.2.2 Isoliertes Meerschweinchen-Ileum

Versuchstiere

Es wurden Albino-Meerschweinchen (Gewicht: 250 – 350g) mit der Bezeichnung IBM:GOHI-SPF (Fa. RCC, Füllinsdorf) beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere hatten bis 24 h vor ihrer Verwendung freien Zugang zu Futter und Wasser.

Lösungen

Die verwendeten Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

TYRODE-Lösung

Lösung A = Stammlösung

<u>Substanz</u>		<u>Endkonz.</u>
NaCl	(MERCK)	2737.9 mM
KCl	(MERCK)	53.6 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	(MERCK)	18.0 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	(MERCK)	10.5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(MERCK)	279.2 µM

Lösung B = Gebrauchslösung

Diese wurde vor jedem Versuchsdurchgang frisch angesetzt. Zu 250 ml der Lösung A wurden noch hinzugefügt:

<u>Substanz</u>		<u>Endkonz.</u>
NaHCO ₃	(MERCK)	11.9 mM
D(+)Glc x 1 H ₂ O	(MERCK)	2.5 mM

Anschließend wurde mit bidestilliertem Wasser auf 5 Liter aufgefüllt. Für die gesamte Dauer des Versuchs wurde das isolierte Ileumsegment von Lösung B umspült. Diese wurde konstant bei einer Temperatur von 37°C gehalten und mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) begast.

Histamin-Lösung

82.84 mg Histamindihydrochlorid (MERCK) wurden in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Dies entsprach 1mg/ml Histaminbase. Diese Stammlösung wurde vor jedem Versuch so verdünnt, daß eine Histaminlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml vorlag. Je Testung wurden 500 µl dieser Lösung in das Organbad des Versuchsaufbaus injiziert. Dies entsprach einer Endkonzentration von etwa 1 µM.

Proben-Lösungen

Der zu testende Rohextrakt, die Fraktionen und die Reinsubstanz wurden in EtOH_{p.A.} gelöst. Die maximale Gesamtkonzentration an EtOH_{p.A.} betrug 16 ml/l. Entsprechende Kon-

trollversuche mit dem reinem Lösungsmittel zeigten, daß in dieser Konzentration keinerlei Einfluß auf die Meßparameter nachzuweisen war.

Präparation

Die Meerschweinchen wurden nach 24-stündigem Fasten durch CO₂-Exposition getötet und anschließend entblutet. Danach wurde die Bauchhöhle durch einen Medianschnitt geöffnet und ein Teil des distalen Ileums (ca. 20 cm) herauspräpariert. Dieses Segment wurde in kleine Stücke geteilt (ca. 2 – 4 cm), die mit 37°C warmer TYRODE-Lösung durchspült wurden, um eventuell noch vorhandene Reste des Darminhalts zu entfernen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ileumstücke in 5 – 10° C kalter TYRODE-Lösung aufbewahrt. Für die Versuchsdurchführung wurde eines dieser Ileumsegmente entnommen und mittels Drahtklemmen mit dem einen Ende am Boden des Organbads fixiert, am gegenüberliegenden Ende des Segments erfolgte über einen Faden die Anhängung an den Hebel der Meßeinrichtung.

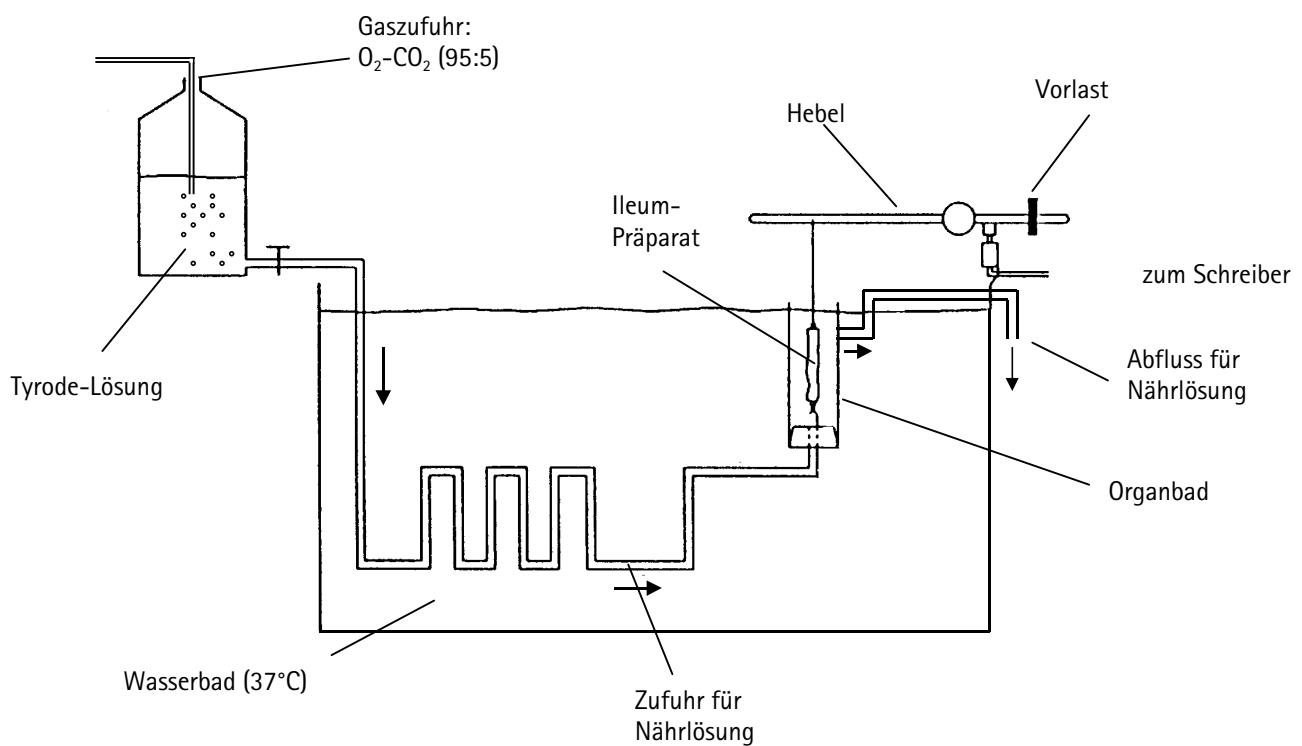


Abb. 2.3: Versuchsaufbau für die Untersuchungen am Isolierten Meerschweinchen-Ileum

Versuchsaufbau

Das isolierte Meerschweinchen-Ileum nach MAGNUS (1904) stellt eine Standardmethode zur Untersuchung der glattmuskulären Peristaltik dar (SAMUELSSON, 1991). Die Auslösung von Kontraktionen am isolierten Darmsegment kann durch verschiedene Agenzien erfolgen (KCl, Histamin, Acetylcholin, Elektr. Feldstimulation, etc.). Mit Hilfe dieses Testsystems wurde die Wirkung des ethanolischen Rohextrakts von *C. tetrameria* auf die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen untersucht. Im Anschluß daran wurden relevante Unterfraktionen und eine Reinsubstanz auf ihre kontraktionsinhibierende Wirkung untersucht. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 2.3 dargestellt. Im Organbad (Höhe: 12.6 cm/Füllhöhe: 9.5 cm; Durchmesser: 2.0 cm; Küvetteninhalt: 30 ml) befand sich eine herausnehmbare Vorrichtung, mit deren Hilfe das Organsegment aufgehängt wurde. Der Austausch der Nährlösung konnte über einen Zufluss, der mit dem Vorratsbehälter verbunden war, am Boden des Organbads und einen Abfluss an dessen oberem Rand erfolgen. Das Organbad selbst war in einem Wasserbad verankert, das über einen Thermostaten konstant bei 37°C gehalten wurde. Die Begasung der TYRODE-Lösung erfolgte im Vorratsbehälter selbst. Die Stärke der Kontraktionen am Ileumsegment wurde mittels einer isotonischen Messeinrichtung (Wegmesser für isotonische Kontraktionen und HF-Modem, H. SACHS Elektronik KG) bestimmt. Bei der isotonischen Meßanordnung wird bei gleichbleibender, am Muskel angreifender Kraft eine auftretende Längenänderung des Muskels registriert. Die Vorlast der Apparatur betrug 2 g. So wurde eine leichte Vordehnung des Muskels erreicht, was die Voraussetzung für eine Kontraktion ist. Die Aufzeichnung der Längenänderung des Muskels erfolgte mittels eines Schreibers (PERKIN ELMER Recorder).

Versuchsablauf

Nach dem Einhängen des Ileumsegments folgte eine halbstündige Äquilibrierungsphase. Während dieser Zeit wurde in regelmäßigen Abständen die Nährlösung im Organbad ausgetauscht. Nach der Anpassungszeit wurde das Darmstück durch mehrmalige Zugabe einer vergleichsweise hohen Histamindosis von 10 µg (ca. 2 µM) histaminempfindlich ge-

macht. Jeweils 15 Sekunden nach erfolgter Kontraktion wurde ausreichend mit TYRODE-Lösung gespült. War die Reproduzierbarkeit der Kontraktionsinduktion gewährleistet, wurde durch die Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve die submaximale Histamindosis ermittelt (Konzentrationsbereich: 0.27 ng/ml – 333 ng/ml). Diese Kalibrierung wurde mehrfach bei verschiedenen Tieren ermittelt. Die Messung der Kontraktionen erfolgte alle 4 – 6 min. Zum Zeitpunkt 0 wurde die entsprechende Histamindosis injiziert. Nach erfolgter Kontraktion wurde mit TYRODE-Lösung gespült. Der Spülvorgang wurde nach 1 – 2 min wiederholt.

Zur Ermittlung der kontraktionsinhibierenden Wirkung des Rohextrakts, verschiedener Unterfraktionen und einer Reinsubstanz wurde zunächst eine Kontraktion am isolierten Ileumsegment durch die Zugabe einer submaximalen Dosis Histamin (5 µg), wie sie durch die Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt wurde, induziert. Nach erfolgtem Spülen wurde die jeweilige Probe in entsprechender Dosierung in das Organbad injiziert. Nach weiteren 5 Minuten wurde erneut Histamin in derselben Dosierung zum Organbad gegeben. Im Anschluß daran erfolgte ein mehrfaches Spülen des Ileumstücks und eine erneute Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Kontraktion durch Histaminzugebung bevor eine neue Probe appliziert wurde.

Auswertung

Zur Auswertung der Versuche wurde die durch die submaximale Dosis Histamin (5 µg) ausgelöste Kontraktion, wie diese vor der jeweiligen Probenzugabe gemessen werden konnte, gleich 100% gesetzt. Die nach der Probenzugabe durch Histamin ausgelösten Kontraktionen und auch die bisweilen auftretenden Spontankontraktionen oder eine Relaxation des Darmstücks bei Probenzugabe wurden zum 100%-Wert in Relation gesetzt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mittels dem Vorzeichen-Rang-Test von WILCOXON überprüft. Alle Ergebnisse mit $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

2.2.3 Antimikrobielle Tests

Die Versuche zur Bestimmung der Wirksamkeit von *Casimiroa tetrameria* MILLSP. gegen *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* wurden am Lehrstuhl für Pharmakognosie und Phytochemie der ETH Zürich unter der Leitung von Prof. STICHER und am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Zusammenarbeit mit Prof. KIST durchgeführt.

Die Testungen auf Aktivität gegen *Helicobacter pylori* wurden von Dr. LUTZ WOLFRAM am Institut für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie an der Universitätsklinik Zürich unter der Leitung von Dr. BAUERFEIND durchgeführt.

2.2.3.1 Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*

Die Vorversuche mit dem Rohextrakt von *Casimiroa tetrameria* wurden von Dr. ANITA ANKLI an der ETH Zürich bzw. Dr. PETER BORK (ehem. Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Freiburg) durchgeführt (ANKLI et al., 2000b).

Für die weiteren Untersuchungen wurden folgende Stämme verwendet

Staphylococcus aureus ATCC 23923

Candida albicans ATCC 90028

Die Aktivität gegen die Organismen wurde mittels des Agardiffusionstests nach der Vorschrift von BURKHARDT durchgeführt (BURKHARDT, 1992). Zu diesem Zweck wurde vor der Versuchsdurchführung eine Kolonie des zu testenden Stammes in 2.5 ml einer Trypsin-Bouillon aufgelöst. Ein Tropfen dieser Lösung wurde in 3 ml einer 0.9%-igen NaCl-Lösung überführt. Mit dieser Verdünnung wurden jeweils 3 Agarplatten (Bacto® Balanced Sensitivity Test Medium, dehydrated; DIFCO Laboratories) zunächst für 15 min geflutet. Anschließend wurde die Suspension abgesaugt. Die Platten wurden für 20 min im Brutraum zur Trocknung aufbewahrt. Danach waren die Platten gebrauchsfertig. Zur Testung des Rohextrakts, der Grobfraktionen und einer polymethoxyflavonhaltigen Unterfraktion wurden Papierscheiben (6 mm discs, OXOID) mit den jeweiligen, in EtOH_{p.A.} gelösten

Proben imprägniert. Getestet wurden 200, 400 und 600 µg. Als Kontrolle wurde das reine Lösungsmittel verwendet.

Folgende Antibiotika dienten als Positivkontrollen:

Staphylococcus aureus: Bactrim® (Sulfamethoxazol, 23.75 µg + Trimethoprim, 1.25 µg, BECTON-DICKINSON)

Candida albicans: 5-Fluorcytosin (1 µg), SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR).

Die beschickten Agarplatten wurden für mindestens 12 h über Nacht bei 37°C bebrütet. Im Anschluß daran wurden die Hemmhöfe in mm ausgemessen.

Trypsin-Bouillon

Zur Herstellung der Trypsin-Bouillon-Stammlösung wurden 15 g NaCl (MERCK), 30 g Pepton aus Fleisch (MERCK), 30 g Fleischextrakt (MERCK) und 7.5 g Na₂S₂O₃ in 3 l siedendem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf pH 7.4 eingestellt und autoklaviert. Danach wurden 0.6 g Trypsin zugegeben, gut geschüttelt und die Lösung über Nacht bei Raumtemeratur stehengelassen. Anschließend wurde der Ansatz mit etwas Chloroform (MERCK) versetzt und für 24 h bei 37°C im Brutraum inkubiert. Zur Verwendung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:3 mit NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ gepufferter isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, zu jeweils 2.5 ml aliquotiert und autoklaviert.

2.2.3.2 Aktivität gegen *Helicobacter pylori*

Für die Tests wurde der Stamm ATCC 43504 verwendet.

Die Versuche zur Inhibition des Wachstums von *Helicobacter pylori* wurden auf Wilkins Chalgren Agarplatten (BECTON DICKINSON) durchgeführt. Diese wurden mit 5% defibriniertem Schafblut und folgenden Antibiotika supplementiert:

Amphotericin B, 2 µg/ml

Vancomycin, 6 µg/ml

Cefsulodin, 5 µg/ml

Trimethoprim, 5 µg/ml

100 µl einer konzentrierten *H. pylori* - Suspension (die Ernte einer frischbewachsenen Agarplatte, resuspendiert in 1 ml PBS) wurden auf den Agar ausplattiert. Papierscheiben (6 mm discs, OXOID) wurden mit 600 µg des ethanolischen Rohextrakts, der Grobfraktionen bzw. der polymethoxyflavonhaltigen Unterfraktion imprägniert und auf die vorbereiteten Agarplatten plaziert. Anschließend wurden diese für 3 – 5 Tage in einer wassergesättigten, mikroaerophilen Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Als Maß für die Hemmung wurde der Abstand zwischen Antibiotikaplättchen und Hemmhofende gemessen.

Die Bestimmung der MIC erfolgte in einem Minimalmedium nach NEDENSKOV (1994). Verschiedene Konzentrationen (im Bereich von 0.3 bis 200 µg/ml) des Rohextrakts wurden zum nicht-beimpften Medium (5 ml in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben) gegeben. Das so ergänzte Medium wurde 1%-ig mit einer frischen *H. pylori*-Kultur beimpft. Bebrütet wurde für 2 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen in einer wassergesättigten Atmosphäre in einem Rotationsschüttler (G25; New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) mit 175 rpm. Im Anschluß daran wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm (DU-64 Sepktralphotometer, BECKMAN, UK) bestimmt. Die MIC wurde definiert als die Extraktkonzentration, die kein sichtbares Wachstum mehr zuließ (weniger als 0.03 im Vergleich zu 1.2 bei der Kontrolle). Als Nullwert diente das reine Medium.

Untersuchung des Rohextrakts auf Säurestabilität

Für die Untersuchung der Säurestabilität des gelösten Rohextrakts wurde dieser zunächst mit HCl_{konz.} (1:100) versetzt und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um eine Durchmischung der Phasen zu erreichen. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Parallel dazu wurde ein Aliquot des Rohextrakts ohne Säurezusatz inkubiert. Im Anschluß daran wurden beide Ansätze hinsichtlich ihrer wachstumshemmenden Aktivität gegen *H.pylori* im Vergleich zum unbehandelten Rohextrakt getestet. Die eingesetzte Konzentration entsprach dem ermittelten MIC-Wert.

2.2.4 Untersuchungen auf Cytotoxizität

Cytotoxizität in KB-Zellkulturen

Die Untersuchungen des Rohextrakts wurden von MICHAEL WASESCHA und Dr. ANITA ANKLI am Pharmazeutischen Institut der ETH Zürich unter der Leitung von Prof. STICHER durchgeführt.

Die Cytotoxizität des Rohextrakts wurde an der KB-Zell-Linie ATCC CCL 17, einem menschlichen Nasopharynx-Karzinom getestet. Die Versuche wurden nach einer modifizierten Screening-Technik von SWANSON und PEZZUTO (1990) durchgeführt. Es wurden ELISA-Platten (Falcon) verwendet, die Konzentration der Zellen betrug 2.5×10^4 Zellen/ml. Das Gesamtvolumen je Vertiefung belief sich auf 150 µl. Der Rohextrakt wurde in EtOH gelöst und mit Wasser 5-fach verdünnt. Getestet wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml und max. 1 % EtOH. Die Quantifizierung wurde durchgeführt, indem 15 µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS; MOSMANN, 1983) hinzugefügt wurden. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C produzierten die stoffwechselaktiven Zellen einen unlöslichen Formazan-Farbstoff. Das Kulturmedium wurde entfernt und der Farbstoff wurde in 150 µl 10 % SDS gelöst. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Optische Dichte bei 540 nm mit einem ELISA-reader bestimmt (MRX, DYNEX Technologies).

Cytotoxizität in HeLa-Zellkulturen

Die Untersuchungen auf Cytotoxozität in HeLa-Zellkulturen wurden von CHRISTINA SCHLAGE am Institut für Pharmazeutische Biologie, Freiburg durchgeführt

Für die Untersuchungen wurden 24 h alte HeLa-Zellen (ATCC CCL2) verwendet. Die Zellen wurden zuvor in 25 ml-Gewebekulturschalen (GREINER Labortechnik) bei 37°C und 5% CO₂ in DUBELCO's modified Eagle Medium (GIBCO-BRL) adherent in Kultur gehalten. Das Medium enthielt 1 % Penicillin/Streptomycin (SIGMA) und 10 % Fötales Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL). Um eine Zelldichte von ca. 10^5 Zellen/ml zu erhalten, wurde - je nach Wachstumsdichte - eine entsprechende Anzahl an Gewebekulturschalen abtrypsinert und

in DUBELCO's modified Eagle Medium überführt. Von dieser Suspension wurden jeweils 5 ml in 10 cm-Gewebekulturschalen pipettiert. Für die Evaluierung des Rohextrakts, der EtOAc-Fraktion und der polymethoxyflavonhaltigen Unterfraktion B'-2 wurden die Proben in DMSO (Endkonzentration DMSO: 1%) gelöst. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Rohextrakt bzw. den zu testenden Fraktionen inkubiert. Während den ersten 8h erfolgte die Beobachtung des Zustands der Zellen in regelmäßigen Abständen. Deren Vitalität wurde für den Zeitraum der Beobachtung bzw. nach der Inkubationszeit mit derjenigen der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Beurteilung erfolgte mittels einem Stereomikroskop. Sichtbare Veränderungen der Zellform, Apoptose, Zellwandlyse und Ablösung der Zellen von der Petrischale wurden - als Vorstufen des Zelltodes - als Indiz für Cytotoxizität gewertet (THOMPSON, 1995).

2.3 Phytochemische Methoden

2.3.1 Chromatographie

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen (DC)

Stationäre Phasen

NP: DC-Alufolie Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm, MERCK)

RP: DC-Alufolie RP₁₈ F_{254s} (Schichtdicke 0.25 mm, MERCK); vor der Verwendung erfolgte eine Aktivierung der Platten für 1 h bei 100°C.

Laufmittelsysteme

LM_{DC}1: CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (70:30:3)

LM_{DC}2: Toluol-EtOAc (7:3)

LM_{DC}3: EtOAc-HOAc-Ameisensäure-H₂O (100:11:11:27)

LM_{DC}4: MeOH-H₂O (7:3)

Die Chromatogramme wurden unter Kammersättigung entwickelt

Detektion

Die Chromatogramme wurden zunächst im sichtbaren und im UV-Licht ausgewertet. Festgehalten wurden zum einen die fluoreszenzlöschen (bei 254 nm) Zonen, zum anderen konnten bei 366 nm die fluoreszierenden Verbindungen detektiert werden.

Sprühreagenzien

Anisaldehyd-Reagenz: 85 ml MeOH

10 ml HOAc

5 ml H₂SO₄ konz.

0.5 ml 4-Anisaldehyd (ROTH)

Nach dem Besprühen wurden die Platten für 5 - 10 min bei 100°C erwärmt.

Naturstoffreagenz: 1 g Naturstoffreagenz A (ROTH)
100 ml EtOH

Die Fixierung der Anfärbung erfolgte mit Macrogol (Polyethylenglykol, Typ 400, ROTH), 5 % in MeOH.

Säulenchromatographie (SC)

Alle verwendeten Lösungsmittel hatten die Qualität pro analysi.

Sorbentien

Sephadex® LH-20 (PHARMACIA)

Polyamid (Polyamid-6, 50-160 µm, ICN)

MCI®-Gel (CHP 20P, 75 – 150 µm, MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES)

- Sephadex® LH-20 wurde über Nacht vorgequollen und anschließend als Säulenpackung verwendet.
- Polyamid wurde zunächst mehrfach mit MeOH und H₂O im Wechsel gewaschen und anschließend in MeOH vorgequollen, bevor die Säulen damit gepackt wurden.
- Das MCI®-Gel wurde ebenfalls mehrfach mit MeOH gewaschen und anschließend im Startlaufmittel vorgequollen.

Laufmittelsysteme

LM_{SC}1: MeOH, 100%

LM_{SC}2: Toluol-Methylethylketon-MeOH (70:20:10); Stufengradient: Erniedrigung des Toluol-Anteils (5%-Schritte) und gleichzeitig Erhöhung des Methylethylketon- und des MeOH-Anteils (5%-Schritte).

Es ergibt sich folgender Verlauf des Gradienten: (65:25:10) → (60:25:15) → (55:30:15) → (50:30:20) etc., bis zu einem Mischungsverhältnis Methylethylketon – MeOH (55:45).

Gespült wurde mit MeOH, 100% (daher zunächst stufenweise Erniedrigung des Methylethylketon-Anteils in 20%-Schritten).

LM_{SC}3: MeOH-H₂O (3:7); Stufengradient (10%-Schritte) bis hin zu MeOH, 100%.

LM_{SC}4: MeOH-H₂O (1:4); Stufengradient (10%-Schritte) bis hin zu MeOH, 100%.

Zunächst erfolgte jeweils eine Äquilibrierungsphase (2 – 3 Säulenvolumina) mit der ersten Stufe der Laufmittelgradienten bzw. MeOH, 100% (Sephadex® LH-20). Nach der Probenaufgabe wurde das Eluat mittels eines Fraktionensammlers aufgefangen, dünnenschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt.

Vakuumflüssigkeitschromatographie (VLC)

Säule: Varian Mega Bond Elut RP-18 (VARIAN);

Größe 2: 10g Säulenmaterial, Säulenvolumen: 60 ml

Laufmittelsysteme

LM_{VLC}1: MeOH-H₂O (2:3); Stufengradient (10%-Schritte) bis hin zu MeOH, 100%.

LM_{VLC}2: H₂O; Stufengradient (10%-Schritte) bis hin zu MeOH, 100%.

Alle Laufmittel wurden vor ihrer Verwendung im Ultraschallbad entgast. Vor der Probenaufgabe erfolgte eine Äquilibrierungsphase mit mehreren Säulenvolumina der ersten Stufe des Laufmittelgradienten. Die Trennung wurde bei ca. 700 – 900 mbar durchgeführt. Die einzelnen Stufen des Laufmittelgradienten wurden quantitativ und getrennt voneinander aufgefangen und mittels Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur: 40°C) eingeengt, gefriergetrocknet und anschließend dünnenschichtchromatographisch kontrolliert.

Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LPLC)

Säule: Lobar® Fertigsäule, Größe B (310–25),

Stationäre Phase: LiChroprep® RP-18, 40 – 63 µm (MERCK)

Pumpe: Duramat 80 (CfG-PROMINENT, Heidelberg)

Laufmittelsystem

LM_{LPLC} 1: MeOH-H₂O (1:1); Stufengradient (10%-Schritte) bis hin zu MeOH, 100%.

Sämtliche Stufen des Laufmittelgradienten wurden vor ihrer Verwendung im Ultraschallbad entgast. Nach einer anfänglichen Äquilibrierungsphase erfolgte die Probenaufgabe. Ein Durchflußvolumen von 4 – 5 ml/min führte zu einem Druck von 2 - 3 bar. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionensammlers aufgefangen, mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert, entsprechend vereinigt und gefriergetrocknet

Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (MPLC)

Säule: Labomatic (Füllbett: 26 mm Ø x 360 mm; Säulenvolumen: 205 ml)

Stationäre Phase: Lichroprep[®] RP-18, 15-25 µm (MERCK)

Pumpe: modifizierte HPLC-Pumpe (WATERS; Modell 510; größere Pumpenköpfe, maximales Durchflußvolumen: 22.5 ml/min)

Pulsationsdämpfer: KRONLAB, 0 – 20 bar

Druckwächter: LABOMATIC, 0 – 25 bar

Probenaufgabeventil: Lobar[®]-System (MERCK), 2 ml Probenschleife

UV-Detektor: KRONWALD-SEPACHROM UV-24, Festeinstellung: 254 nm

Schreiber: BBC SE 120

Laufmittelsysteme

LM_{MPLC} 1: MeCN-H₂O-MeOH (42.6:52.1:5.3)

LM_{MPLC} 2: MeCN-H₂O-MeOH (44.6:48.7:6.7)

Gespült wurde die Säule jeweils mit MeOH, 100%.

Die Laufmittelmischungen wurden vor ihrer Verwendung im Ultraschallbad entgast. Während des Laufes betrug das Durchflußvolumen jeweils 4.5 ml/min. Hieraus ergab sich ein Druck von 4 - 5 bar. Die Trennungen wurden mit Hilfe des UV-Detektors kontrolliert. Die Fraktionen wurden entsprechend dem UV-Profil vereinigt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Trennungen wurden Geräte der Firma WATERS Associates verwendet.

Pumpen: Modell 6000A bzw. Modell 501

Injektor: WISP-Autosampler 710A

Einspritzblock U6K-Injector

Rheodyne 7725i Manual Injector

UV-Detektor: 486 Tunable Absorbance Detektor

996 Photodiodearray Detector

Integrator: System Interface Module SIM

Software: Maxima 820

Millenium Version 2.15 (Millenium Chromatography Manager mit WATERS Bus Lace/ETM Card)

Vorsäulen: Guard Pak Holder mit: μ -BondapakTM C-18 Inserts (WATERS, MILLIPORE)

RCSS Silica Inserts (WATERS Associates)

Säulen: analytische HPLC: Eurospher C-18, 5 μ m, 250 x 4 mm (KNAUER)

präparative HPLC: Eurospher C-18, 7 μ m, 250 x 8 mm (KNAUER)

Eurospher 100 (Si), 7 μ m, 250 x 8 mm (KNAUER)

Fluß: analytische HPLC: 1 ml/min

präparative HPLC: 1.4 – 2.0 ml/min (je nach Fraktion, vgl. Kap. 2.5.5)

Laufmittelsysteme

LM_{HPLC}1:A: MeOH-H₂O (1:1); B: MeOH, 100%

Isokratisch: 30 min A, 15 min A → B linear, 15 min B, spülen

LM_{HPLC}2:A: MeCN-H₂O-MeOH (51.7:38.8:9.5); B: MeOH, 100%

Isokratisch: 30 min A, 15 min A → B linear, 15 min B, spülen

LM_{HPLC}3:A: MeCN-H₂O-MeOH (41.7:52.0:6.3); B: MeOH, 100%

Isokratisch: 30 min A, 15 min A → B linear, 15 min B, spülen

LM_{HPLC}4:A: Toluol-EtOAc (55:45); B:Toluol-EtOAc (3:7)

Isokratisch: 30 min A

Spülen mit B nach jew. 5 – 6 Läufen

Gaschromatographie (GC)

Bei Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) erfolgte die Strukturbelegung zusätzlich noch mittels GC-Additionsanalyse.

Die Gaschromatographie wurde an einem VARIAN 3700 durchgeführt.

Säule:	WCOT Rtx®200 (Resteck); 30 x 0.32 mm; Belegung 0.25 µm Trifluoropolysiloxan
Vorsäule:	5 m x 0.32 mm
Trägergas:	Helium; u = 24 cm/sec (bei 220°C); Fluß = 1.16 ml/min
Split-Verhältnis:	1:85 (bei 220°C)
Make up-Gas:	Stickstoff, 30 ml/min
Detektor:	FID; Wasserstoff, 30 ml/min; Preßluft, 300 ml/min
Integrator:	Hewlett Packard HP 394
Temperaturprogramm:	270°C, 5 min; 1°/min auf 290°C
Probe:	0.1 %ige Lösungen in TMS-Reagenz; 0.5 µl

2.3.2 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte an Geräten der Firma BRUKER.

BRUKER AM-400: ^1H -NMR (400 MHz), ^{13}C -NMR (100 MHz)

BRUKER Avance: ^1H -NMR (500 MHz), ^{13}C -NMR (125 MHz)

Die chemischen Verschiebungen wurden als δ-Werte angegeben.

Die Kalibrierung erfolgte auf CHCl_3 bzw. CD_2HOD .

Vorbereitung der Proben:

Polymethoxylierte Flavone: Die gefriergetrockneten Proben wurden in CDCl_3 (400 – 600 µl) gelöst und im Anschluss daran über eine Fritte D3 mittels Stickstoff direkt in ein Probenröhrchen überführt.

Flavonoidglykoside: An den gefriergetrockneten Proben wurde zunächst ein zweifacher D₂O-Austausch durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die jeweilige Probe zweimal hintereinander in 1 ml D₂O gelöst und erneut lyophilisiert. Im Anschluß an den Austausch wurde die Probe in CD₃OD (400 – 600 µl) aufgenommen, gelöst und über eine Fritte in ein Probenröhrchen filtriert.

Massenspektrometrie (MS)

a) EI-MS

FINNIGAN MAT 8200, direktes Einlaßsystem, Ionenquelle: 200 - 230°C; 70 eV, 3 kV

b) Hochauflösendes MS

FINNIGAN MAT 312, direktes Einlaßsystem, Ionenquelle: 200°C; 70 eV, 3kV

(5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon)

UV-Spektroskopie

a) Photodiodenarray Detector, an HPLC angebunden (PDA 996, WATERS)

b) UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer (KONTRON Instruments)

Vermessen wurden 1%ige Lösungen

2.3.3 Extraktion

Die getrocknete und pulverisierte Blattdroge wurde in der 10-fachen Menge EtOH 96 % aufgenommen und für eine halbe Stunde unter Rückfluß gekocht. Der Extrakt wurde noch heiß filtriert. Der verbleibende Pflanzenrückstand wurde im Anschluß noch zweimal für jeweils eine halbe Stunde mit EtOH 70 % extrahiert. Die drei Filtrate wurden

mit dem Rotationsverdampfer (Wasserbad: 40°C) eingeengt, in wenig Wasser aufgenommen, vereinigt und gefriergetrocknet.

Der gefriergetrocknete Rohextrakt wurde in der 10 bis 15 - fachen Menge Wasser suspendiert. Die erhaltene Suspension wurde zunächst mit dem gleichen Volumen Petrolether im Scheidetrichter so oft ausgeschüttelt, bis die Petroletherphase keine Färbung mehr zeigte. Im Anschluß daran wurde die wässrige Phase mehrfach mit EtOAc ausgeschüttelt. Die drei Fraktionen wurden getrennt einrotiert. Die eingeengten Phasen wurden in wenig Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

2.3.4 Teezubereitung

Der Tee aus den getrockneten Blättern von *Casimiroa tetrameria* MILLSP. wurde in Anlehnung an die Art der Zubereitung, wie diese von den Maya-Indianern auf der Halbinsel Yucatán durchgeführt wird, hergestellt. Zu diesem Zweck wurden zwischen 10 und 15 Teilblätter fein zerkleinert und in 500 ml destilliertem Wasser langsam auf ca. 80 - 90°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde das Dekokt für etwa 30 min. gehalten. Im Anschluß wurde das eingeengte Filtrat gefriergetrocknet.

2.3.5 Isolierung der Verbindungen

Die Vorgehensweise bei der Isolierung der Verbindungen orientierte sich an der parallel getesteten antisekretorischen Aktivität der erhaltenen Fraktionen.

2.3.5.1 Auftrennung der EtOAc-Phase an Sephadex® LH-20

Für die Auftrennung der EtOAc-Phase an Sephadex® LH-20 wurde die 10 bis 15-fache Menge an Säulenmaterial verwendet. Dieses wurde im Laufmittel MeOH über Nacht vorgequollen und im Anschluß daran in die Säule gefüllt. Nach einer Äquilibrierung mit dem zweifachen Säulenvolumen wurde die Probe in möglichst wenig Laufmittel gelöst und als

gleichmäßige Bande auf das Säulenbett aufgetragen. Das Durchflußvolumen während des Laufes betrug 1ml/min. Das Eluat wurde dünnenschichtchromatographisch kontrolliert und zu entsprechenden Fraktionen vereinigt. Die erhaltenen Fraktionen sind in Tabelle 2.1 festgehalten. Aufgetrennt wurden in diesem Schritt 9 g der EtOAc-Fraktion.

Sephadex® LH-20-Fraktion	A	B	C	D	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	2850	<u>4871</u>	564	163	
Anteil [%]	32	<u>54</u>	6	2	6

Tab. 2.1: Unterfraktionen der EtOAc-Phase, aus Sephadex® LH-20 Trennung resultierend

____ = Fraktion, die polymethoxylierte Flavone enthält

..... = Fraktion, die Flavonoidglykoside enthält

2.3.5.2 Isolierung der Polymethoxyflavone

Um die polymethoxylierten Flavone - die Hauptinhaltsstoffe der antisekretorisch aktiven Fraktion B - zu isolieren, erfolgte zunächst eine Auftrennung derselben mittels LPLC-RP₁₈ (LM_{LPLC}1). Insgesamt wurden 1.7 g der Fraktion eluiert. Die Trennung erfolgte in zwei Durchgängen. Das Durchflußvolumen der Säule betrug 4.5 ml/min. Das Volumen der einzelnen Fraktionen umfasste ca. 4 ml. Diese wurden entsprechend den dünnenschichtchromatographischen Beobachtungen zu den in Tabelle 2.2 aufgeführten Fraktionen vereinigt.

RP ₁₈ -LPLC-Fraktion	B1	B2	B3	B4	<u>B5</u>	<u>B6</u>	B7	B8	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	306	64	111	114	<u>315</u>	<u>380</u>	79	63	
Anteil [%]	18	4	6.5	7	<u>19</u>	<u>22</u>	5	4	14.5

Tab. 2.2: Unterfraktionen der antisekretorisch aktiven Fraktion B

____ = Fraktionen, die polymethoxylierte Flavone enthalten

Die Fraktionen B5 und B6 wurden separat und quantitativ mittels MPLC-RP₁₈ (B5: LM_{MPLC}1; B6: LM_{MPLC}2) aufgetrennt. Das Volumen der einzelnen Fraktionen betrug ca. 5ml.

Die Vereinigung erfolgte entsprechend dem aufgezeichneten UV-Profil ($\lambda = 254$ nm). Das Ergebnis der beiden Trennungen ist in den Tabellen 2.3 bzw. 2.4 dokumentiert.

RP ₁₈ -MPLC-Fraktion	B5-1	B5-2	B5-3	B5-4	B5-5	B5-6	B5-7	B5-8	B5-9	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	25	11	3	20	3	21	5	3	<u>178</u>	
Anteil [%]	8	3	1	6	1	7	2	1	<u>57</u>	14

Tab. 2.3: Auf trennung von B5 über MPLC-RP₁₈

— = Fraktion, die 4 der polymethoxylierten Flavone enthält

RP ₁₈ -MPLC-Fraktion	B6-1	B6-2	B6-3*	B6-4	B6-5*	B6-6	B6-7	B6-8	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	29	4	14	10	162	13	<u>35</u>	<u>77</u>	
Anteil [%]	8	1	4	3	43	3	<u>9</u>	<u>20</u>	9

Tab. 2.4: Auf trennung von B6 über MPLC-RP₁₈

— = Fraktionen, die weitere polymethoxylierte Flavone enthalten

* = Reinsubstanz: B6-3: 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon

B6-5: 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon

Die Unterfraktionen B5-9, B6-7 und B6-8 wurden über HPLC weiter aufgereinigt. Es galten folgende Versuchsbedingungen:

B5-9: NP (semipräparativ); LM_{HPLC}4; Durchflußvolumen → 1.4 ml/min

B6-7 / -8: RP₁₈ (semipräparativ); LM_{HPLC}2; Durchflußvolumen → 1.8 ml/min

Von Fraktion B5-9 wurden 45 mg aufgetrennt.

Isoliert wurden: 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon/5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon

→ 13 mg (29%)

5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon → 9 mg (20%)

5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon → 15 mg (33 %)

Von Fraktion B6-7 wurden 15 mg aufgetrennt.

Isoliert wurden: 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon → 8 mg (53 %)

Von Fraktion B6-8 wurden 15 mg aufgetrennt.

Isoliert wurden: 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon → 9 mg (60 %)

2.3.5.3 Isolierung der Flavonoidglykoside

Die Isolierung der vier Flavonoidglykoside erfolgte aus der biologisch inaktiven Fraktion C. 540 mg dieser Fraktion wurden mittels LPLC-RP₁₈ (LM_{LPLC}1) aufgetrennt. Das Durchflußvolumen der Säule wurde auf 4.5 ml/min eingestellt. Das Fraktionsvolumen betrug ca. 4 ml. Die gesammelten Fraktionen wurden entsprechend den dünnenschichtchromatographischen Beobachtungen zu übergeordneten Fraktionen vereinigt. Diese sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

RP ₁₈ -LPLC-Fraktion	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	61	60	<u>107</u>	<u>98</u>	15	38	47	41	
Anteil [%]	11	11	<u>20</u>	<u>18</u>	3	7	9	8	13

Tab. 2.5: Unterfraktionen von Fraktion C

— = Fraktionen, die Flavonoidglykoside enthalten

Die weitere Aufreinigung erfolgte durch die separate Trennung von Fraktion C3 bzw. C4 über Sephadex® LH-20 (LM_{SC}1). Das Durchflußvolumen betrug 1 ml/min. Die gesammelten Fraktionen hatten ein Volumen von ca. 3 ml und wurden entsprechend den eluierten Verbindungen vereinigt. Das Ergebnis der beiden Trennungen ist in den Tabellen 2.6 und 2.7 festgehalten.

Sephadex® LH-20-Fraktion	C3-1	C3-2	C3-3	C3-4	C3-5	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	2	11	<u>61</u>	<u>34</u>	5	
Anteil [%]	2	9	<u>52</u>	<u>29</u>	4	4

Tab. 2.6: Unterfraktionen von C3: — = Fraktionen, die Quercetinglykoside enthalten

Sephadex® LH-20- Fraktion	C4-1	C4-2	C4-3	C4-4	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	9	39	31	12	
Anteil [%]	9	40	32	12	7

Tab. 2.7: Unterfraktionen von C4: ___ = Fraktionen, die Kaempferolglykoside enthalten

Die Fraktionen C3-3, C3-4, C4-2 und C4-3/4-4 wurden über Polyamid (LM_{SC}2) getrennt weiter aufgereinigt. Es wurde jeweils 5 g Säulenmaterial verwendet. Nach der Äquilibrierungsphase wurden die Fraktionen jeweils quantitativ auf die Säule aufgetragen. Das Durchflußvolumen wurde auf 1 ml/min eingestellt. Das Volumen der einzelnen Fraktionen betrug ca. 3 ml. Je Laufmittelstufe wurde mit ca. 25 ml eluiert.

Polyamidfraktion	C3-3.1	C3-3.2	C3-3.3	C3-3.4	C3-3.5	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	5	9	12	21	8	
Anteil [%]	8	15	20	34	13	10

Tab. 2.8: Polyamidfraktionen von C3-3: ___ = Quercetin-3-O-rutinosid enthaltende Unterfraktion

Polyamidfraktion	C3-4.1	C3-4.2	C3-4.3	C3-4.4	C3-4.5	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	2	5	6	10	8	
Anteil [%]	6	15	18	29	24	8

Tab. 2.9: Polyamidfraktionen von C3-4: ___ = Quercetin-3-O-glucosid enthaltende Unterfraktionen

Polyamidfraktion	C4-2.1	C4-2.2	C4-2.3*	C4-2.4	C4-2.5	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	5	7	12	6	3	
Anteil [%]	13	18	31	15	8	15

Tab. 2.10: Polyamidfraktionen von C4-2: * = Kaempferol-3-O-rutinosid

Polyamidfraktion	C4-3/4.1	C4-3/4.2	C4-3/4.3*	C4-3/4.4	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	7	9	15	5	
Anteil [%]	16	21	35	12	16

Tab. 2.11: Polyamidfraktionen von C4-3/4: * = Kaempferol-3-O-glucosid

Die Unterfraktionen C3-3.4 und C3-4.4/3-4.5 wurden über HPLC bzw. SC weiter aufgereinigt. Es galten folgende Versuchsbedingungen:

C3-3.4: RP₁₈ (semipräparativ), LM_{HPLC}1; Durchflußvolumen → 1.6 ml/min

C3-4.4/4.5: MCI – Säule (2 g), LM_{SC}4; Durchflußvolumen → 1 ml/min

Fraktion C3-3.4 wurde quantitativ aufgetrennt.

Isoliert wurde: Quercetin-3-O-rutinosid → 11 mg (52 %)

Fraktion C3-4.4 und C3-4.5 wurden gemeinsam quantitativ aufgetrennt.

Isoliert wurde: Quercetin-3-O-glucosid → 8 mg (44 %)

2.3.5.4 Isolierung des Furanocumarins

Die Isolierung des linearen Furanocumarins erfolgte mittels HPLC aus Fraktion B5-6 (vgl. Tabelle 2.3).

Es galten folgende Versuchsbedingungen:

B5-6: RP₁₈ (semipräparativ); LM_{HPLC}3; Durchflußvolumen → 1.8 ml/min

Fraktion B5-6 wurde quantitativ aufgetrennt.

Isoliert wurde: 5-Methoxy-8-(5“-hydroxy)-prenyloxypsrolen → 11.5 mg (55 %)

2.3.6 Polymethoxyflavon-Fraktionen für biologische Untersuchungen

Die polymethoxyflavonhaltigen Mischfraktionen für die biologischen Untersuchungen gingen aus der aktiven Fraktion B (vgl. Tab. 2.1) hervor. Es wurden zu diesem Zweck

1.8 g dieser Fraktion in 4 Schritten mittels VLC (LM_{VLC1}) über RP₁₈-Material aufgetrennt. Je Laufmittelstufe wurde mit ca. 90 ml eluiert. Die Eluate wurden einrotiert und dünn-schichtchromatographisch kontrolliert. Durch diesen Trennungsschritt wurden 4 Unterfraktionen erhalten.

VLC-RP ₁₈ -Fraktion (Anteil MeOH)	B'-1 (40% + 50%)	B'-2 (60% + 70%)	B'-3 (80%)	B'-4 (90% + 100%)	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	845	<u>709</u>	26	49	
Anteil [%]	47	<u>39</u>	1	3	10

Tab. 2.12: VLC-RP₁₈-Fraktionen eines Teils der Sephadex® LH-20-Fraktion B

___ = Polymethoxyflavone enthaltende Unterfraktion

Die Auftrennung von 450 mg der Fraktion B'-2, die Polymethoxyflavone in unterschiedlichen Mengenanteilen enthielt, wurde über MPLC – RP₁₈ (LM_{MPLC1}) durchgeführt. Das Durchflußvolumen wurde auf 4.5 ml/min eingestellt. Hieraus ergab sich ein Druck von 4 – 5 bar. Das Volumen der einzelnen Fraktionen betrug ca. 4 ml. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrem UV-Profil ($\lambda = 254$ nm) vereinigt. Die erhaltenen Mischfraktionen sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

RP ₁₈ -MPLC-Fraktion	B'-2.1	B'-2.2	B'-2.3	B'-2.4	B'-2.5	B'-2.6	B'-2.7	B'-2.8	Verlust [%]
Ausbeute [mg]	33	23	<u>25</u>	<u>22</u>	<u>175</u>	<u>36</u>	<u>42</u>	29	
Anteil [%]	7	5	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>39</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	6	15

Tab. 2.13.: Unterfraktionen der Fraktion B'-2 für die biologischen Untersuchungen

___ = Polymethoxyflavone enthaltende Fraktionen, die getestet wurden

Die erhaltenen Fraktionen wurden nicht mehr weiter aufgereinigt, sondern als Mischfraktionen getestet. In den Fraktionen B'-2.3 und B'-2.4 waren, neben den polymethoxylierten Flavonen geringfügig Verunreinigungen durch unbekannte Verbindungen enthalten. Die Berechnung der Anteile der einzelnen Polymethoxyflavone in der jeweiligen Misch-

fraktion erfolgte über die Berechnung der peak-Flächen der entsprechenden HPLC-Chromatogramme.

In den untersuchten Fraktionen waren folgende Verbindungen in den angegebenen Verhältnissen enthalten:

B'-2.3: 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon und 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (4:1)

B'-2.4: 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon und 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (3:7)

B'-2.5: 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (19:1)

B'-2.6: 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (1:9)

B'-2.7: 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon und 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (3:17)

2.4 Eigenschaften der Verbindungen

2.4.1 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(2,3,5,6-Tetramethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₂₁H₂₂O₈

Molekülmasse: 401.6

R_f-Wert: 0.28 (NP, LM_{DC} 2)

UV_(MeOH) λ_{max}: 229/328 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
δ 7.26 und 7.17 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.67 (1H, s, H-4'), 6.29 (1H, s, H-3), 3.98 (3H, s, OCH₃-5), 3.91 (3H, s, OCH₃-6), 3.88 (6H, s, OCH₃-3' und OCH₃-5'), 3.75 (6H, s, OCH₃-2' und OCH₃-6')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
δ 177.84 (C-4), 158.55 (C-2), 152.38 (C-8a), 149.95 (C-6), 149.24 (C-3' und C-5'), 148.13 (C-5), 140.87 (C-2' und C-6'), 119.47 (C-4a), 119.19 (C-8), 114.49 (C-3 und C-4'), 113.64 (C-7), 101.70 (C-1'), 61.98 (OCH₃-5), 61.80 (OCH₃-2' und OCH₃-6'), 57.34 (OCH₃-6), 56.75 (OCH₃-3' und OCH₃-5')

MS: m/z (Intensität in %) 402 (96), 387 (100), 372 (17), 357 (74), 342 (6), 327 (7), 313 (9), 186 (17), 165 (15), 149 (20), 137 (15), 97 (13), 85 (13), 83 (22), 71 (21), 69 (19), 57 (32), 55 (15), 43 (20)

2.4.2 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(2,3,6-Trimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₂₀H₂₀O₇

Molekülmasse: 372.4

R_f-Wert: 0.32 (NP, LM_{DC} 2)

UV_(MeOH) λ_{max}: 233/333 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
 δ 7.26 und 7.18 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.98 (1H, d, J = 9 Hz, H-4'), 6.65 (1H, d, J = 9 Hz, H-5'), 6.27 (1H, s, H-3), 3.97 (3H, s, OCH₃-5), 3.91 (3H, s, OCH₃-6), 3.85 (3H, s, OCH₃-3'), 3.83 (3H, s, OCH₃-2'), 3.73 (3H, s, OCH₃-6')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
 δ 178.03 (C-4), 158.54 (C-2), 152.56 (C-8a), 151.81 (C-6'), 149.84 (C-6), 148.59 (C-5), 147.15 (C-2') 132.09 (C-3'), 119.51 (C-4a), 119.15 (C-8), 115.24 (C-3), 114.99 (C-4'), 113.71 (C-7), 106.29 (C-5'), 61.97 (OCH₃-5), 61.58 (OCH₃-2'), 57.37 (OCH₃-6), 56.68 (OCH₃-3'), 56.34 (OCH₃-6')

MS: m/z (Intensität in %) 372 (81), 357 (100), 342 (11), 327 (35), 312 (3), 297 (3), 177 (13), 165 (19), 150 (14), 149 (97), 137 (19), 85 (28), 83 (39), 71 (21), 57 (34), 44 (21), 43 (19)

2.4.3 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin)

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(3,5-Dimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₁₉H₁₈O₆

Molekülmasse: 342.1

R_f-Wert: 0.34 (NP, LM_{DC} 2)

UV_(MeOH) λ_{max}: 276/304 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
 δ 7.30 und 7.28 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.99 (2H, d, J = 2.3 Hz, H-2' und H-6'), 6.63 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, t, J = 2.3 Hz, H-4'), 3.95 (3H, s, OCH₃-5), 3.91 (3H, s, OCH₃-6), 3.85 (6H, s, OCH₃-3' und OCH₃-5')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
 δ 178.17 (C-4), 161.46 (C-2), 161.25 (C-3' und C-5'), 151.62 (C-8a), 150.08 (C-6), 148.02 (C-5), 133.66 (C-1'), 119.35 (C-4a), 119.19 (C-8), 113.56 (C-7), 108.42 (C-3), 104.39 (C-2' und C-6'), 103.46 (C-4'), 61.98 (OCH₃-5), 57.26 (OCH₃-6), 55.69 (OCH₃-3' und OCH₃-5')

MS: *m/z* (Intensität in %) 342 (53), 327 (100), 313 (11), 296 (8), 282 (5), 241 (6), 165 (5), 162 (4), 137 (13), 133 (5), 109 (3), 76 (3), 69 (2)

2.4.4 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B)

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₂₀H₂₀O₇

Molekülmasse: 372.1

R_f-Wert: 0.25 (NP, LM_{DC} 2); 0.22 (RP, LM_{DC} 4)

UV_(MeOH) λ_{max}: 285/323 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
δ 7.30 und 7.28 (je 1H, d, *J* = 9 Hz, H-7 und H-8), 7.08 (2H, s, H-2' und H6'), 6.60 (1H, s, H-3), 3.96 (3H, s, OCH₃-5), 3.93 (6H, s, OCH₃-3' und OCH₃-5'), 3.92 (3H, s, OCH₃-6), 3.90 (3H, s, OCH₃-4')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
δ 178.05 (C-4), 161.50 (C-2), 153.62 (C-2' und C-4'), 151.55 (C-8a), 150.09 (C-6), 148.01 (C-5), 141.11 (C-4'), 126.94 (C-1'), 119.23 (C-4a), 119.03 (C-8), 113.46 (C-7), 107.83 (C-3), 103.68 (C-2' und C-6'), 61.95 (OCH₃-5), 61.09 (OCH₃-4'), 57.22 (OCH₃-6), 56.43 (OCH₃-3' und OCH₃-5')

MS: *m/z* (Intensität in %) 372 (95), 357 (100), 342 (14), 327 (38), 312 (18), 297 (99), 171 (16), 165 (19), 152 (41), 149 (30), 137 (58), 105 (15), 89 (15), 77 (33), 69 (18), 57 (29), 44 (96), 43 (61)

2.4.5 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1)

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₁₉H₁₈O₆

Molekülmasse: 341.6

R_f-Wert: 0.21 (NP, LM_{DC} 2), 0.19 (RP, LM_{DC} 4)

UV_(MeOH) λ_{max}: 248/333 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
 δ 7.51 (1H, dd, J = 2.3 Hz und 9 Hz, H-6'), 7.33 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2'), 7.30 und 7.28 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.95 (1H, d, J = 9 Hz, H-5'), 6.60 (1H, s, H-3), 3.961 (3H, s, OCH₃-5), 3.959 (3H, s, OCH₃-3'), 3.94 (3H, s, OCH₃-4'), 3.92 (3H, s, OCH₃-6)

¹³C-NMR: (CDCl₃)
 δ 178.08 (C-4), 161.66 (C-2), 152.02 (C-8a), 151.65 (C-4'), 150.06 (C-6), 149.38 (C-3'), 148.11 (C-5), 124.26 (C-1'), 119.88 (C-6'), 119.30 (C-4a), 119.03 (C-8), 113.42 (C-7), 111.26 (C-5'), 108.90 (C-2'), 107.07 (C-3), 61.98 (OCH₃-5), 57.30 (OCH₃-6), 56.20 (OCH₃-3'), 56.18 (OCH₃-4')

MS: m/z (Intensität in %) 342 (83), 327 (100), 312 (19), 297 (9), 282 (8), 231 (39), 217 (32), 165 (18), 149 (13), 137 (21), 97 (12), 85 (11), 83 (12), 71 (16), 69 (16), 57 (23), 55 (15), 43 (24)

2.4.6 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2)

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-on

Summenformel: C₂₀H₂₀O₇

Molekülmasse: 372.2

R_f-Wert: 0.28 (NP, LM_{DC} 2); 0.21 (RP, LM_{DC} 4)

UV_(MeOH) λ_{max}: 271/323 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
 δ 7.49 (1H, d, J = 9 Hz, H-6'), 7.27 und 7.23 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.81 (1H, s, H-3), 6.76 (1H, d, J = 9 Hz, H-5'), 3.96 (3H, s, OCH₃-5), 3.92 (3H, s, OCH₃-2'), 3.912 (3H, s, OCH₃-4'), 3.909 (3H, s, OCH₃-6), 3.89 (3H, s, OCH₃-3')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
 δ 178.41 (C-4), 159.79 (C-2), 156.20 (C-4'), 153.14 (C-8a), 151.93 (C-2'), 149.88 (C-6), 148.07 (C-5), 142.96 (C-3'), 124.07 (C-6'), 119.28 (C-4a), 119.15 (C-8), 113.39 (C-7), 111.68 (C-3), 107.46 (C-5'), 61.98 (OCH₃-5), 57.36 (OCH₃-6), 61.27 (OCH₃-2'), 61.07 (OCH₃-3'), 56.22 (OCH₃-4')

MS: *m/z* (Intensität in %) 372 (94), 357 (100), 342 (60), 327 (84), 312 (13),
297 (12), 177 (27), 171 (22), 165 (65), 149 (22), 137 (61), 135 (37), 134
(22), 109 (17), 63 (8)

2.4.7 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(2,3,4,6-Tetramethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-
benzopyran-4-on

Summenformel: C₂₁H₂₂O₈

Molekülmasse: 402.3

R_f-Wert: 0.24 (NP, LM_{DC} 2)

UV_(MeOH) λ_{max}: 229/328 nm

¹H-NMR: (CDCl₃)
δ 7.26 und 7.18 (je 1H, d, *J* = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.31 (1H, s, H-5'),
6.26 (1H, s, H-3), 3.96 (3H, s, OCH₃-5), 3.92 (3H, s, OCH₃-4'), 3.90 (3H, s,
OCH₃-6), 3.88 (3H, s, OCH₃-2'), 3.82 (3H, s, OCH₃-3'), 3.77 (3H, s, OCH₃-
6')

¹³C-NMR: (CDCl₃)
δ 178.14 (C-4), 158.55 (C-2), 155.87 (6'), 154.19 (4'), 152.99 (2'), 152.58
(C-8a), 149.77 (C-6), 148.09 (C-5), 136.36 (3'), 119.43 (C-4a), 119.09 (C-
8), 115.22 (C-3), 113.66 (C-7), 109.46 (C-1') 92.38 (C-5'), 61.96 (OCH₃-5),
61.74 (OCH₃-2'), 61.18 (OCH₃-3'), 57.37 (OCH₃-6), 56.30 und 56.27
(OCH₃-4' und OCH₃-6')

MS: *m/z* (Intensität in %) 402 (23), 387 (100), 372 (9), 357 (6), 342 (7), 340
(11), 327 (4), 312 (5), 179 (10), 172 (10), 165 (17), 164 (10), 149 (16), 137
(15), 85 (6), 71 (9), 57 (15), 44 (15)

2.4.8 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)

Bezeichnung nach IUPAC: 2-(2,6-Dimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-1-
benzopyran-4-on

Summenformel: C₁₉H₁₈O₆

Molekülmasse: 341.7 (Referenzsubstanz)

R_f -Wert: 0.35 (NP, LM_{DC} 2); 0.29 (RP, LM_{DC} 4)

UV_(MeOH) λ_{max} nm: 228/325

¹H-NMR: (CDCl₃)

δ 7.37 (1H, t, J = 9 Hz, H-4'), 7.25 und 7.18 (je 1H, d, J = 9 Hz, H-7 und H-8), 6.61 (2H, d, J = 9 Hz, H-3' und H-5'), 6.25 (1H, s, H-3), 3.97 (3H, s, OCH₃-5), 3.90 (3H, s, OCH₃-6), 3.78 (6H, s, OCH₃-2' und OCH₃-6')

¹³C-NMR: (CDCl₃)

δ 178.03 (C-4), 158.65 (C-2' und C-6'), 158.54 (C-2), 152.56 (C-8a), 149.84 (C-6), 148.11 (C-5), 132.09 (C-4'), 119.51 (C-4a), 119.08 (C-8), 115.37 (C-3), 113.81 (C-7), 104.06 (C-3' und C-5'), 61.97 (OCH₃-5), 57.41 (OCH₃-6), 56.11 (OCH₃-2' und OCH₃-6')

2.4.9 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxypsoralen

Bezeichnung nach IUPAC: 9-(4-Hydroxy-3-methylbut-2-enoxy)-5-methoxyfurano-[3,2-g]-cumarin

Summenformel: C₁₇H₁₆O₆

R_f -Wert: 0.1 (NP, LM_{DC} 2)

UV_(LMHPLC3) λ_{max} nm: 224/246/266/314

¹H-NMR: (CDCl₃)

δ 6.27 und 8.11 (je 1H, d, J = 10 Hz, H-3 und H-4), 7.61 und 6.98 (je 1H, d, J = 3 Hz, H-2' und H3'), 5.71 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-2‘), 4.86 (2H, d, J = 7.5 Hz, CH₂-1‘), 4.24 (2H, s, CH₂-3‘), 4.16 (3H, s, OCH₃-5), 1.85 (3H, s, CH₃-4‘)

¹³C-NMR: (CDCl₃)

δ 160.72 (C-2), 150.75 (C-5), 145.27 (C-2‘), 143.12 (C-8a), 139.69 (C-4), 122.16 (C-2‘), 114.65 (C-6), 112.82 (C-3), 107.67 (C-4a), 105.3 (C-3‘), 69.34 (C-1‘), 61.81 (C-5‘), 60.85 (OCH₃-5), 21.50 (C-4‘)

MS: m/z (Intensität in %) 233 (85), 232 (100), 217 (98), 189 (32), 161 (20), 133 (10), 105 (11), 95 (9), 77 (14), 63 (9), 53 (8), 43 (28), 41 (13), 39 (13)

2.4.10 Kaempferol-3-O-glucosidSummenformel: C₂₁H₂₀O₁₁R_f-Wert: 0.62 (NP, LM_{DC}3)UV_(MeOH/H₂O) λ_{max} nm: 266/347¹H-NMR: (CD₃OD)

δ 8.04 (2H, d, J = 9 Hz, H-2' und H-6'), 6.88 (2H, d, J = 9 Hz, H-3' und H-5'), 6.38 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 5.23 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1‘), 3.68 (1H, dd, J = 3; 12 Hz, H-6‘A), 3.52 (1H, dd, J = 6; 12 Hz, H-6‘B), 3.42 (2H, m, H-2‘ und H-3‘), 3.30 (1H, m, H-4‘), 3.19 (1H, m, H-5‘)

2.4.11 Kaempferol-3-O-rutinosidSummenformel: C₂₇H₃₀O₁₅R_f-Wert: 0.4 (NP, LM_{DC}3)UV_(MeOH/H₂O) λ_{max} nm: 266/347¹H-NMR: (CD₃OD)

δ 8.05 (2H, d, J = 9 Hz, H-2' und H-6'), 6.88 (2H, d, J = 9 Hz, H-3' und H-5'), 6.40 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 5.12 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1‘), 4.50 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-1‘‘), 3.80 (1H, dd, J = 1.5; 10.7, H-6‘A), 3.63 (1H, dd, J = 2.3; 3.3 Hz, H-2‘‘), 3.53 (1H, dd, J = 3.3; 9.8 Hz, H-3‘‘), 3.47 (1H, dd, J = 3; 6 Hz, H-2‘‘), 3.44 (1H, dd, J = 2.3; 6 Hz, H-5‘‘), 3.30 bis 3.45 (H-3‘, H-4‘, H-6‘B), 3.25 (1H, m, H-5‘), 1.11 (3H, d, J = 6 Hz, CH₃-6‘‘)

2.4.12 Quercetin-3-O-glucosidSummenformel: C₂₁H₂₀O₁₂R_f-Wert: 0.52 (NP, LM_{DC}3)UV_(MeOH/H₂O) λ_{max} nm: 257/357¹H-NMR: (CD₃OD)

δ 7.7 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, J = 2.3; 8.3 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.36 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J =

2.3 Hz, H-6), 5.22 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1‘), 3.70 (1H, dd, $J = 2.4; 11.9$ Hz, H-6‘A), 3.57 (1H, dd, $J = 5.3; 12$ Hz, H-6‘B), 3.48 (2H, m, H-2‘ und H-3‘), 3.34 (1H, m, H-4‘), 3.21 (1H, m, H-5‘)

2.4.13 Quercetin-3-O-rutinosid

Summenformel: $C_{27}H_{30}O_{16}$

R_f -Wert: 0.32 (NP, LM_{DC}3)

UV_(MeOH/H₂O) λ_{max} nm: 257/357

¹H-NMR: (CD₃OD)
 δ 7.66 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2‘), 7.62 (1H, dd, $J = 2.3; 9$ Hz, H-6‘), 6.86 (1H, d, $J = 9$ Hz, H-5‘), 6.36 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.08 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1‘), 4.51 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-1‘‘), 3.79 (1H, dd, $J = 1.5; 11$ Hz, H-6‘A), 3.62 (1H, dd, $J = 2; 3$, H-2‘‘), 3.53 (1H, dd, $J = 3; 9.8$ Hz, H-3‘‘), 3.45 (1H, dd, $J = 3; 7.5$ Hz, H-2‘), 3.27 (1H, dd, $J = 2.3; 9$ Hz, H-4‘‘), 3.30 bis 3.45 (H-3‘, H-4‘, H-6‘B), 3.25 (1H, m, H-5‘), 1.12 (3H, d, $J = 6$ Hz, CH₃-6‘‘)

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von *Casimiroa tetrameria* an isolierten Darmabschnitten

3.1.1 Auswahl der zu untersuchenden Pflanze

Die Auswahl der Arzneipflanze, die tierphysiologisch und phytochemisch untersucht werden sollte, erfolgte durch die Testung der entsprechenden Rohextrakte in der USSING-Kammer. Insgesamt standen 6 Heilpflanzen, die traditionell bei gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt werden bzw. deren Extrakte zur Verfügung. Die Untersuchung der antisekretorischen Wirkung des jeweiligen Extrakts erfolgte durch dessen Zugabe zur mucosalen bzw. zur serosalen Seite des Kaninchencolon-Epithels in der USSING-Kammer. Gearbeitet wurde jeweils mit einer Konzentration von 500 µg/ml Extrakt. Beobachtet wurde der Einfluß des jeweiligen Extrakts auf die durch PGE₂ induzierte gesteigerte Cl⁻-Sekretion ins Darmlumen. Eine Übersicht über die Auswahl der zu testenden Pflanzen und die Höhe der jeweiligen antisekretorischen Aktivität ist in Tab. 3.1 dargestellt. Verglichen wurde die maximale Reversion der PGE₂-induzierten Cl⁻-Sekretion, veranschaulicht durch die Veränderung des transepithelialen Potentials V_{te} bzw. des transepithelialen Kurzschlußstroms I_{sc} nach Zugabe der verschiedenen Rohextrakte.

Die höchste Aktivität zeigte der Rohextrakt von *Casimiroa tetrameria*. Bei einer Applikation zur mucosalen Seite war lediglich eine geringfügige antisekretorische Aktivität nachzuweisen. Die maximale Reversion der Cl⁻-Sekretion belief sich auf 23 % ± 6%. Die Zugabe des Extrakts zur serosalen Seite hingegen führte zu einer vergleichsweise raschen Reversion der Cl⁻-Sekretion. Die maximale Umkehrung von 59 % ± 7 % war bereits innerhalb von 30 bis 60 min nach Zugabe des Extrakts nachzuweisen.

Verhältnismäßig schwächer war die Reaktion am Epithel wie sie durch die beiden anderen antisekretorische Aktivität aufweisende Arten *Lysiloma divaricata* (JACQ.) MACBR. und *Tagetes erecta* L. ausgelöst wurde. Die maximale Einschränkung des Cl⁻-Transports zur mucosalen Seite des Epithels war bei beiden vergleichsweise niedriger und zudem erst

nach mindestens 120 min erreicht. Daher wurde *C. tetrameria* für weitere tierphysiologische und phytochemische Untersuchungen ausgewählt.

Art	verwendete Teile	Indikationen	Reversion der Cl ⁻ - Sekretion [%]
<i>Bidens squarrosa</i> LESS. Asteraceae *	Blätter	Beschwerden des GI-Trakts	m.: keine Wirkung s.: keine Wirkung
<i>Casimiroa tetrameria</i> MILLSP., Rutaceae *	Blätter	Beschwerden des GI-Trakts	m.: 23 ± 6 s.: 59 ± 7
<i>Hylocereus undatus</i> (L) BRITTON & ROSE, Cactaceae *	Blätter	Beschwerden des GI-Trakts; urologische Beschwerden	m.: keine Wirkung s.: keine Wirkung
<i>Baccharis conferta</i> KUNTH. Asteraceae ♦	Kraut	Diarrhoe; Krämpfe	m.: keine Wirkung s.: keine Wirkung
<i>Lysiloma divaricata</i> (JACQ.) MACBR., Mimosaceae ♦	Rinde	Dysenterie	m.: keine Wirkung s.: 39 ± 5
<i>Tagetes erecta</i> L., Asteraceae ♦	Blüten	Diarrhoe (bes. bei Kindern)	m.: 44 ± 10 s.: 42 ± 7

Tab. 3.1: Übersicht über die untersuchten Pflanzen und deren maximale antisekretorische Aktivität;

getestet wurden jeweils 500 µg/ml Rohextrakt; PGE₂-Konzentration: 1µM, serosal

(m =mucosal; s = serosal)

Herkunft der Pflanze: * = Chikindzonot/Yucatán, Mexiko (Maya; Sammlung A. ANKLI)

♦ = Sierra de Zongolica/Veracruz, Mexiko (Nahua; Sammlung C. WEIMANN)

3.1.2 Untersuchung der sekretionshemmenden Wirkung von *C. tetrameria* in der USSING-Kammer

Dosisabhängigkeit der Sekretionshemmung durch den Rohextrakt

Eine Zugabe des Rohextraktes zur serosalen Seite der Colonmucosa zeigte eine eindeutige Dosisabhängigkeit der antisekretorischen Wirkung. Diese konzentrationsbedingte Reversion des durch die PGE₂-Zugabe induzierten Cl⁻ - Transports über das Epithel zur mucosalen Seite ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier Versuchen. Wie die Darstellung verdeutlicht, ergibt sich für den Rohextrakt bei einer serosalen Zugabe von 500 µg/ml, was der höchsten eingesetzten Konzentration ent-

spricht, eine etwa 50%-ige Reversion des transepithelialen Kurzschlußstroms I_{sc} nach 30 min. Für die nachgewiesene Dosisabhängigkeit der antisekretorischen Wirkung des Rohextrakts wurde eine Signifikanz mit $p \leq 1.7 \times 10^{-7}$ berechnet.

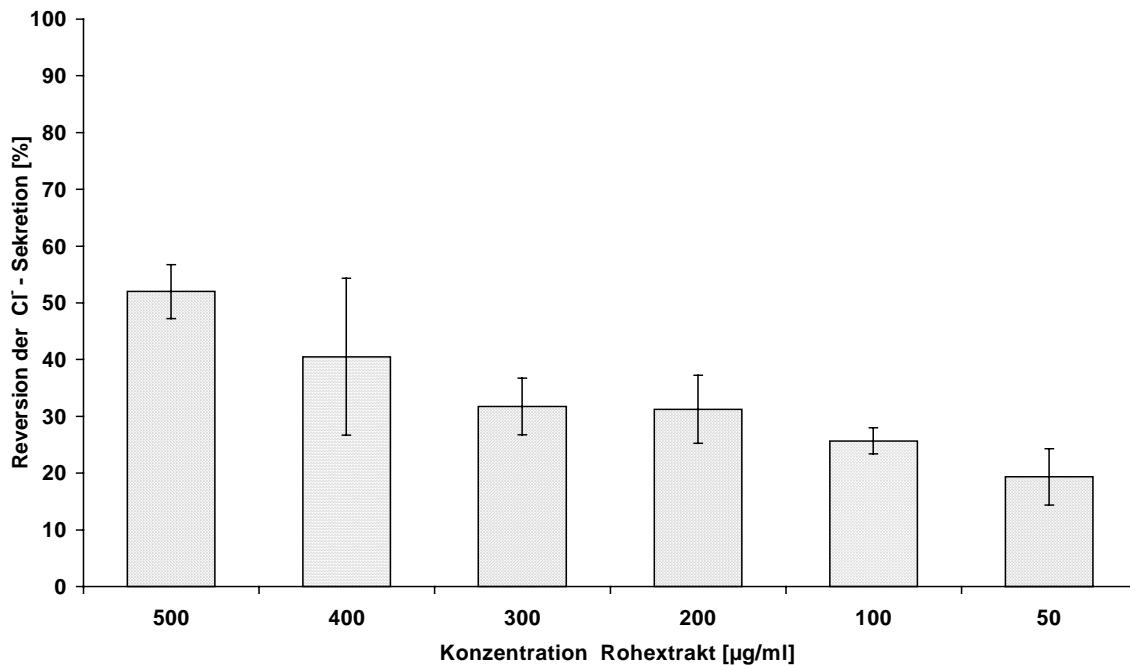


Abb. 3.1: Darstellung der Dosisabhängigkeit der antisekretorischen Aktivität des Rohextrakts von *C. tetrameria*; Reversion [in %] der durch PGE₂ induzierten Cl⁻ - Sekretion, 30 min nach Extraktzugabe; PGE₂-Konzentration: 1 µM, serosal; Anzahl der Versuche je Konzentration: $n \geq 4$

Anreicherung der antisekretorischen Aktivität

Da es das Ziel war, möglichst die für die biologische Aktivität verantwortlichen Komponenten aus dem Rohextrakt von *C. tetrameria* zu identifizieren, wurde soweit möglich eine an der antisekretorischen Aktivität orientierte Fraktionierung durchgeführt. Es erfolgte daher zunächst ein Vergleich der sekretionshemmenden Wirkung der H₂O-, der EtOAc- und der PE-Fraktion. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Abb. 3.2 wiedergegeben. Es ist zum einen ersichtlich, daß die EtOAc-Fraktion die höchste antisekretorische Aktivität aufweist, weshalb mit dieser Fraktion weitergearbeitet wurde. Weiterhin zeigt ein Vergleich mit den Werten für den Rohextrakt, daß eine Anreicherung der biologischen Aktivität in der EtOAc-Fraktion verzeichnet werden kann. Die in Abb. 3.2 darge-

stellten Ergebnisse für die Grobfraktionen wurden als signifikant bewertet, da in jedem Fall $p \leq 10^{-4}$ beobachtet wurde.

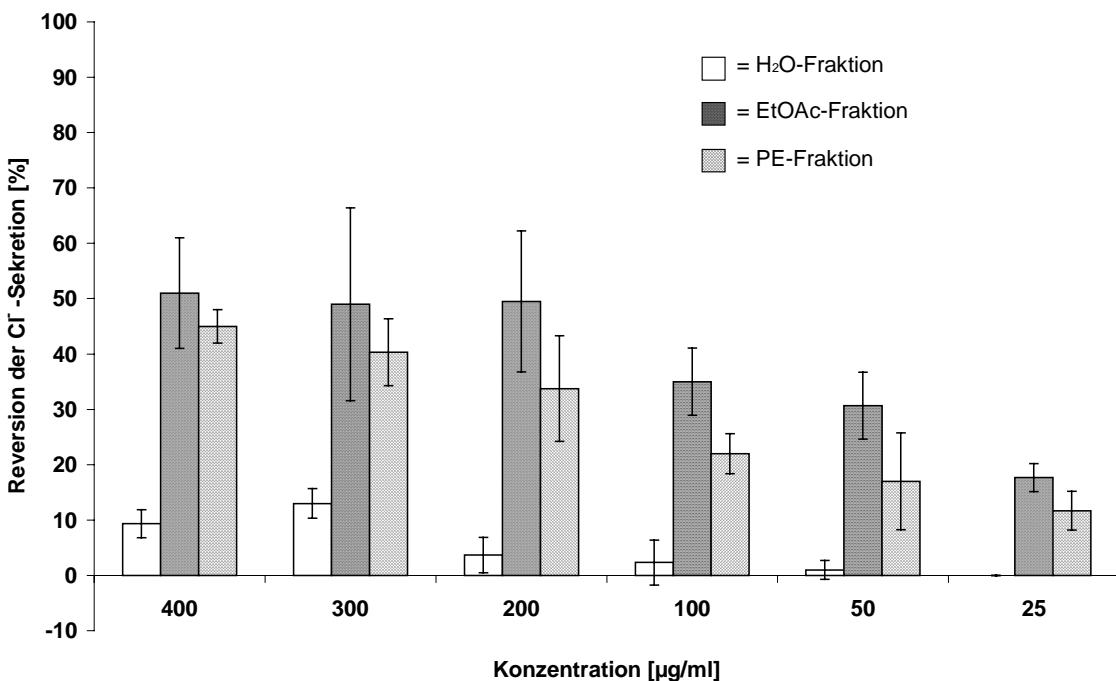


Abb. 3.2: Vergleich der antisekretorischen Aktivität der H₂O-, der EtOAc- und der PE-Fraktion; Reversion [in %] der durch PGE₂ induzierten Cl⁻ - Sekretion 30 min nach Zugabe der jeweiligen Probe; PGE₂-Konzentration: 1 µM, serosal;
Anzahl der Versuche je Fraktion und Konzentration: $n \geq 3$

Untersuchung der Unterfraktionen der EtOAc-Phase

Die weitere Auftrennung der antisekretorisch aktiven EtOAc-Fraktion erfolgte über Sephadex® LH-20. Die Testung der resultierenden Fraktionen A bis D zeigte, daß lediglich in Fraktion A und B biologische Aktivität nachzuweisen war. Die Zugabe von 200 µg/ml von Fraktion A zur serosalen Seite des Epithels führte zu einer Reversion des Kurzschlußstroms I_{sc}, der das Ausmaß der Cl⁻ -Sekretion verdeutlicht, von $12 \% \pm 3 \%$ innerhalb von 30 min nach Probenzugabe. Diese Aktivität ist nicht relevant im Vergleich zum entsprechenden Ergebnis für die EtOAc-Fraktion ($50 \% \pm 13 \%$). Für die Fraktion B konnte bei der gleichen Konzentration eine Reversion von $46 \% \pm 6 \%$ nachgewiesen werden, was etwa der Aktivität der EtOAc-Phase entspricht. Eine weitergehende Anrei-

cherung der biologischen Aktivität wurde durch die Abtrennung des Chlorophylls und der geringen Menge an Flavonoidglykosiden aus Fraktion B erreicht. Die unter anderem resultierende Fraktion B'-2 erwies sich als biologisch aktivste Fraktion und zeigte bei einer Zugabe von 200 µg/ml serosal eine Reversion der Cl⁻ - Sekretion von 68 % ± 6 %. Die Applikation von 100 µg/ml führte noch zu einer Umkehrung von I_{sc} um 56 % ± 8 % innerhalb von 30 min, 50 µg/ml bewirkten einen Rückgang des negativen Kurzschlußstroms um 43 % ± 5 %.

Vergleich der antisekretorischen Aktivität der polymethoxyflavonhaltigen Fraktionen

Fraktion B'-2 enthielt 4 der insgesamt 8 verschiedenen isolierten und identifizierten Polymethoxyflavone. Eine weitere Auftrennung führte zu 5 Fraktionen, die diese polymethoxilierten Flavone in unterschiedlichen Verhältnissen enthielten. Es erfolgte die Untersuchung dieser 5 Mischfraktionen sowie einer weiteren polymethoxyflavonhaltigen Fraktion B5-9 (vgl. Isolierungsschema, Kap. 3.4.2) und exemplarisch der Reinsubstanz 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon auf die jeweilige antisekretorische Aktivität. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Aus zeitlichen Gründen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, alle identifizierten Reinsubstanzen aus den erhaltenen und auf ihre antisekretorische Aktivität hin getesteten Fraktionen in ausreichendem Maß für eine Untersuchung zu isolieren. Es kann hier aber eine Aussage über die biologische Aktivität der Polymethoxyflavongemische gemacht werden. Diese weisen keine bemerkenswerten Unterschiede in ihrer biologischen Wirksamkeit auf. Die Testung der einzigen, in ausreichenden Mengen vorliegenden Reinsubstanz zeigte einen Aktivitätsverlust im Vergleich zu den Mischfraktionen (geschätzter IC₅₀-Wert, ermittelt mit Hilfe einer Regressionsgeraden: 135 µg/ml bzw. 0.36 mM). Das Substanzgemisch mit der höchsten biologischen Aktivität war eindeutig B5-9. Für diese Fraktion ergibt sich ein IC₅₀-Wert von 30 µg/ml (Abschätzung mittels einer Regressionsgeraden). Der Wert für 100 µg/ml liegt bei über 100 % Reversion der Cl⁻ - Sekretion nach 30 min. Dies kann damit erklärt werden, daß das transepitheliale Potential V_{te} bzw. der transepitheliale Kurzschlußstrom I_{sc} nach Zugabe der Probe noch über den Ausgangswert vor der PGE₂-Zugabe zurückgeht. Unter Berücksichtigung der versuchsbe-

dingten Schwankungen waren die Ergebnisse für die Fraktionen B'-2.3 bis B'-2.6 als nahezu identisch anzusehen. Die geringste antisekretorische Aktivität zeigte Fraktion B'-2.7. Für alle untersuchten Fraktionen wurde eine Signifikanz mit $p \leq 0.01$ beobachtet.

eingesetzte Konzentration [µg/ml]/ getestete Fraktion	100	50	25
B'-2.3 (5,6,3',4'-Tetra-/5,6,3',4',5'-Penta-methoxyflavon → 4:1)	73 ± 2	54 ± 10	39 ± 14
B'-2.4 (5,6,3',4'-Tetra-/5,6,3',4',5'-Penta-methoxyflavon → 3:7)	70 ± 5	65 ± 14	40 ± 9
B'-2.5 5,6,3',4',5'-/ 5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 19:1)	71 ± 19	48 ± 5	29 ± 6
B'-2.6 (5,6,3',4',5'-/ 5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 1:9)	83 ± 5	43 ± 5	29 ± 3
B'-2.7 (5,6,3',5'-Tetra-/5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 3:17)	58 ± 10	30 ± 13	26 ± 5
B5-9 (5,6,2',6'-Tetra-/ 5,6,2',3',6'-Penta-/ 5,6,2',3',5',6'-Hexa-/5,6,2',3',4',6'-Hexa-methoxyflavon → 3:17:35:46)	96 ± 14	71 ± 22	47 ± 7
5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon	40 ± 18	26 ± 2	16 ± 3

Tab. 3.2: Vergleich der antisekretorischen Aktivität der polymethoxyflavonhaltigen Fraktionen

Reversion des durch PGE₂ (1 µM, serosal) verursachten negativen Kurzschlußstroms I_{sc} in [%]; die Messung erfolgte jeweils 30 min nach Probenzugabe;
Anzahl der Versuche: n = 4 (je getestete Fraktion und Konzentration)

3.1.3 Untersuchung der kontraktionsinhibierenden Wirkung von *C. tetrameria* am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Dosisabhängigkeit der Kontraktionsinhibition durch den Rohextrakt

Vorversuche (2 Konzentrationsstufen: 200 und 60 µg/ml) bezüglich der kontraktionsinhibierenden Wirkung des Rohextrakts von *C. tetrameria*, die von Dr. CLAUDIA WEIMANN

(ehem. Institut für Pharmazeutische Biologie, Univ. Freiburg) am Pharmakognostischen Institut der Universität von Uppsala, Schweden durchgeführt wurden, zeigten eine entsprechende biologische Aktivität des Extrakts. Die Kontraktionen wurden mit Histamin in einer Konzentration von 2 μM bzw. Elektrischer Feldstimulation (60 V, 1 Hz) induziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Histamin als kontraktionsinduzierende Substanz gewählt. Zunächst wurde die Histamindosis ermittelt, durch welche eine submaximale Kontraktion am isolierten Darmstück ausgelöst wird. Dies erfolgte durch die mehrfache Erstellung einer entsprechenden Kalibrierungskurve (vgl. Abb. 3.3).

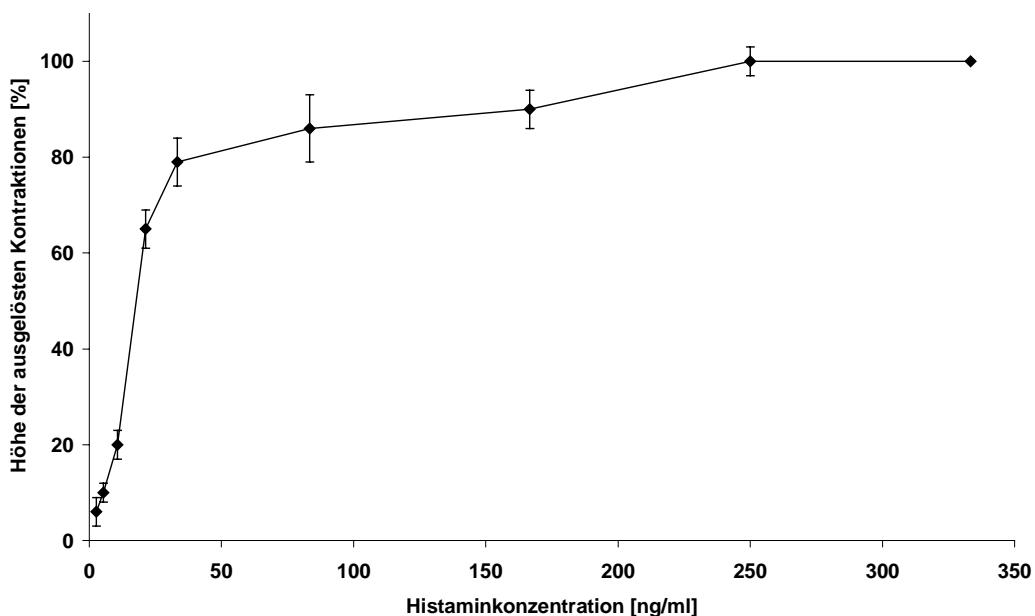


Abb. 3.3: Histamin-Dosis-Wirkungskurve zur Ermittlung der submaximalen Histamin-Konzentration
(n = 10)

Eine Dosis von 5 μg Histamin (166.7 ng/ml bzw. ca 1 μM) erwies sich als sinnvoll. Für den Rohextrakt wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Kontraktionsinhibition durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve untersucht. Der Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration ist in Abb. 3.4 dargestellt. Neben der ausgeprägten kontraktionsinhibierenden Aktivität war auch eine Auslösung von Spontankontraktionen an der glatten Muskulatur des Meerschweinchen-Ileums sofort nach der jeweiligen Zugabe des Rohextrakts nachzuweisen. Diese Aktivität verhielt sich in ihrer Höhe ebenso kon-

zentrationsabhängig und ist gleichfalls in Abb. 3.4 vermerkt. Für den Rohextrakt ergibt sich bezüglich der kontraktionsinhibierenden Aktivität ein IC₅₀-Wert von 135 µg/ml.

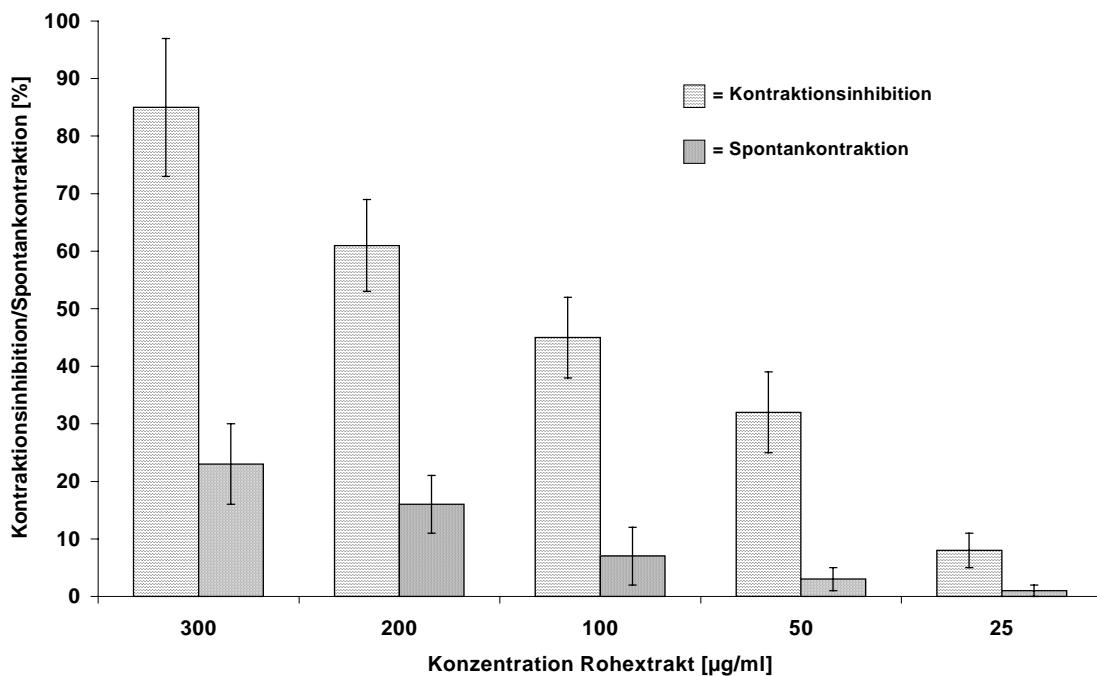


Abb. 3.4: Dosisabhängigkeit der kontraktionsinhibierenden und der kontraktionsinduzierenden Aktivität des Rohextrakts von *C. tetrameria*; Anzahl der Versuche: n = 6;
100%-Wert = Kontraktion, die durch 1 µM Histamin ausgelöst wird

Untersuchung der H₂O-, der EtOAc- und der PE-Fraktion auf ihre kontraktionsinhibierende Aktivität am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Die aus einer Flüssig-Flüssig-Extraktion resultierende H₂O-, EtOAc- und PE-Fraktion wurde jeweils auf ihren Einfluß auf die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. 3.3 festgehalten.

Die Testung der Grobfraktionen zeigte, daß die EtOAc-Fraktion die höchste kontraktionsinhibierende Aktivität aufwies. Nur geringfügig weniger aktiv war die PE-Fraktion. Weiter war es möglich, eine Abtrennung der spasmolytisch wirkenden Inhaltsstoffe des Rohextrakts von jenen, die für die Auslösung von Spontankontraktionen verantwortlich sind, nachzuweisen. Die Untersuchung der H₂O-Fraktion am isolierten Meerschweinchen-Ileum zeigte, daß diese Fraktion die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen kaum

unterdrücken bzw. reduzieren kann, sondern offensichtlich Verbindung(en) enthält, die kontraktionsauslösend wirken. Es war eine eindeutige Anreicherung der kontraktionsinduzierenden Aktivität in der H₂O-Fraktion im Vergleich zum Rohextrakt nachzuweisen (Tab. 3.3). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die EtOAc- und die PE-Phase in geringem Maße zusätzlich relaxierend auf die glatte Muskulatur des Ileums wirken. Dies wurde durch eine Entspannung des Organsegments sofort nach Zugabe der entsprechenden Fraktion verdeutlicht.

Getestete Fraktion	Kontraktionsinhibition [%]	Höhe der Spontankontraktion [%]	Relaxation [%]
Rohextrakt (n = 6)	45 ± 7	7 ± 5	n.v.
H ₂ O-Fraktion (n = 4)	10 ± 5	40 ± 8	n.v.
EtOAc-Fraktion (n = 4)	79 ± 9	n.v.	5 ± 2
PE-Fraktion (n = 4)	74 ± 5	n.v.	2 ± 1

Tab. 3.3: Inhibition der Histamin-induzierten Kontraktionen – Vergleich der Aktivität von Rohextrakt, H₂O-, EtOAc- und PE-Fraktion; getestete Konzentration: 100 µg/ml; Histaminkonzentration: 1 µM; n.v. = nicht vorhanden

Untersuchung der Unterfraktionen der EtOAc-Phase am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Da die Verteilung der biologischen Aktivität bezüglich der Kontraktionsinhibition an der glatten Muskulatur ähnlich der antisekretorischen Aktivität am Kaninchencolon war, erfolgte zunächst die Testung der Fraktionen A bis D. C und D zeigten keine bemerkenswerte spasmolytische Aktivität. Die Zugabe von 100 µg/ml der Fraktion A bewirkte eine Inhibition der Histamin-induzierten Kontraktion um 59 % ± 8 %. Die höchste Aktivität zeigte Fraktion B. Durch die Zugabe von 100 µg/ml wurden die ausgelösten Kontraktionen um 95 % ± 4 % verringert. Des weiteren wurde eine sofortige Relaxation am isolierten Darmstück zu 5 % ± 2% bei Zugabe der Probe nachgewiesen.

Für die Fraktion B'-2 wurde im Vergleich zu Fraktion B bei einer Konzentration von 100 µg/ml keine Anreicherung der kontraktionsinhibierenden Aktivität nachgewiesen (96 % ±

3 %). Eine Erniedrigung der Dosis von B'-2 auf 25 µg/ml bewirkte eine Verringerung der ausgelösten Kontraktionen um 86 % ± 8 %.

Vergleich der kontraktionsinhibierenden Aktivität der polymethoxyflavonhaltigen Fraktionen

Ein Vergleich der spasmolytischen Aktivität der polymethoxyflavonhaltigen Fraktionen B'-2.3 bis B'-2.7 bzw. B5-9 und einer der isolierten Reinsubstanzen ist in Tab. 3.4 dargestellt.

Eingesetzte Konzentration [µg/ml]/ getestete Fraktion	25	12.5	6.25
B'-2.3 (5,6,3',4'-Tetra-/5,6,3',4',5'-Penta-methoxyflavon → 4:1)	86 ± 5	64 ± 4	n.b.
B'-2.4 (5,6,3',4'-Tetra-/5,6,3',4',5'-Penta-methoxyflavon → 3:7)	93 ± 4	70 ± 17	n.b.
B'-2.5 5,6,3',4',5'-/ 5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 19:1)	92 ± 3	64 ± 6	n.b.
B'-2.6 (5,6,3',4',5'-/ 5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 1:9)	85 ± 9	64 ± 5	n.b.
B'-2.7 (5,6,3',5'-Tetra-/5,6,2',3',4'-Penta-methoxyflavon → 3:17)	87 ± 7	75 ± 4	n.b.
B5-9 (5,6,2',6'-Tetra-/ 5,6,2',3',6'-Penta-/ 5,6,2',3',5',6'-Hexa-/5,6,2',3',4',6'-Hexa-methoxyflavon → 3:17:35:46)	91 ± 4	88 ± 8	34 ± 9
5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon	83 ± 4	79 ± 13	34 ± 4

Tab. 3.4: Vergleich der kontraktionsinhibierenden Aktivität der polymethoxyflavonhaltigen

Fraktionen. Die Auslösung der Kontraktionen erfolgte durch Histamin, 1 µM (= 100 %);

Anzahl der Versuche: n = 4 (je getestete Fraktion und Konzentration)

n.b. = nicht bekannt, d.h. Fraktion wurde in dieser Konzentration nicht getestet

Es wird deutlich, daß bei der jeweilige Zugabe von 25 µg/ml keine bemerkenswerten Unterschiede bezüglich der kontraktionsinhibierenden Aktivität zwischen den einzelnen getesteten Fraktionen nachgewiesen werden können.

Auch ist bei dieser Konzentration gegenüber B'-2 keine Anreicherung bezüglich der kontraktionsinhibierenden Wirkung zu vermerken. Eine Halbierung der Dosis zeigte jedoch, daß wiederum die Fraktion B5-9 die vergleichsweise höchste biologische Aktivität aufweist ($88\% \pm 8\%$). Ein Aktivitätsverlust bei Applikation der Reinsubstanz am isolierten Meerschweinchen-Ileum ist im Vergleich zur Untersuchung der antisekretorischen Aktivität in der USSING-Kammer nicht zu vermerken, eine Anreicherung ist jedoch ebenso wenig nachweisbar.

3.2 Untersuchungen der antimikrobiellen Wirksamkeit von *Casimiroa tetrameria*

3.2.1 Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*

Es wurde zunächst die Aktivität des Rohextrakts von *Casimiroa tetrameria* gegen verschiedene gramnegative und grampositive Keime und den Pilz *Candida albicans* untersucht (ANKLI, 2000b). Diese Vorversuche zeigten eine Aktivität gegen den grampositiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* und den Haut- und Darmpilz *Candida albicans*. Es wurde daraufhin die Konzentrationsabhängigkeit der antimikrobiellen Wirkung des Rohextrakts untersucht. Ebenso wurden die Grobfraktionen des Rohextrakts und die polymethoxyflavonhaltige Fraktion B'-2 auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit hin getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3.5 bzw. 3.6 dargestellt.

Der Rohextrakt zeichnete sich in beiden Fällen lediglich durch eine schwache antimikrobielle Aktivität aus, wobei das Wachstum von *Candida albicans* stärker gehemmt wurde. Allerdings erschienen die Hemmhöfe im Falle des Pilzes weniger klar, sondern zeigten sich eher als stark aufgelockerte Zonen des Wachstums. Bei der H₂O-Fraktion konnte keine hemmende Wirkung nachgewiesen werden. Sowohl gegen *Staphylococcus aureus* als

auch gegen *Candida albicans* erwies sich die EtOAc-Phase als aktivste Grobfraktion. Eine Anreicherung der antimikrobiellen Aktivität war bei Fraktion B'-2 zu verzeichnen.

Getestete Menge [µg]/Fraktion	600	400	200
Rohextrakt	0.9 ± 0,3	k. H.	k. H.
PE-Fraktion	0.5 ± 0.4	k. H.	k. H.
EtOAc-Fraktion	2.7 ± 1.2	1.7 ± 1.2	0.7 ± 1.2
H ₂ O-Fraktion	k. H.	k. H.	k. H.
Fraktion B'-2	3.3 ± 1.5	2.5 ± 1.3	1.7 ± 1.2

Tab. 3.5: Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus*; Angabe des jew. Hemmhofs in [mm];

Anzahl Versuche je Fraktion und Konzentration: n = 3

Kontrolle: Bactrim® (Sulfamethoxazol, 23.75 µg + Trimethoprim, 1.25 µg) → 11 mm ± 1 mm;

k.H. = keine Hemmung

getestete Menge [µg]/Fraktion	600	400	200
Rohextrakt	2.2 ± 2.5	k. H.	k. H.
PE-Fraktion	0.7 ± 0.3	k. H.	k. H.
EtOAc-Fraktion	3.7 ± 1.2	2.3 ± 0.6	1.2 ± 0.8
H ₂ O-Fraktion	k. H.	k. H.	k. H.
Fraktion B'-2	5.3 ± 0.6	3.7 ± 0.6	2.3 ± 0.6

Tab. 3.6: Hemmung des Wachstums von *Candida albicans*; Angabe des jeweiligen Hemmhofs in [mm];

Anzahl Versuche je Fraktion und Konzentration: n = 3

Kontrolle: 5-Fluorocytosin (1 µg) → 12 mm ± 1 mm;

k.H. = keine Hemmung

3.2.2 Aktivität gegen *Helicobacter pylori*

Die Untersuchung des Rohextrakts von *C. tetrameria* bezüglich der Hemmung des Wachstums von *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) zeigte die Ausbildung eines Hemmhofs von 4 mm bei einer Testung von 600 µg bzw. einen MIC-Wert von 3 µg/ml. Diese Konzentration hemmte das Wachstum eines zusätzlich untersuchten klinischen Stammes von *H. pylori* noch um 25 %. Daraufhin wurden die wässrige Phase, die EtOAc-, die PE-Fraktion und die polymethoxyflavonhaltige Fraktion B'-2 auf ihre biologische Aktivität untersucht. Die Fraktionen wurden soweit verdünnt, daß sie in einer Endkonzentration von 10 µg/ml im Medium vorlagen. Bei dieser Konzentration konnte für die wässrige Phase und auch für die Fraktion B'-2 keine Hemmung des Bakterienwachstums nachgewiesen werden. Hingegen wirkten sowohl die EtOAc- als auch die PE-Fraktion bei der angegebenen Konzentration vollständig hemmend. Wurde die eingesetzte Konzentration um 50 % (5 µg/ml) erniedrigt, konnte keine Fraktion eine Wachstumshemmung mehr bewirken.

Die durchgeführte Untersuchung des Rohextrakts von *C. tetrameria* auf Säurestabilität zeigte, daß der Extrakt auch nach einer Behandlung mit HCl noch in der Konzentration, die dem ermittelten MIC-Wert entspricht (3 µg/ml) inhibierend auf das Bakterienwachstum wirkte.

3.3 Untersuchungen zur Cytotoxizität von *Casimiroa tetrameria*

Die Untersuchung der Wirkung auf die KB-Zell-Linie ATCC CCL 17, an der die Cytotoxizität getestet wurde, zeigte bei einer Konzentration des Rohextrakts von 50 µg/ml keine nennenswerte Beeinflussung der Stoffwechselaktivität der Zellen (ANKLI, 2000b).

Die Untersuchung auf Cytotoxizität an HeLa-Zellen wurde mit höheren Konzentrationen durchgeführt. Getestet wurden der Rohextrakt, die EtOAc-Fraktion und die Fraktion B'-2.

Eingesetzt wurden folgende Konzentrationen:

Rohextrakt: 500, 250, 100 µg/ml

EtOAc-Fraktion: 300, 120, 60 µg/ml

Fraktion B'-2: 100, 50, 25 µg/ml

Beobachtet wurden die Zellen innerhalb der ersten 8 h zunächst in 20- bis 30-minütigen Intervallen, dann stündlich. Nach 24 h Stunden wurde die Beobachtung beendet.

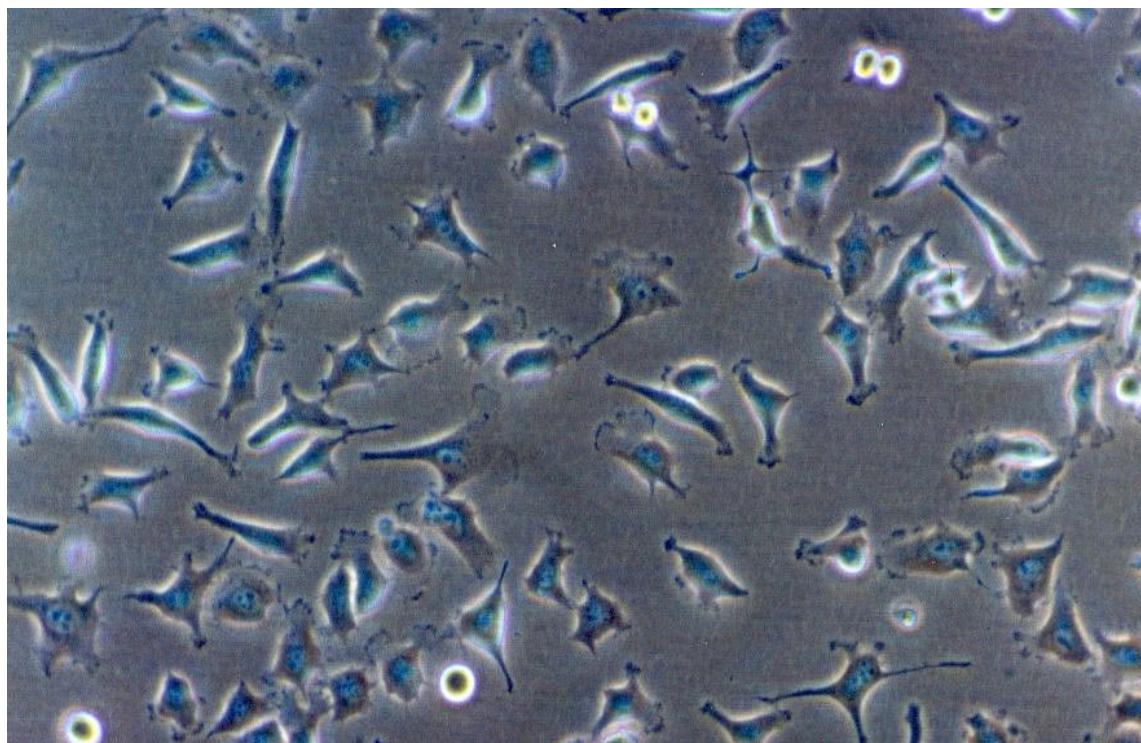


Abb. 3.5: Durchlicht-Aufnahme von HeLa-Zellen im Kulturmedium; unbehandelte Kontrolle, $\Delta t = 6$ h

Für den *Rohextrakt* ergaben sich folgende Resultate:

Bei einer Konzentration von 500 µg/ml zeigten die Zellen nach etwa 5 h leichte Veränderungen. Sie erschienen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht kugelförmig. Im Verlauf der Beobachtung verstärkte sich diese Tendenz. Eine Dosis von 250 µg/ml bzw. 100 µg/ml führte zu denselben morphologischen Veränderungen, jedoch erst nach einem längeren Zeitraum und weniger ausgeprägt.

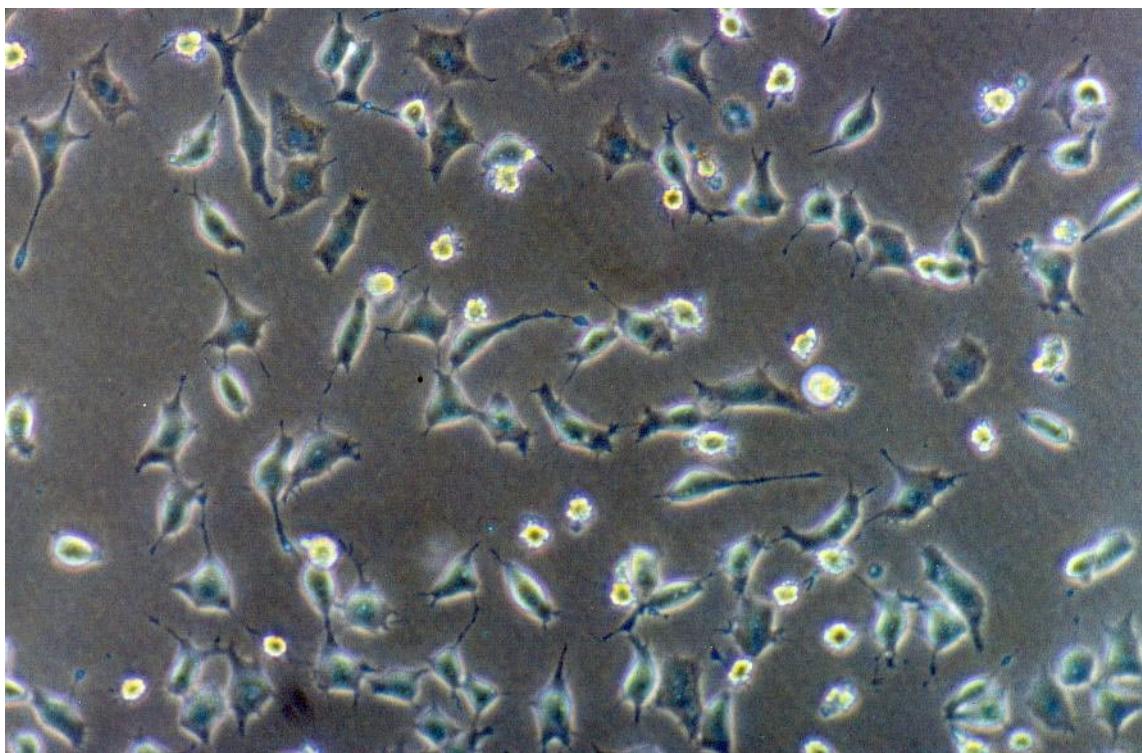


Abb.3.6: Durchlicht-Aufnahme von HeLa-Zellen im Kulturmedium + Rohextrakt (500 µg/ml); $\Delta t = 6$ h

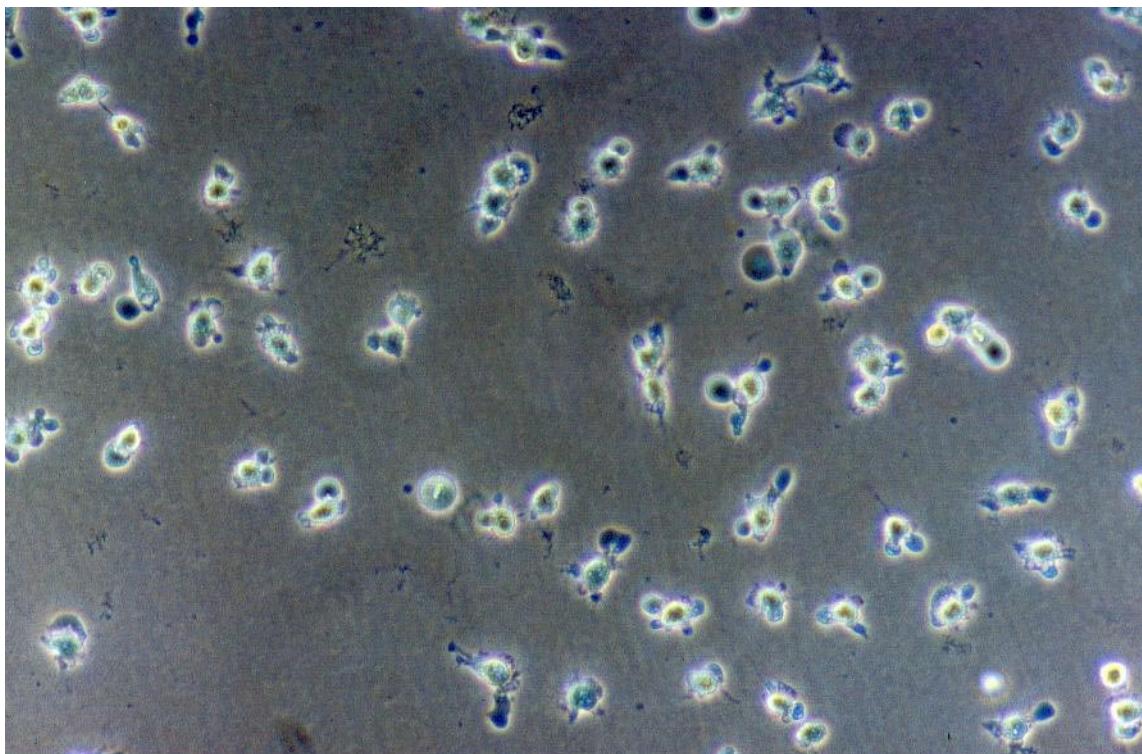


Abb. 3.7: Durchlicht-Aufnahme von HeLa-Zellen im Kulturmedium + EtOAc-Fraktion (120 µg/ml); $\Delta t = 6$ h

Nach der Applikation der *EtOAc-Fraktion* konnten folgende Veränderungen beobachtet werden:

Eine Konzentration von 300 µg/ml führte nach 40 min zu erkennbaren Veränderungen der Zellen im Vergleich zum Normalzustand. Sie erschienen leicht abgerundet. Nach 90 min hatten sich alle Zellen abgelöst und vollständig abgerundet.

120 µg/ml führten nach 1 h zu ersten cytotoxischen Effekten, nach 3 h war keine Vitalität mehr festzustellen. Eine weitere Herabsetzung der Konzentration um 50 % (60 µg/ml) führte nach 7 h zu einem vollständigen Verlust der Zellvitalität.

Die Wirkung der *Fraktion B'-2* auf die Zellen war ebenfalls konzentrationsabhängig.

Eine Applikation von 100 µg/ml führte bereits nach 20 min zu cytotoxischen Effekten, eine Herabsetzung der Konzentration auf 50 µg/ml bewirkte morphologische Veränderungen nach 1 h, 25 µg/ml führten nach 2 h zu den entsprechenden Ergebnissen. Im Vergleich zur EtOAc-Fraktion führten aber alle 3 Konzentrationsstufen der Fraktion B'-2 auch nach 7 h nicht zu einem vollständigen Vitalitätsverlust.

Für alle getesteten Fraktionen bzw. Konzentrationen gilt, daß die Zellen nach 24 h nicht mehr vital waren. Ihr Erscheinungsbild war in deutlichem Unterschied zu den Kontrollzellen, die nach diesem Zeitraum keine morphologischen Veränderungen aufwiesen. Ein Vergleich mit dem reinen Lösungsmittel zeigte nach 24 h kaum erkennbare Veränderungen an den Zellen. In den Abbildungen 3.5 bis 3.7. sind die charakteristischen Veränderungen der Zellen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

3.4 Phytochemische Untersuchungen von *Casimiroa tetrameria*

3.4.1 Extraktion

Die getrocknete und pulverisierte Blattdroge wurden einer ethanolischen Heißextraktion unterzogen. Die Ausbeute der Extraktion betrug 23 %. Um eine Grobtrennung der Komponenten des Rohextrakts zu erreichen, wurde der Extrakt in Wasser suspendiert und zunächst mit Petrolether und im Anschluß daran mit EtOAc ausgeschüttelt. Für die resultierenden Fraktionen ergaben sich folgende Verhältnisse: Wasserphase : EtOAc-Phase : PE-Phase (73 : 9 : 18)

Nach der Grobfaktionierung erfolgte die Untersuchung der drei Fraktionen auf biologische Aktivität mit Hilfe des Testsystems USSING-Kammer. Es zeigte sich, daß die EtOAc-Fraktion über die höchste antisekretorische Aktivität verfügte. Da es Ziel war, neben den Hauptkomponenten des Extrakts auch die aktiven Inhaltsstoffe zu isolieren, wurde die EtOAc-Fraktion weiter phytochemisch untersucht. Es wurde eine Auf trennung erarbeitet, die an der Anreicherung der antisekretorischen Aktivität orientiert war. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 2.3.5 dargestellt.

3.4.2 Isolierung der Polymethoxyflavone

In Abbildung 3.8 ist die Vorgehensweise bei der Isolierung der Polymethoxyflavone, den biologisch aktiven Komponenten aus *Casimiroa tetrameria*, schematisch dargestellt.

Nach der Herstellung des ethanolischen Rohextrakts und dessen Grobfaktionierung wurden 9 g der antisekretorisch aktiven EtOAc-Fraktion mittels Sephadex® LH-20 fraktioniert. Dieser Trennungsschritt führte zu den 4 Hauptfraktionen A bis D. Dünnschicht-chromatographische Untersuchungen zeigten, daß Fraktion A vor allem Chlorophyll beinhaltete. Fraktion B, die die höchste antisekretorische Aktivität aufwies, enthielt als Hauptkomponenten mehrere lipophile Verbindungen. Nach Besprühen mit Anisaldehyd/H₂SO₄ färbten sich diese Verbindungen gelb. Anschließendes Erwärmen auf 100°C

führte zu einer Intensivierung der Färbung. Die Substanzen waren zu geringen Anteilen ebenso in Fraktion A und C zu finden.

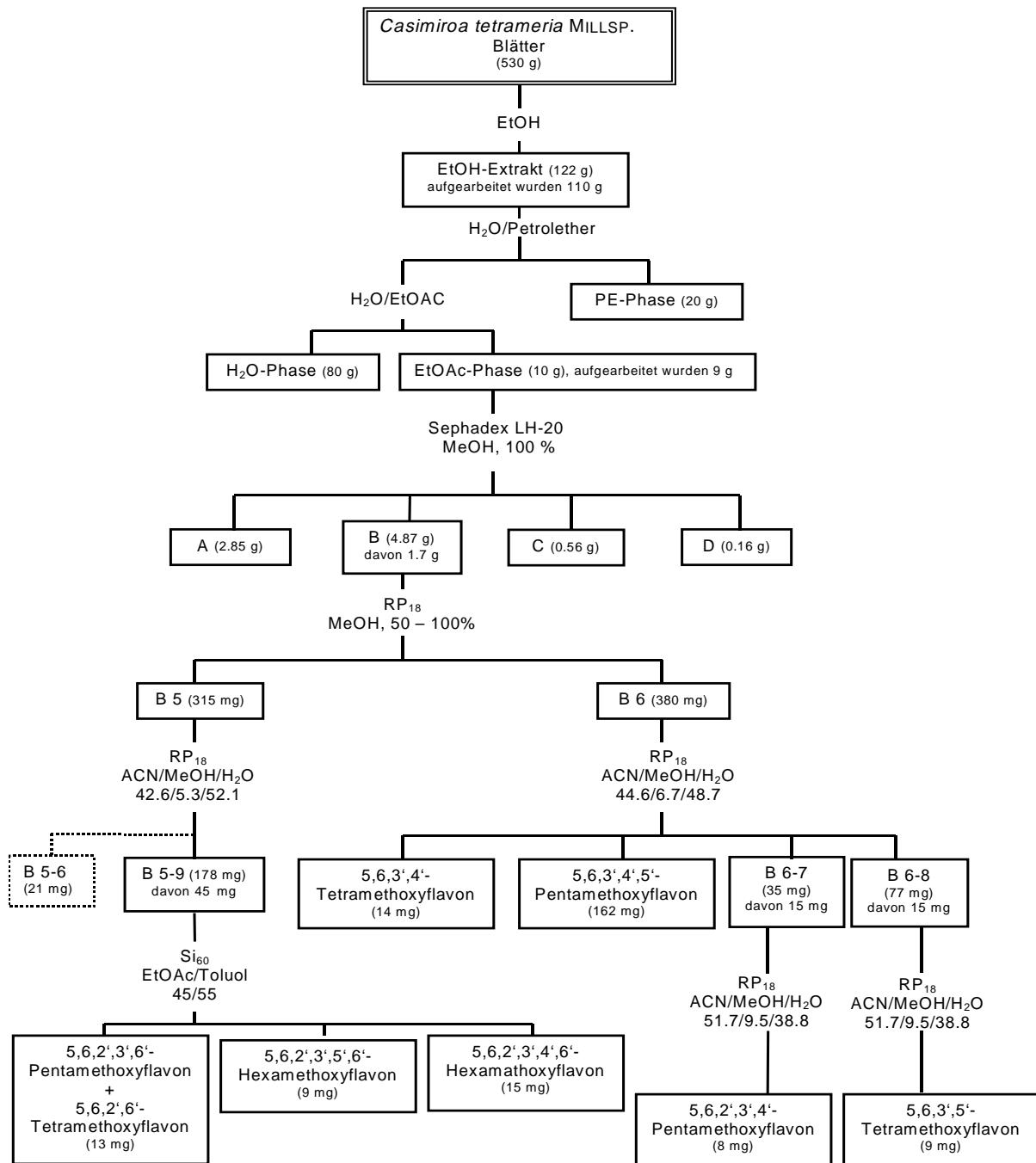


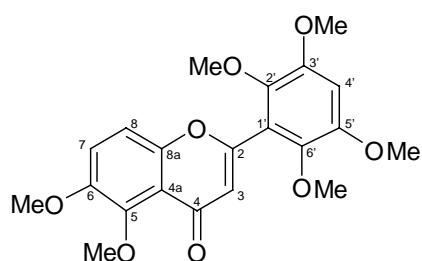
Abb. 3.8: Isolierungsschema der Polymethoxyflavone aus *Casimiroa tetrameria*

Letztere enthielt vor allem verschiedene Flavonoidglykoside, ebenfalls Hauptverbindungen der EtOAc-Fraktion. Die Fraktionen A und C wiesen jedoch keine bemerkenswerte antisekretorische Aktivität auf.

Um die Hauptverbindungen der aktiven Fraktion B aufzureinigen, wurde ein Teil der Fraktion mittels LPLC über RP₁₈-Material aufgetrennt. Die Trennung führte zur Aufteilung der lipophilen Hauptverbindungen auf die Fraktionen B5 und B6. Durch einen weiteren Trennungsschritt, nämlich die separate Fraktionierung von B5 und B6 mittels MPLC und unterschiedlichen ACN/MeOH/H₂O-Mischungen (Abb. 3.8), konnte die Abtrennung sämtlicher anderer Verbindungen erreicht werden. Dies resultierte zum einen in Fraktion B5-9, die insgesamt 4 der relevanten Verbindungen enthielt. Zum anderen konnten durch die Fraktionierung von B6 zwei der lipophilen Verbindungen als Reinsubstanzen erhalten werden. Diese wurden mittels NMR-Spektroskopie bzw. Massenspektrometrie als 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon und als 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon identifiziert. Die Isolierung der verbleibenden Polymethoxyflavone war mit Hilfe der HPLC möglich. Die bereits erwähnte Fraktion B5-9, die 4 der Flavone enthielt, konnte über Kieselgel aufgetrennt werden. Diese Trennung führte zur Isolierung von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon und 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon und einer Mischfraktion, die zu 83 % aus 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und zu 17 % aus 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin) bestand. Des Weiteren konnten durch die separate Aufarbeitung der Fraktionen B6-7 und B6-8 mittels HPLC die Verbindungen 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon und 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon als Reinsubstanzen erhalten werden.

3.4.3 Identifizierung der Verbindungen

3.4.3.1 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon



Bei der Verbindung 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon handelt es sich um einen *neuen Naturstoff*. Die Aufklärung der Struktur erfolgte mit Hilfe der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie.

Das EI-MS zeigt bei m/z 402 (96) ein Signal, das dem Molekülion $[\text{M}]^{+*}$ zuzuordnen war. Dies entspricht der Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$. Der base peak ist bei m/z 387 zu finden. Die Größe des abgespaltenen Bruchstücks entspricht $\cdot\text{CH}_3$ und weist auf die Eliminierung einer Methylgruppe hin, die bevorzugt das Flavonoidgrundgerüst verläßt. Dies wurde als Hinweis auf eine OCH_3 -Gruppe an Position C-6 des Flavonoids gesehen (DREYER und BERTELLI, 1967). Ein zusätzlicher Beleg für die relativ selten vorkommende Methoxylierung an Position C-6 sind die Bruchstücke bei m/z 165 (15) und 137 (15). Sie stellen Signale dar, wie sie bei einer Fragmentierung von 5,6-methoxylierten Flavonen nach dem Retro-Diels-Alder-Mechanismus für den A-Ring zu erwarten sind. Das Fragment mit m/z 165 entspricht dem A-Ring nach Abspaltung einer Methylgruppe an C-6, das Bruchstück mit m/z 137 stellt das Produkt nach der anschließenden CO-Eliminierung dar (Abb. 3.9; MEYER et al., 1985).

Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (Abb. 9.1) zeigt 4 Signale im Bereich der aromatischen Protonen (6.29 ppm bis 7.26 ppm) und 4 weitere Signale, die insgesamt 6 OCH_3 -Gruppen zuzuordnen sind (3.75 ppm bis 3.98 ppm). Die beiden Protonensignale im Tieffeld bei 7.18 und bei 7.26 ppm spalten sich jeweils zu einem Dublett auf mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz. Deutlich ist der Dacheffekt der beiden Doublets zu sehen. Die relativ geringe Differenz in der chemischen Verschiebung der beiden Doublets und die große Kopplungskonstante des AB-Systems zeigen, daß zwei Protonen in ortho-Stellung beteiligt sein müssen, die eine nahezu identische chemische Umgebung aufweisen. Die Signale wurden, ausgehend von einer Flavonoidgrundstruktur, den Protonen an C-7 und C-8 zugeordnet. Das exakte Substitutionsmuster des A-Rings wurde mittels eines ^1H - ^1H -NOESY-Spektrums (Abb. 9.2) nachgewiesen. Es zeigt eine deutliche Wechselwirkung zwischen dem Proton, dessen Signal bei 7.26 ppm erscheint und der OCH_3 -Gruppe mit dem Signal bei 3.91 ppm, die demnach an Position C-6 zu finden sein mußte. Ein weiterer cross-peak zwischen dem Signal dieser Methoxygruppe und dem 3-Protonen-Singulett bei 3.98 ppm belegte eine Methoxylierung an C-5. Weiter zeigt der Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten der isolierten Verbindung mit den Daten der Vergleichssubstanz 5,6,2',6'-Tetra-methoxyflavon (Zapotin), die uns freundlicherweise von Prof. WOL-

LENWEBER, Darmstadt zu Verfügung gestellt wurde, eine nahezu vollständige Übereinstimmung bezüglich der Verschiebungen der C-Atome des A-Rings (Tab. 3.7).

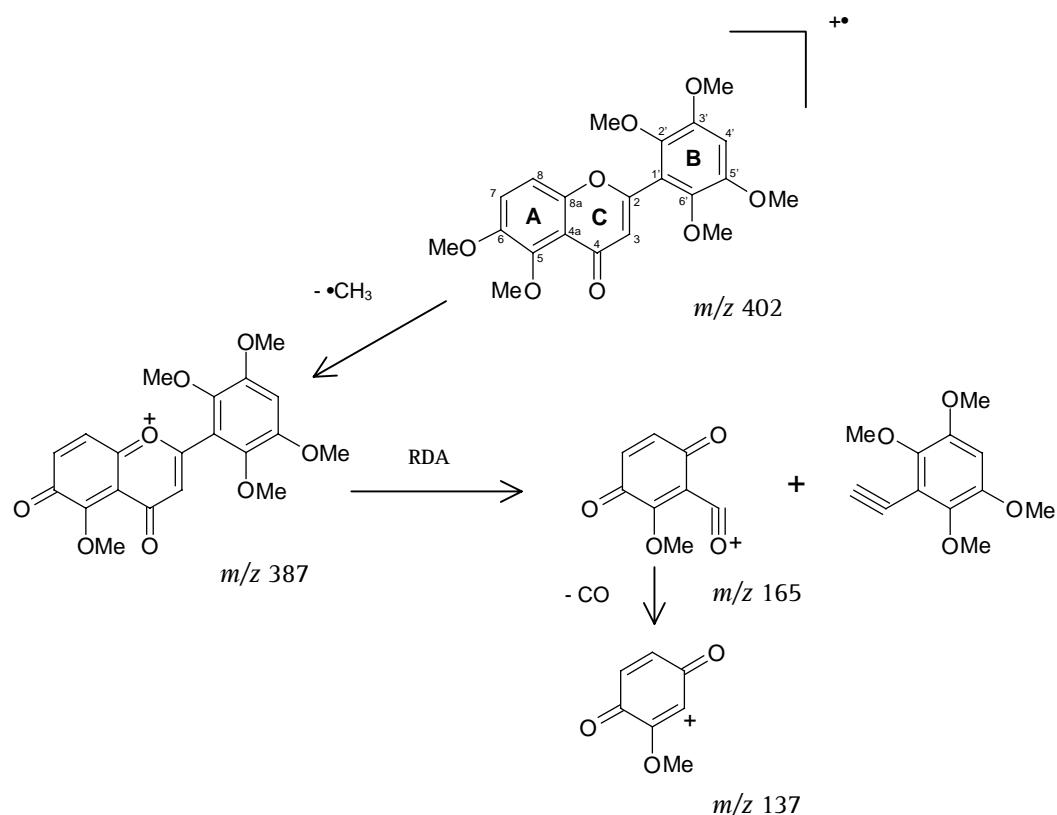


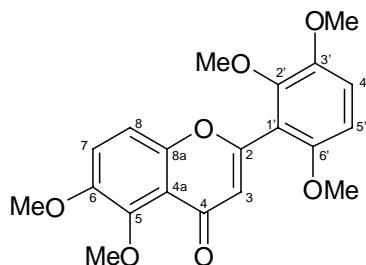
Abb. 3.9: Hauptfragmente der Polymethoxyflavone; Bsp.: 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon

RDA = Retro-Diels-Alder

Die Zuordnung der Signale für die Substituenten am B- und am C-Ring erfolgte ebenfalls mittels des ^1H - ^1H -NOESY-Spektrums. Die beiden Signale bei 6.29 ppm und 6.67 ppm waren jeweils einem einzelnen Proton zuzuordnen. Die beiden anderen Signale mit der Verschiebung 3.75 ppm und 3.88 ppm entsprachen jeweils zwei identischen OCH_3 -Gruppen. Das Spektrum zeigt für das Proton, dessen Signal bei 6.67 ppm erscheint eine intensive Wechselwirkung mit den beiden Methoxygruppen, deren Signal bei 3.88 ppm zu finden ist. Daher mußte gefolgert werden, daß das Singulett dem Proton an C-4' zuzuordnen ist und das Signal bei 3.88 ppm den beiden Methoxygruppen an C-3' und C-5'. Unterstützt wird diese Annahme durch die Korrelation, die zwischen den beiden OCH_3 -Signalen zu erkennen ist. Demnach entspricht das Signal bei 3.75 ppm OCH_3 -2' und OCH_3 -6'. Das Singulett bei 6.29 ppm zeigt eine schwächere Korrelation mit dem OCH_3 -Signal bei 3.75 ppm. Daher wurde es dem Proton an C-3 zugeordnet, das den beiden

identischen OCH_3 -Gruppen an C-2' und C-6' - bedingt durch die freie Drehbarkeit des B-Rings - benachbart ist. Damit ist die Struktur als bewiesen zu sehen.

3.4.3.2 Mischung aus 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)



Bei der Hauptkomponente 5,6,2',3',6'-Pentamethoxymethoxyflavon, die zu 83 % in der Mischung vorlag, handelt es sich ebenfalls um einen *neuen Naturstoff*. Die Aufklärung der Struktur der neuen Verbindung erfolgte mit Hilfe der ^1H -NMR- bzw. ^{13}C -NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie.

Das Massenspektrum zeigt ein intensives Signal bei m/z 372 (81), das dem Molekülion $[\text{M}]^{+*}$ entspricht. Dies stimmte mit der Summenformel $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$ überein. Das Signal des base peaks erscheint bei m/z 357. Vergleichbar mit 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon wies die Differenz zwischen Molekülion und base peak auf die Eliminierung einer Methylgruppe hin, die leicht vom Flavonoidgrundgerüst abgespalten wird. Dies wurde wiederum als Hinweis auf eine OCH_3 -Gruppe an Position C-6 des Flavonoids gesehen (DREYER und BERTELLI, 1967). Gestützt wird diese Substitution am C-6 durch die auch hier auftretenden Signale bei m/z 165 (19) und m/z 137 (19) (MEYER et al., 1985).

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 9.3) weist 5 Signale im Bereich der aromatischen Protonen auf (6.27 ppm bis 7.26 ppm) und 5 Signale (3.73 ppm bis 3.97 ppm), die Methoxygruppen zugeordnet wurden. Wie im Spektrum von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon spalten sich die beiden Protonensignale, die am weitesten tieffeldverschoben sind - bei 7.18 ppm und 7.26 ppm - jeweils zum Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz auf. Zusammen bilden sie ein AB-System mit einem deutlichen Dacheffekt. Diese Konstellation ist identisch mit den entsprechenden Signalen, die im Spektrum von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon den Protonen an C-7 und C-8 zugeordnet wurden. Die Signale der

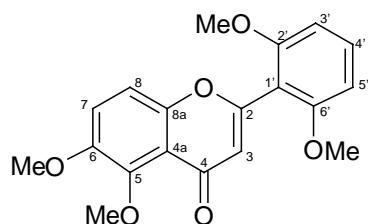
Methoxygruppen an Position C-5 und C-6 des A-Rings erscheinen bei 3.97 ppm und 3.91 ppm. Die eindeutige Zuordnung erfolgte durch ein ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum (Abb. 9.4). Dieses zeigte eine deutliche Korrelation zwischen dem Signal der OCH_3 -Gruppe bei 3.91 ppm und dem Protonensignal bei 7.26 ppm. Demnach ist das Signal bei 3.91 ppm OCH_3 -6 zuzuordnen. Das Protonensignal steht für H-7. Ein zusätzlicher cross peak zwischen dem Signal von OCH_3 -6 und dem OCH_3 -Signal bei 3.97 ppm zeigte, daß es sich bei letzterem um das Signal der Methoxygruppe an C-5 handelte. Neben dem bereits erwähnten base peak bei m/z 357 [M – 15] ** diente ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten des A-Rings mit den entsprechenden Werten der 5,6-methoxylierten Vergleichssubstanz 5,6,2‘,6‘-Tetramethoxyflavon (Zapotin) als weiterer Beleg für die Methoxylierung an den Positionen 5 und 6. Die Daten der beiden Verbindungen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung (Tab. 3.7).

Die beiden Protonensignale bei 6.65 und 6.98 ppm zeigen ebenfalls jeweils eine Aufspaltung zum Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz. Es handelte sich demnach um die Signale von zwei vicinalen Protonen am B-Ring. Die Position derselben konnte zum einen durch das dazugehörige ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum belegt werden, zum anderen durch einen Vergleich der gemessenen Verschiebungen mit den nach den Inkrementregeln berechneten theoretischen Verschiebungen. Im NOESY-Spektrum sind cross peaks zu erkennen zwischen dem Dublett bei 6.98 ppm und dem Signal einer Methoxygruppe bei 3.85 ppm und zwischen dem Protonensignal bei 6.65 ppm und dem OCH_3 -Signal, das am weitesten ins Hochfeld verschoben ist (3.73 ppm). Dieses Signalmuster belegte eine Substitution mit H-Atomen an C-4‘ und C-5‘ und damit einhergehend OCH_3 -Gruppen an C-2‘, C-3‘ und C-6‘. Die Abschätzung der chemischen Verschiebungen mit Hilfe des Inkrementsystems ergibt eine Hochfeld-Verschiebung eines Protonensignals mit einer OCH_3 -Gruppe in para-Stellung. Daher wurde das Signal bei 6.65 ppm dem Proton an C-5‘ zugeordnet. Die Zuordnung der verbleibenden Signale erfolgte über die entsprechenden ^1H - ^1H -Korrelationen. H-Atome an C-5‘ und C-6‘ konnten für diese Verbindung durch den direkten Vergleich der entsprechenden NMR-Daten von 5,6,2‘,3‘,4‘-Pentamethoxyflavon (Af-2; Kap. 3.4.3.6) ausgeschlossen werden. Das verbleibende OCH_3 -Signal, das keine Korrelation zu anderen Protonen aufwies, war der Methoxygruppe an C-2‘ zuzuordnen.

Das Protonensingulett bei 6.27 ppm wurde H-3 zugeordnet. Dies war in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur zur Untersuchung über die Verschiebung dieses Signals in Abhängigkeit des Substitutionsmusters am B-Ring (TANAKA et al., 1986).

Somit konnte die Struktur vollständig belegt werden.

Die Nebenkomponente der Fraktion wurde als 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin) identifiziert.

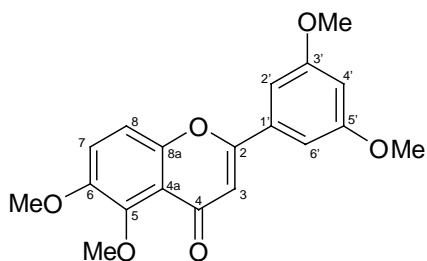


Die Identifizierung der Verbindung, die zu 17 % in der Mischfraktion vorlag, erfolgte durch den direkten Vergleich mit dem ^1H -NMR- und dem ^{13}C -NMR-Spektrum der Referenzsubstanz, die als reine Verbindung zur Verfügung stand (Prof. WOLLENWEBER, Darmstadt) bzw. mit ^1H -NMR-Daten aus der Literatur.

KINCL et al. erwähnten 1956 erstmals die Isolierung des Tetramethoxyflavons Zapotin aus den Samen von *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. (Rutaceae), einer *C. tetrameria* nahe verwandten Art. Eine korrekte Strukturaufklärung gelang DREYER UND BERTELLI (1967). Bestätigt wurde deren Strukturvorschlag durch entsprechende Synthesen von Zapotin (DATTA et al., 1969; FARKAS et al., 1968) und die spektroskopische Vermessung der Syntheseprodukte.

Die gemessenen ^1H -NMR-Daten der Verbindung stimmten mit den Literaturwerten (DREYER und BERTELLI, 1967; GARRATT et al., 1967) überein. Ebenso war mit dem Vergleichsspektrum der Referenzsubstanz eine sehr gute Übereinstimmung festzustellen, was die vorgeschlagenen Struktur eindeutig belegte.

3.4.3.3 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin)



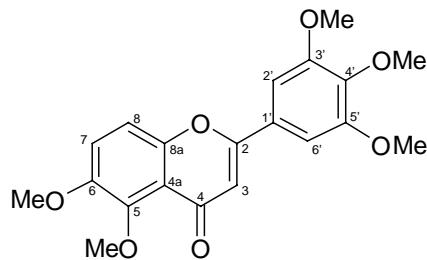
5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon wurde bereits von DOMÍNGUEZ et al. (1972) aus Sproß und Blättern von *Sargentia greggii*, Rutaceae isoliert, jedoch nicht ausführlicher charakterisiert, sondern durch einen Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit einer synthetisch hergestellten Referenz (DREYER, 1968) identifiziert. Die Struktur der aus *C. tetrameria* isolierten Verbindung wurde durch ^1H -NMR- bzw. ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie aufgeklärt, da die publizierten Daten unvollständig sind.

Das EI-MS zeigt ein Signal bei m/z 342 (53), welches dem Molekülion $[\text{M}]^{+*}$ entspricht und in Übereinstimmung mit der empirischen Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$ war. Der base peak liegt bei m/z 327 $[\text{M}-15]^{+*}$ und weist auf die Methoxylierung am C-6 des A-Rings hin, vergleichbar mit dem entsprechenden Signal des base peaks von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon und 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon. Bei m/z 165 (5) und 137 (13) sind die entsprechenden Signale für die Fragmente des 5,6-methoxylierten A-Rings zu finden (Abb. 3.9).

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 9.5) der Verbindung zeigt 5 Protonensignale im aromatischen Bereich (zwischen 6.58 ppm und 7.30 ppm) und 3 Signale (zwischen 3.85 ppm und 3.95 ppm), die insgesamt 4 OCH_3 -Gruppen zuzuordnen waren. Die Signale der Protonen an C-7 bzw. C-8 bei 7.30 ppm bzw. 7.28 ppm spalten jeweils zu einem Dublett auf und stellen ein AB-System dar. Durch die sehr geringe Differenz in den Verschiebungen im Vergleich zu den entsprechenden Signalen bei 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon und 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und dem extremen Dacheffekt waren die beiden Doublets nur mittels einer Dehnung als solche zu identifizieren. Die Signale bei 3.95 ppm und 3.91 ppm wurden, belegt durch Korrelationen mit dem AB-System, wie sie im ^1H - ^1H -NOESY zu sehen sind, den Methoxygruppen an Position 5 und 6 zugeordnet.

Das Dublett bei 6.99 ppm, $J = 2.3$ Hz, das zwei Protonen in einer chemisch identischen Umgebung entsprach, die mit einem Proton in meta-Stellung koppelten, wurde den Substituenten an den Positionen C-2' und C-6' am B-Ring des Flavonoidgrundgerüstes zugeordnet. Dementsprechend wurde das Triplet bei 6.58 ppm, $J = 2.3$ Hz einem Proton an Position 4' zugeordnet. Das Signal bei 3.85 ppm entsprach den Methoxygruppen an den Positionen C-3' und C-5'. Belegt wurde dieses Substitutionsmuster am B-Ring ebenfalls durch das ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum, das Wechselwirkungen zeigte zwischen den OCH_3 -Gruppen bei 3.85 ppm und sowohl den beiden Protonen bei 6.99 ppm als auch dem einzelnen Proton bei 6.58 ppm. Das verbleibende Protonensignal bei 6.63 ppm wurde folglich dem H-Atom an C-3 zugeordnet. Diese Zuordnung wird gestützt durch die Untersuchung von TANAKA et al. (1986). Hier wird Flavonen, die an Position 3' und 5' methoxiliert sind für das Proton an Position 3 eine Verschiebung von 6.78 ppm zugeordnet. Die ^{13}C -Daten der C-Atome 5 bis 8 und der OCH_3 -Gruppen an C-5 und C-6 stimmten mit den Daten einer authentischen Probe von 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin) überein (Tab. 3.7). Übereinstimmung herrschte auch bezüglich der ^1H -NMR-Daten des mittels Synthese erhaltenen Cerrosillins (DREYER, 1968), mit Ausnahme einer Abweichung von 0.1 ppm für das AB-System.

3.4.3.4 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B)

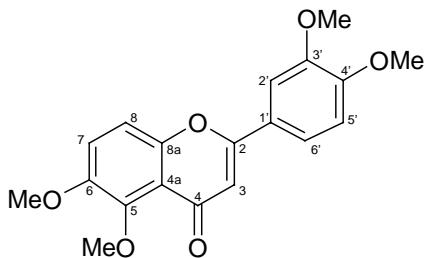


5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B) wurde bereits aus den Blättern von *Sargentia greggii* S. WATTS (Rutaceae) isoliert (DOMÍNGUEZ et al., 1976), jedoch sind die vorliegenden Daten unvollständig. Die Strukturaufklärung der Verbindung erfolgte mittels ^1H -NMR- bzw. ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

Das zugehörige Massenspektrum zeigt eine große Übereinstimmung mit dem Spektrum der Verbindung 5,6,2‘,3‘,6‘-Pentamethoxyflavon. So wurde das Signal bei m/z 372 (96) dem Molekülion $[M]^{+•}$ zugeordnet. Dies entspricht der Summenformel $C_{20}H_{20}O_7$. Der base peak liegt bei m/z 357 und belegt eine Abspaltung von $\cdot CH_3$ aus der Methoxygruppe am C-6. Des weiteren war bei m/z 165 (19) das Signal für ein charakteristisches Produkt des A-Rings aus der Retro-Diels-Alder-Reaktion zu finden. Das Bruchstück bei m/z 137 (58) entspricht dem Fragment, das aus einer zusätzlichen CO-Abspaltung resultiert (Abb. 3.9). Das 1H -NMR-Spektrum der Verbindung (Abb. 9.6) zeigt 4 Signale im Bereich der aromatischen Protonen (zwischen 6.60 ppm und 7.30 ppm) und 4 Signale, die insgesamt 5 Methoxygruppen (zwischen 3.90 ppm und 3.96 ppm) entsprachen. Die Protonensignale bei 7.30 ppm und 7.28 ppm spalten jeweils zum Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz auf. Sie bilden das für die Protonen an C-7 und C-8 eines 5,6-methoxylierten Flavonoids charakteristische AB-System. Dementsprechend wurden die Signale bei 3.96 ppm und 3.92 ppm den OCH_3 -Gruppen an C-5 und C-6 zugeordnet. Belegt wurde diese Zuordnung indirekt zum einen durch den Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte mit den entsprechenden Verschiebungen bei der Vergleichssubstanz 5,6,2‘,6‘-Tetramethoxyflavon (Zapotin; Tab. 3.7). Zum anderen zeigt ein ^{13}C - 1H -COSY-Spektrum Korrelationen zwischen den entsprechenden Signalen für die beiden Methoxygruppen im 1H -NMR-Spektrum und den ^{13}C -Werten, die C-5 und C-6 zugeordnet wurden. Das Signal bei 6.60 ppm wurde als Singulett eines einzelnen Protons dem H-Atom an der Position C-3 zugeordnet. Dies war in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur (TANAKA et al., 1986). Das Signal bei 7.08 ppm, das für 2 chemisch identische Protonen stand und keine Kopplungen mit weiteren Protonen zeigte, wurde den Substituenten der Positionen C-2‘ und C-6‘ zugewiesen. Die verbleibenden Signale von Methoxygruppen gehörten demnach zur OCH_3 -Gruppe an Position C-4‘ (3.90 ppm) und zu den beiden chemisch identischen OCH_3 -Gruppen an C-3‘ und C-5‘ (3.93 ppm).

Ein Vergleich der publizierten 1H -NMR-Daten für Cerrosillin B (DOMÍNGUEZ et al., 1976) stimmte mit den Daten des 1H -NMR-Spektrums der aus *C. tetrameria* isolierten Verbindung überein. Des weiteren konnte die Substitution des B-Rings durch den Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten für die Positionen C-2‘ bis C-6‘ der isolierten Verbindung mit denen vergleichbarer Strukturen (KINOSHITA und FIRMAN, 1997; IINUMA et al., 1992; JOSEPH-NATHAN und SANTILLAN, 1984) bestätigt werden.

3.4.3.5 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1)



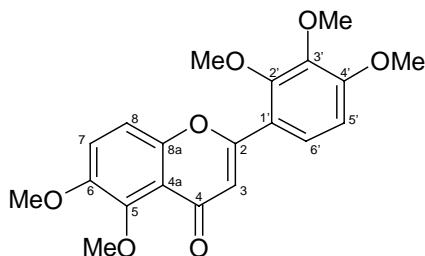
Die isolierte und als 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon identifizierte Verbindung wurde in den Zweigen von *Ardisia floribunda* WALL in ROXB. (Myrsinaceae) nachgewiesen und als Af-1 bezeichnet (PARVEEN und KHAN, 1987). Die Aufklärung der Struktur erfolgte hier durch ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie.

Das Massenspektrum der Verbindung war bezüglich seiner Hauptsignale identisch mit dem Spektrum von 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin). Das Signal bei m/z 342 (83) wurde dem Molekülion $[\text{M}]^{+*}$ zugeordnet. Die Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$ konnte damit bestätigt werden. Das Signal des base peaks war bei m/z 327 zu finden, was der Abspaltung der Methylgruppe aus der OCH_3 -Gruppe an Position C-6 entspricht. Die beiden charakteristischen Fragmente des A-Rings (Abb 3.9) werden durch die Signale bei m/z 165 (18) und 137 (21) repräsentiert.

Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (Abb. 9.7) zeigt insgesamt 6 Signale aromatischer Protonen (zwischen 6.60 ppm und 7.51 ppm) und 4 Signale zwischen 3.92 ppm und 3.96 ppm, die auf das Vorhandensein von 4 Methoxygruppen hinweisen. Die Signale bei 7.30 ppm und 7.28 ppm bilden das für die Protonen an Position C-7 und C-8 charakteristische AB-System mit einem extrem ausgeprägten Dacheffekt. Entsprechend wurden zwei der Signale der OCH_3 -Gruppen (3.961 ppm und 3.92 ppm) den Substituenten an C-5 und C-6 zugewiesen. Die Zuordnung konnte durch die Aufnahme eines ^1H - ^1H -NOESY belegt werden, in dem eine Korrelation zwischen dem Signal bei 3.92 ppm und dem AB-System zu sehen ist, was eine direkte Nachbarschaft der zugehörigen Substituenten am A-Ring belegte. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten des A-Rings mit denen der Referenzsubstanz Zapotin diente als zusätzlicher Beleg für das vorgeschlagene Substitutionsmuster (Tab. 3.7). Die verbleibenden Signale - mit Ausnahme des Singuletts bei 6.60 ppm - wurden den Substituenten am B-Ring zugeordnet. Das Signal bei 7.33 ppm spaltet zum Dublett

mit $J = 2.3$ Hz auf. Es sollte demnach in meta-Position zu dem Proton mit dem Signal bei 7.51 ppm zu finden sein, welches zum Doppeldublett aufspaltete ($J = 2.3$ Hz und $J = 9$ Hz). Vicinal zu diesem musste das Proton mit dem Signal bei 6.95 ppm und $J = 9$ Hz stehen. Ausgehend von diesem Signalmuster ist es eindeutig, daß das Doppeldublett dem Proton an C-6' zuzuordnen ist, entsprechend das Signal bei 6.95 ppm dem Substituenten an C-5' und das ins Tieffeld verschobene Dublett dem Proton an C-2'. Die exakte Zuordnung der OCH₃-Signale erfolgte mittels eines ¹H-¹H-NOESY. Dessen Spreizung zeigte Korrelationen zwischen dem OCH₃-Signal bei 3.959 ppm und dem Dublett des Protons an C-2' und zwischen dem Signal der Methoxygruppe bei 3.94 ppm und dem Dublett des Protons am C-5'. Das verbleibende Protonensingulett bei 6.60 ppm entspricht dem H-3. Ein Vergleich der ¹H-NMR-Daten der aus *C. tetrameria* stammenden Verbindung mit den publizierten Daten für die Verbindung aus *A. floribunda* zeigte sehr gute Übereinstimmung, was die vorgeschlagene Struktur zusätzlich belegte.

3.4.3.6 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2)



Ebenso wie die Verbindung Af-1 wurde Af-2 aus den Zweigen von *Ardisia floribunda* WALL in ROXB. (Myrsinaceae) isoliert (PARVEEN und KHAN, 1987).

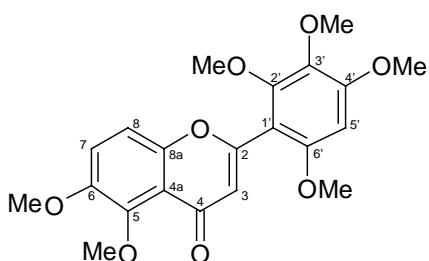
Das Massenspektrum der aus *C. tetrameria* isolierten Verbindung zeigt das Signal für [M]⁺ bei *m/z* 372 (94), was mit der Summenformel C₂₀H₂₀O₇ in Übereinstimmung war. Des weiteren war das Spektrum in seinen Hauptfragmenten identisch mit dem EI-MS von 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon. Der base peak war, wie bei den beiden anderen Pentamethoxyflavonen bei *m/z* 357 zu finden, bedingt durch die Abspaltung einer Methylgruppe aus der OCH₃-Gruppe an C-6. Außerdem zeigt das MS

bei m/z 165 (65) und 137 (61) die zu erwartenden Signale, die den Fragmenten des A-Rings, wie sie aus der Retro-Diels-Alder-Reaktion hervorgehen, entsprechen (Abb. 3.9).

Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung (Abb. 9.8) zeigt 5 Signale im aromatischen Bereich (6.76 ppm bis 7.49 ppm) und die Signale für 5 Methoxygruppen (3.89 ppm bis 3.96 ppm). Die Signale bei 7.27 ppm und 7.23 ppm erscheinen jeweils als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz. Sie bilden das charakteristische AB-System der beiden Protonen an C-7 und C-8. Die Signale bei 3.96 ppm und bei 3.909 ppm wurden den OCH_3 -Gruppen an C-5 und an C-6 zugeordnet, was durch ein ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum belegt wurde. Dieses Spektrum zeigte eine deutliche Wechselwirkung zwischen dem Proton mit der Verschiebung 7.27 ppm und der Methoxygruppe mit dem Signal bei 3.909 ppm, was die direkte Nachbarschaft dieser beiden Substituenten belegte. Außerdem sind im ^1H -NMR-Spektrum zwei weitere Protonensignale bei 6.76 ppm und bei 7.49 ppm zu sehen, die ebenfalls jeweils zum Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 9$ Hz aufspalten. Es handelte sich hierbei um zwei Protonen am B-Ring in ortho-Position. Ob diese Protonen an Position 4' und 5' oder an Position 5' und 6' zu finden waren, konnte mit dem dazugehörigen ^1H - ^1H -NOESY aufgeklärt werden. Das Spektrum zeigt einen cross peak zwischen dem Protonensignal bei 6.76 ppm und dem Signal einer OCH_3 -Gruppe bei 3.912 ppm. Eine Signalverstärkung zwischen dem Protonensignal bei 7.49 ppm und dem Signal einer weiteren OCH_3 -Gruppe ist nicht zu sehen, so daß dieses Signal einem Proton an Position C-6' zugeordnet wurde und das weiter ins Hochfeld verschobene Dublett dem Proton an C-5'. Die Methoxygruppe mit dem Signal bei 3.912 war demnach an Position C-4' zu finden. Das verbleibende Protonensingulett bei 6.81 ppm wurde dem H-Atom an C-3 zugewiesen. Dieses Signal zeigt außerdem eine relativ schwache Korrelation mit dem 3-Protonensignal bei 3.92 ppm. Entsprechend wurde dieses Signal der OCH_3 -Gruppe an Position C-2' zugeordnet, da nur eine Methoxygruppe an dieser Position, bedingt durch die relative räumliche Nähe auf Grund der Drehbarkeit des B-Rings, eine Wechselwirkung mit H-3 anzeigen kann.

Ein Vergleich der gemessenen ^1H -NMR- und MS-Daten mit den in der Literatur zitierten Werten zeigte eine sehr gute Übereinstimmung. Des weiteren konnte die vorgeschlagene Struktur durch den Vergleich der gemessenen ^{13}C -NMR-Werte für C-2 bis C-8 (Tab. 3.7) mit den entsprechenden Werten der Referenzsubstanz Zapotin bestätigt werden.

3.4.3.7 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon



5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon wurde bereits aus den Wurzeln von *Sargentia greggii* (Rutaceae) isoliert (MEYER et al., 1985).

Das EI-MS der aus den Blättern von *C. tetameria* isolierten Verbindung zeigt ein Signal bei m/z 402 (23), das dem Molekülion $[M]^+$ zugeordnet wurde. Das Spektrum stimmte bezüglich seiner Hauptsignale mit dem EI-MS der Verbindung 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon sehr gut überein. Der base peak liegt bei m/z 387, was dem Molekül nach der Abspaltung einer Methylgruppe an C-6 entspricht. Die Fragmente mit m/z 165 (17) und 137 (15) entsprechen den Produkten des A-Rings nach der Retro-Diels-Alder-Reaktion (Abb. 3.9).

Im ^1H -NMR-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 9.9) sind insgesamt 4 Protonensignale im aromatischen Bereich (6.26 ppm bis 7.26 ppm) und 6 Signale von OCH_3 -Gruppen (3.77 ppm bis 3.96 ppm) zu erkennen. Zwei der Protonensignale, bei 7.26 ppm und 7.18 ppm, bilden das für die Protonen an C-7 und C-8 charakteristische AB-System aus. Den Substituenten an den Positionen C-5 und C-6 am A-Ring wurden die Methoxygruppen mit den Signalen bei 3.96 ppm und 3.90 ppm zugewiesen. Dieses Substitutionsmuster des A-Rings konnte durch ein ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum belegt werden. Dieses zeigt eine deutliche Signalverstärkung zwischen dem Dublett bei 7.26 ppm und dem Signal der OCH_3 -Gruppe bei 3.90 ppm, was für eine direkte Nachbarschaft dieser beiden Substituenten am A-Ring spricht. Ein weiterer Beleg für die vorgeschlagene Struktur war der Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten des A-Rings der Verbindung mit den entsprechenden Daten einer 5,6-methoxylierten Vergleichssubstanz - 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin) - die nahezu vollständig in Übereinstimmung waren. Die beiden verbleibenden Protonensingulets mußten zum einen einem H-Atom an C-3, zum anderen einem H-Atom an C-5' oder C-6' des B-Rings zugehörig sein. Für die eindeutige Zuordnung war wiederum das ^1H - ^1H -

NOESY wesentlich, des weiteren ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte des B-Rings mit entsprechenden Literaturdaten (IINUMA et al., 1984). Das NOESY zeigte eine deutliche Korrelation zwischen dem Protonensingulett bei 6.31 ppm und den Signalen der beiden direkt benachbarten OCH_3 -Gruppen bei 3.92 ppm und 3.77 ppm. Entsprechend wurde das Protonensignal dem Substituenten an Position C-5' zugeordnet. Das OCH_3 -Signal bei 3.77 ppm zeigt außerdem noch einen schwächeren cross peak zum zweiten Protonensingulett bei 6.26 ppm, das dem Proton an C-3 zugeordnet wurde. Das 3-Protonen-Signal bei 3.77 ppm entspricht daher der Methoxygruppe an C-6', da diese - bedingt durch die Drehbarkeit des B-Rings - in Nachbarschaft zu H-3 treten kann. Die Zuordnung der beiden verbleibenden OCH_3 -Signale bei 3.82 ppm und 3.88 ppm erfolgte mit der Hilfe des NOESY. Das Signal bei 3.88 ppm zeigte eine schwache Korrelation mit dem Protonensingulett des H-3. Diese Signalverstärkung ist für die Methoxygruppe an C-2' möglich, da für sie dieselben Bedingungen gelten wie für $\text{OCH}_3\text{-}6'$. Das 3-Protonensignal bei 3.82 ppm entspricht $\text{OCH}_3\text{-}3'$.

Ein Vergleich der MS- und der ^1H -NMR-Daten mit den vorliegenden Literaturwerten (MEYER et al., 1985) bestätigte das vorgeschlagene Substitutionsmuster.

Position der OCH ₃ -Gruppen / C-Atom	5,6,2',3',5',6'	5,6,2',3',6'	5,6,3',5'	5,6,3',4',5'	5,6,3',4'	5,6,2',3',4'	5,6,2',3',4',6'	5,6,2',6' *
C-2	158.55	158.54	161.46	161.50	161.66	159.79	158.55	158.54
C-3	114.49	115.24	108.42	107.83	107.07	111.68	115.22	115.37
C-4	177.84	178.03	178.17	178.05	178.05	178.41	178.14	178.03
C-5	148.13	148.59	148.02	148.01	148.11	148.07	148.09	148.11
C-6	149.95	149.84	150.08	150.09	150.06	149.88	149.77	149.84
C-7	113.64	113.71	113.56	113.46	113.42	113.39	113.66	113.81
C-8	119.19	119.15	119.19	119.03	119.03	119.15	119.09	119.08
C-4a	119.47	119.51	119.35	119.23	119.30	119.28	119.43	119.51
C-8a	152.38	152.56	151.62	151.55	152.02	153.14	152.58	152.56
OCH ₃ -5	61.98	61.97	61.98	61.95	61.98	61.98	61.96	61.97
OCH ₃ -6	57.34	57.37	57.26	57.22	57.30	57.36	57.37	57.41

Tab. 3.7: Vergleich der ¹³C-NMR-Daten des A- und C-Rings der isolierten Polymethoxyflavone; Verschiebungen in ppm (gemessen in CDCl₃);

* = Referenzsubstanz Zapotin (Prof. WOLLENWEBER, Darmstadt)

3.4.4 Isolierung der Flavonoidglykoside

In Abb. 3.10 sind die Schritte, die zur Isolierung von vier Flavonoidglykosiden führten, schematisch dargestellt. Bei dieser Gruppe von Hauptinhaltsstoffen der EtOAc-Fraktion konnte keine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

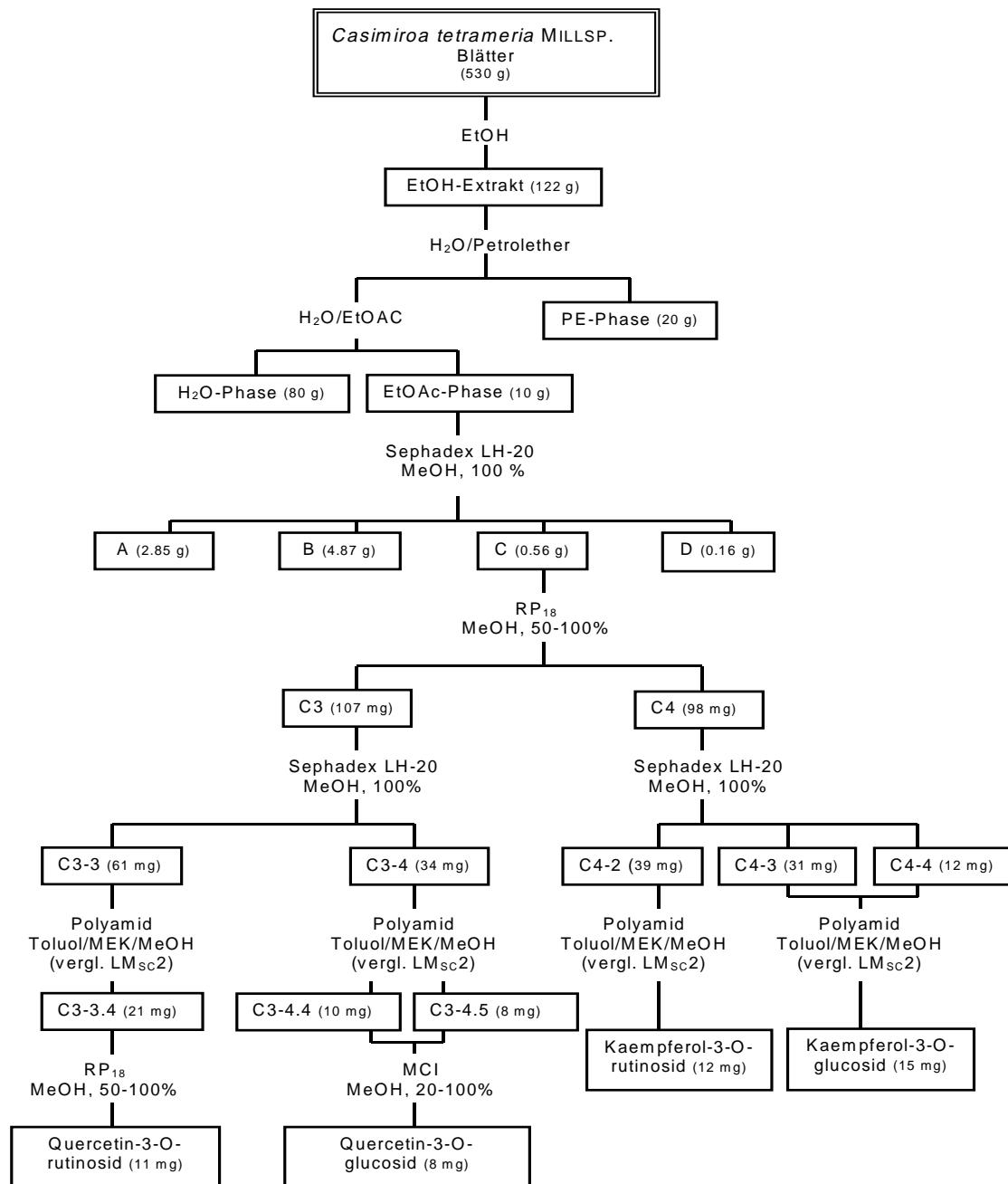


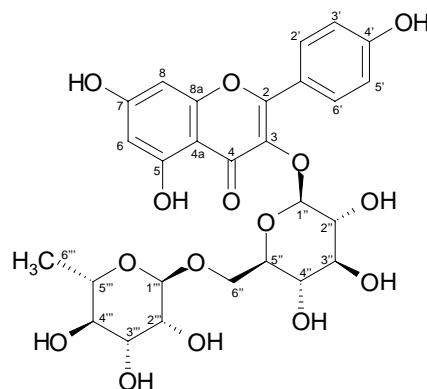
Abb. 3.10: Isolierung der Flavonoidglykoside aus *Casimiroa tetrameria*

Neben den Polymethoxyflavonen, die vornehmlich in Fraktion B enthalten waren, wurden vier Flavonoidglykoside isoliert. Diese konnten insbesondere in Fraktion C nachgewiesen werden. Bereits die dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen ergaben Hinweise auf die Zugehörigkeit zu dieser Stoffgruppe. Die Überprüfung von Fraktion C zeigte, daß sich diese Verbindungen nach Besprühen mit Naturstoffreagenz gelb bzw. orange färbten. Dies war ein Hinweis darauf, daß es sich um Flavonoide handelte, die zum einen vermutlich in Position C-3' und C-4' (2 orange gefärbte Banden) bzw. Position C-4' (2 gelb gefärbte Banden) hydroxyliert sind (MARKHAM, 1982). Die Elution der Fraktion C über RP₁₈ ermöglichte die Abtrennung der beiden am B-Ring dihydroxylierten Komponenten von den beiden monohydroxylierten Verbindungen.

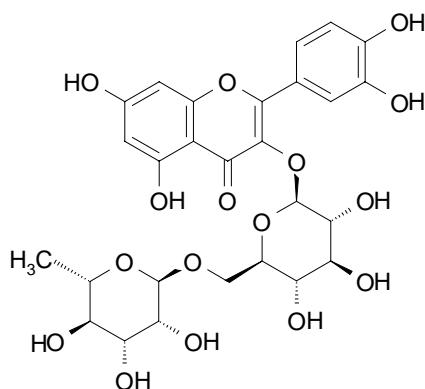
Die Fraktionen C3 (orange färbende Komponenten) und C4 (gelb färbende Komponenten) wurden separat weiter aufgearbeitet. Mittels einer zweiten Trennung über Sephadex® LH-20 war es möglich, die beiden Hauptverbindungen aus Fraktion C3 bzw. C4 teilweise voneinander zu trennen. Die Fraktionen, die jeweils eines der Flavonoidglykoside und weitere Verunreinigungen enthielten, wurden über Polyamid eluiert.

Die beiden mit Naturstoffreagenz sich gelb färbenden Verbindungen konnten in Form von Reinsubstanzen abgetrennt werden. Die Komponente aus Fraktion C4-2 wurde als Kaempferol-3-O-rutinosid identifiziert. Aus den Fraktionen C4-3 und C4-4, die gemeinsam aufgearbeitet wurden, wurde Kaempferol-3-O-glucosid isoliert. Aus den Fraktionen C3-3.4 und C3-4.4 bzw. C3-4.5 wurden, nach jeweils einem weiteren Reinigungsschritt ebenfalls ein Mono- und eine Diglykosid isoliert. Die Substanz aus den Fraktionen C3-4.4 bzw. C3-4.5, die durch eine orange gefärbte Bande charakterisiert war und durch die Elution über MCI-Gel vollständig aufgereinigt werden konnte, wurde als Quercetin-3-O-glucosid (Isoquercitrin) identifiziert. Bei der vierten Hauptverbindung aus Fraktion C, die über RP₁₈ aus C3-3.4 isoliert wurde, handelte es sich um Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin).

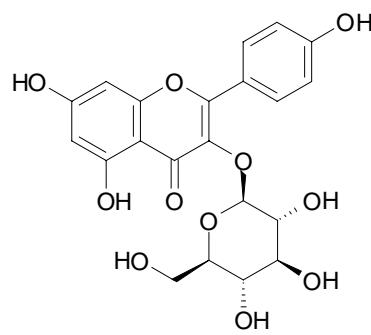
3.4.5 Identifizierung der Verbindungen



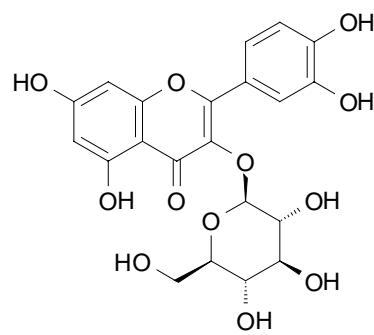
Kaempferol-3-O-rutinosid



Quercetin-3-O-rutinosid



Kaempferol-3-O-glucosid



Quercetin-3-O-glucosid

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und durch Vergleiche mit entsprechenden Literaturdaten. Bei Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) konnte die Struktur zusätzlich durch den Vergleich mit einer authentischen Probe mit Hilfe einer GC-Additionsanalyse belegt werden.

Durch die Aufnahme von UV-Spektren konnte zunächst gezeigt werden, daß es sich zum einen um zwei Derivate des Kaempferols handelte ($\text{UV}_{(\text{LMHPLC})} \lambda_{\max}: 266/347$) bzw. um zwei Quercetinderivate ($\text{UV}_{(\text{LMHPLC})} \lambda_{\max}: 257/357$; MABRY et al., 1970). Belegt wurde dies außerdem durch die charakteristischen Anfärbungen der Verbindungen mit Naturstoff-Reagenz (MARKHAM, 1982) und durch die Signale der jeweiligen Aglyka in den entsprechenden Massenspektren, die als base peaks zu erkennen waren. Für die Kaempferolderivate erschien das Signal bei m/z 286, für die Quercetinderivate bei m/z 302.

Durch die Aufnahme von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bzw. jeweils eines $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ konnte zum einen die Struktur der Aglyka bestätigt werden, zum anderen war es möglich die Anzahl

und die Art der Zuckermoleküle und deren Position am Aglykon zu bestimmen. Die ^1H -NMR-Signale der 4 Glykoside, die für die Aufklärung der Struktur entscheidend waren sind in Tabelle 3.8 vermerkt.

Position H-Atom	Kaempferol-3-O-glucosid	Kaempferol-3-O-rutinosid	Quercetin-3-O-glucosid	Quercetin-3-O-rutinosid
H-6	6.19, d, $J = 2.3$ Hz	6.20, d, $J = 2.3$ Hz	6.18, d, $J = 2.5$ Hz	6.18, d, $J = 2.3$ Hz
H-8	6.38, d, $J = 2.3$ Hz	6.40, d, $J = 2.3$ Hz	6.36, d, $J = 2.5$ Hz	6.36, d, $J = 2.3$ Hz
H-2'	8.04, d, $J = 9$ Hz	8.05, d, $J = 9$ Hz	7.7, d, $J = 2.3$ Hz	7.66, d, $J = 2.3$ Hz
H-3'	6.88, d, $J = 9$ Hz	6.88, d, $J = 9$ Hz		
H-5'	6.88, d, $J = 9$ Hz	6.88, d, $J = 9$ Hz	6.86, d, $J = 8.3$ Hz	6.86, d, $J = 9$ Hz
H-6'	8.04, d, $J = 9$ Hz	8.05, d, $J = 9$ Hz	7.58, dd, $J = 2.3;$ 8.3 Hz	7.62, dd, $J = 2.3;$ 9 Hz
H-1''	5.23, d, $J = 7.5$ Hz	5.12, d, $J = 7.5$ Hz	5.22, d, $J = 7.5$ Hz	5.08, d, $J = 7.5$ Hz
H-6''A	3.68, dd, $J = 3;$ 12 Hz		3.70, dd, $J = 2.4;$ 11.9 Hz	
H-6''B	3.52, dd, $J = 6;$ 12 Hz		3.57, dd, $J = 5.3;$ 12 Hz	
H-1'''		4.50, d, $J = 2.3$ Hz		4.51, d, $J = 2.3$ Hz
CH ₃ -6'''		1.11, d, $J = 6$ Hz		1.12, d, $J = 6$ Hz

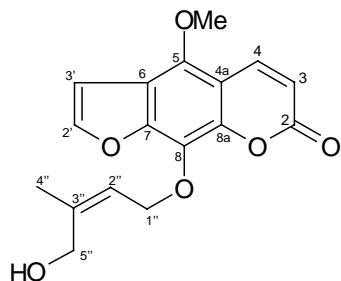
Tab. 3.8: Vergleich der charakteristischen ^1H -NMR-Daten der isolierten Flavonoidglykoside;
(Verschiebungen in ppm, gemessen in CD₃OD)

Die Protonen der Aglyka weisen die charakteristischen Signalmuster auf. Die Zuckerprotonen der Glykoside konnten, soweit möglich, mit Hilfe des jeweiligen ^1H -NMR- und des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums zugeordnet werden. Die Tatsache, daß es sich um 3-O-Glykoside handelt, kann mit dem jeweiligen Signal des H-1'' belegt werden. Dieses erscheint bei allen 4 Verbindungen als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J = 7.5$ Hz. Bei einer 7-O-Glykoslierung erscheint das Signal des H-1'' in Form eines Multipletts. Die Kopplungskonstante weist außerdem darauf hin, daß die Glucose β -glykosidisch gebunden ist (MABRY et al., 1970). Bestätigt wurden die Strukturen durch den Vergleich mit Literaturdaten (STRACK et al., 1989; PARKER und BOHM, 1974).

3.4.6 Isolierung des Furanocumarins

Die Isolierung des Furanocumarins erfolgte aus der aktiven Fraktion B, die mittels LPLC über RP₁₈-Material aufgetrennt wurde. Die Verbindung wurde aus der unter anderem erhaltenen Fraktion B5 aufgereinigt. Nach einer Fraktionierung von B5 mit Hilfe der MPLC wurde aus der daraus resultierenden Fraktion B5-6 (vgl. Abb. 3.8) mittels HPLC die Reinsubstanz 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxypsoralen abgetrennt.

3.4.7 Identifizierung der Verbindung



Bei der beschriebenen Verbindung handelt es sich um einen *neuen Naturstoff*. Die Struktur der Verbindung wurde mit Hilfe der ¹H-NMR- und der ¹³C-NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie ermittelt.

Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 9.10) zeigt 4 Protonensignale im aromatischen Bereich (6.27 bis 8.11 ppm). Jeweils zwei dieser Signale bilden ein AB-System. Zusammen gehören zum einen die beiden Doublets (*J* = 10 Hz) mit der Verschiebung 6.27 ppm und 8.11 ppm, zum anderen die Doublets (*J* = 3 Hz) bei 6.98 ppm und 7.61 ppm. Aufgrund des vorliegenden Signalmusters im Tieffeldbereich konnte von der Grundstruktur eines linearen Furanocumarins ausgegangen werden. Die Protonensignale, die den benachbarten H-Atomen an C-3 und C-4 zugeordnet werden, weisen eine relativ große Differenz in ihren Verschiebungen auf (6.27 ppm und 8.11 ppm), bedingt durch die sehr unterschiedliche chemische Umgebung (Lactongruppe an C-2). Zwischen diesen beiden Signalen befinden sich die Peaks für die Protonen an C-2' und C-3' des Furancyclen (7.61 ppm und 6.98 ppm). Die starke Tieffeldverschiebung des Signals für H-4 war ein Hinweis für eine Substitution an C-5 (RAZDAN et al., 1987; HARKAR et al., 1984). Das ¹H-NMR zeigt ein Si-

gnal für eine OCH_3 -Gruppe bei 4.16 ppm. Dieses Signal wurde dem Substituenten am C-5 zugeordnet. Die Bestätigung der Zuordnung dieser Signale erfolgte zum einen durch den Vergleich der Daten mit entsprechenden Literaturwerten vergleichbarer Verbindungen mit dem identischen Grundkörper (MASUDA et al., 1998; BERGENDORFF et al., 1997; RAZDAN et al., 1987; HARKAR et al., 1984). Zum anderen belegte die Aufnahme eines ^1H - ^1H -NOESY (Abb. 9.11) die direkte Nachbarschaft der am jeweiligen AB-System beteiligten Protonen. Des weiteren war eine Korrelation zwischen dem Signal des Protons an C-3' bzw. C-4 und dem Signal der Methoxygruppe zu erkennen. Die verbleibenden ^1H -NMR-Signale zwischen 1.85 ppm und 5.71 ppm repräsentierten den Substituenten an C-8. Das vorliegende Signalmuster wies die charakteristischen peaks eines Prenylrestes auf. Das Protonensignal bei 5.71 ppm, das zum Triplet aufspaltet ($J = 7.5$ Hz) und ein Dublett ($J = 7.5$ Hz) bei 4.86 ppm, das für zwei Protonen in identischer Umgebung steht, wurden zum einen dem einzelnen Proton an C-2'', zum anderen den beiden Protonen am benachbarten C-1'' zugewiesen. Bestätigt wurde diese Zuordnung wiederum durch das ^1H - ^1H -NOESY. Das Spektrum zeigt eine Korrelation zwischen den entsprechenden Signalen. Weitere cross peaks ermöglichen die Zuordnung der verbleibenden Signale bei 4.24 ppm (zwei Protonen mit chemisch identischer Umgebung) und 1.85 ppm (Methylgruppe). Es ist eine Wechselwirkung zu erkennen zwischen dem Proton an C-2'' und der CH_3 -Gruppe, was auf eine cis-Stellung dieser Substituenten hinweist. Außerdem zeigt das Dublett bei 4.86 ppm eine Korrelation mit dem Signal bei 4.24 ppm, was die cis-Positionierung dieser beiden Substituenten belegt. Eine Korrelation zwischen dem Signal der CH_3 -Gruppe und dem CH_2 -Signal belegt deren direkte Nachbarschaft. Basierend auf diesem Strukturvorschlag konnten mit Hilfe des dazugehörigen ^{13}C - ^1H -COSY (Abb. 9.12) und entsprechender Literaturdaten (RAZDAN et al., 1987; HARKAR et al., 1984) die ^{13}C -NMR-Signale zugeordnet werden.

Das EI-MS bestätigt die vorgeschlagene Struktur. Das Molekülion $[\text{M}]^+$ mit m/z 316 ist im Spektrum lediglich schwach zu sehen, da das Gesamt molekül sehr instabil ist und durch die Abspaltung des Prenylrests zu 5-Methoxy-8-hydroxypsoralen abgebaut wird (Abb. 3.11). Dieser Schritt erklärt den base peak bei m/z 232. Ein weiteres Signal bei m/z 216 (98) entspricht dem substituierten Psoralen nach einer zusätzlichen $\cdot\text{CH}_3$ -Abspaltung aus der Methoxygruppe am C-5. Durch die Abspaltung von CO aus dem demethylierten Grundgerüst lässt sich das Signal bei m/z 189 (32) erklären. Auch das UV-Spektrum der

Verbindung lässt sich durch die Struktur linearer Furanocumarine erklären. Diese zeigen meist 4 Maxima (RAZDAN et al., 1987), deren Bereiche mit den Maxima der isolierten Verbindung ($\text{UV}_{(\text{LMHPLC})}\lambda_{\text{max.}} = 224/246/266/314$) übereinstimmen. Die Auswertung der gemessenen Daten zusammen mit den Vergleichen mit entsprechenden Werten aus der Literatur bestätigten eindeutig die vorgeschlagene Struktur.

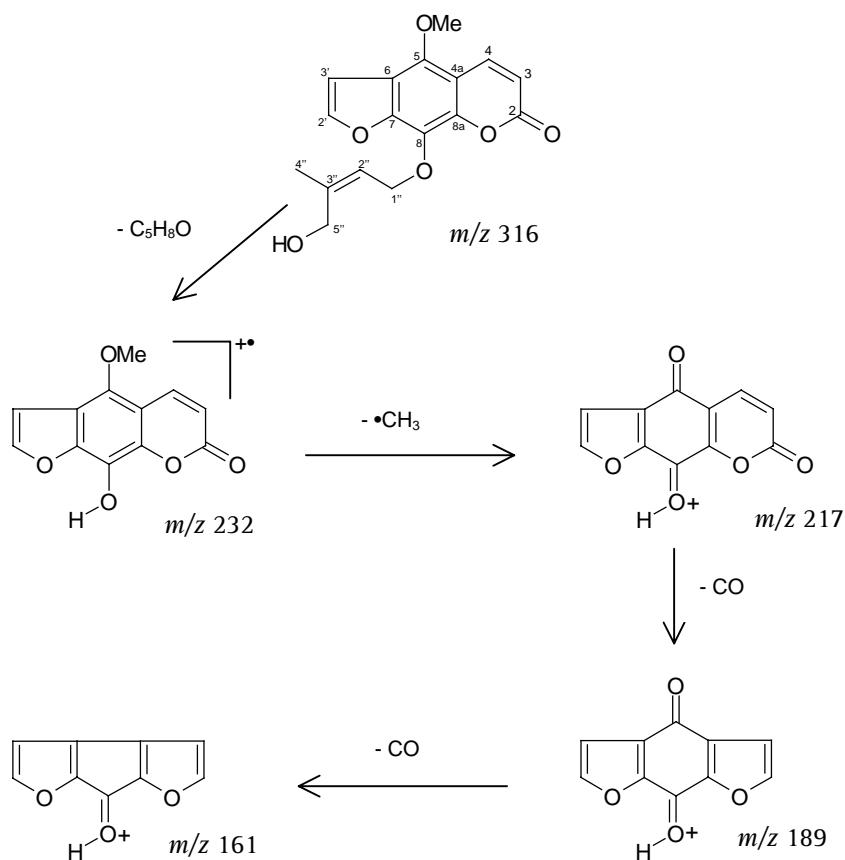


Abb. 3.11 Hauptfragmente von 5-Methoxy-8-(5'-hydroxy)-prenyloxypsonalen

3.5 Biologische Wirksamkeit einer Teezubereitung von *Casimiroa tetrameria*

Da die Durchführung einer ethanolischen Heißextraktion nicht der Art der Teezubereitung der Maya-Indianer der Halbinsel Yucatán entspricht, wurde ein Decocat hergestellt in Anlehnung an deren traditionelle Zubereitung. Zu diesem Zweck wurden 15 getrocknete Teilblätter, was einem Trockengewicht von 5.9 g entsprach, in destilliertem Wasser extrahiert. Das gefriergetrocknete Filtrat dieses Extrakts ergab eine Ausbeute von 1.38 g (23%). Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten, das der so hergestellte Tee unter anderem ein aus der EtOAc-Fraktion isoliertes Polymethoxyflavon enthielt. Um diese Verbindung möglichst abzutrennen und zu identifizieren, wurden 300 mg des wässrigen Extrakts über RP₁₈ mittels VLC (LM_{VLC}2) eluiert. Das Ergebnis der Trennung ist in Tab. 3.9 dargestellt.

Fraktion (Elutionsschritt)	H ₂ O	10% MeOH	20% MeOH	30% MeOH	40% MeOH	50% MeOH	60% MeOH	<u>80%</u> MeOH	MeOH
Ausbeute [mg]	211.6	17.5	15.5	15.2	14.6	7.6	4.1	<u>6.6</u>	2.5

Tab. 3.9: Auftrennung der Teebereitung über RP₁₈ mittels VLC; Ausbeuten in [mg]
— = Polymethoxyflavone enthaltende Fraktion

Das polymethoxilierte Flavon war, zusammen mit geringen Mengen zweier weiterer Substanzen dieses Typs in der Fraktion enthalten, die mit 80% MeOH eluiert wurde. Ein Vergleich der R_f-Werte und der UV-Spektren der Verbindungen mit den entsprechenden Daten der isolierten Polymethoxyflavone und eine mittels HPLC durchgeführte Additionsanalyse zeigte, daß es sich bei der Hauptkomponente dieser Fraktion um 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B) handelt. Die beiden anderen Substanzen wurden als 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1) und 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2) identifiziert. Cerrosillin B war zu 58% enthalten, Af-1 zu 17% und Af-2 zu 6%.

Die Teezubereitung wurde sowohl bezüglich ihrer antisekretorischen Aktivität in der Ussing-Kammer untersucht als auch auf ihre kontraktionsinhibierenden Eigenschaften am isolierten Meerschweinchen-Ileum. Für die Testung der sekretionshemmenden Wirkung am Epithel des distalen Kaninchencolons wurden 500 µg/ml des Extrakts (gelöst in H₂O)

serosal eingesetzt. Die Applikation der Probe führte zu einer Reversion der PGE₂-induzierten Cl⁻-Sekretion um 34 % ± 4 % innerhalb von 30 min.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Teezubereitung am isolierten Meerschweinchen-Ileum sind in Abb. 3.12 dargestellt.

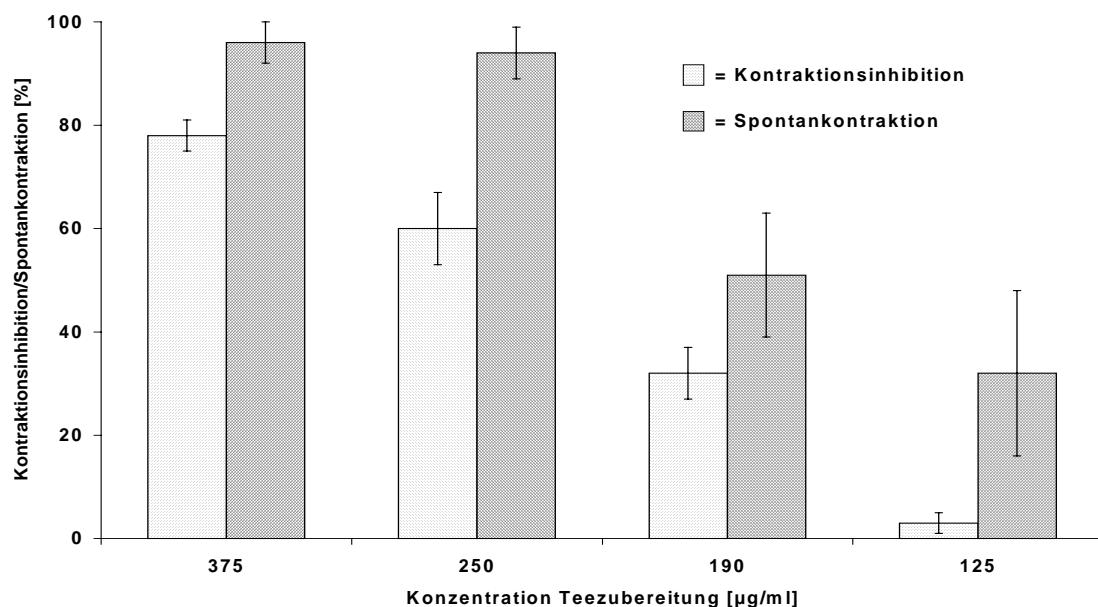


Abb. 3.12: Dosisabhängigkeit der Kontraktionsinhibition bzw. der Induktion von Spontankontraktionen durch die Teezubereitung; Histaminkonzentration: 1 µM;
Anzahl der durchgeführten Versuche: n = 3 (je Konzentration)

Zunächst wurde mit einer Konzentration von 500 µg/ml Extrakt gearbeitet. Die Applikation dieser Dosis führte zu einer sofortigen Spontankontraktion des Darmstücks, die in ihrer Stärke der Reaktion entsprach, wie sie durch Histamin (1 µM) ausgelöst wird (100 %-Wert). Es erfolgte keine Entspannung des Organs. Im weiteren Verlauf wurden Konzentrationen eingesetzt, bei welchen keine oder nur eine geringfügige Dauerkontraktion beobachtet werden konnte. Abb. 3.12 verdeutlicht, daß bei der Teezubereitung von *C. tetrameria* eine Dosisabhängigkeit der biologischen Wirkung nachzuweisen ist, sowohl bezüglich der Kontraktionsinhibition als auch der Kontraktionsinduktion. Das Maß der Relaxation des Muskels nach Probenzugabe war gleichfalls konzentrationsabhängig. Bei einer Zugabe von 125 µg/ml erfolgte eine komplette Relaxation, bei 375 µg/ml war eine Restkontraktion des Darmstücks von 23 % ± 5 % nachzuweisen.

4 Diskussion

Eine an der antisekretorischen Aktivität orientierte Fraktionierung des ethanolischen Rohextrakts von *Casimiroa tetrameria* führte zur Isolierung von Polymethoxyflavonen, die eine Gruppe von Hauptinhaltsstoffen dieser Blattdroge repräsentierten. Zwei dieser Verbindungen – 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon – wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Die Flavone zeigten alle ein verhältnismäßig ungewöhnliches Substitutionsmuster am A-Ring, eine Methoxylierung an C-5 und C-6. Diese Verbindungen passen sehr gut in das Flavonoidmuster der Rutaceae. Für diese Familie sind Flavonoide charakteristisch, die durch weitgehende oder vollständige Methylierung der OH-Gruppen lipophil werden (HEGNAUER, 1973). Bedingt durch ihre unpolaren Eigenschaften treten sie beispielsweise in den *Citrus*-Früchten nicht in den Zellsaftvakuolen, sondern in deren lysigenen Exkretträumen auf (WALTER et al., 1966). Am A-Ring an Position 5 und 6 methoxylierte Flavone wurden bisher aus *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. (GARRATT et al., 1967; KINCL et al., 1956;) und aus *Sargentia greggii* S. WATTS (MEYER et al., 1985; DOMÍNGUEZ et al., 1972), beides Rutaceae, isoliert, des weiteren auch aus *Ardisia floribunda* WALL in ROXB. (Myrsinaceae; PARVEEN und KHAN, 1987). Höher methoxylierte Flavone konnten beispielsweise in den Gattungen *Citrus* und *Murraya* nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, daß diese lipophilen Verbindungen neben den Exkretträumen auch im Korkgewebe gefunden werden können oder in der Cuticula (HEGNAUER, 1973), so vermutlich auch bei *C. tetrameria*.

Für Flavonoide wurden in einer Vielzahl verschiedener *in vitro*-Untersuchungen eine große Anzahl biologisch-pharmakologischer Wirkungen nachgewiesen (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1994; HAVSTEEN, 1983). Am intensivsten untersucht ist das Flavonol Quercetin, das sich in zahlreichen Testsystemen als aktiv erwies (DI CARLO et al., 1992). Trotz des breiten Spektrums der aus dieser Naturstoffgruppe untersuchten Verbindungen wurden bisher keine biologisch-pharmakologischen Wirkungen von 5,6-methoxylierten Flavonen, wie sie auch aus *C. tetrameria* isoliert wurden, nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die isolierten Polymethoxyflavone im Modellsystem USSING-Kammer am Colonepithel des Kaninchens eine bemerkenswerte antisekretorische Aktivität aufweisen. Die Untersuchung von Fraktionen, die die Flavone in unterschiedlichen Zusammensetzungen enthielten, zeigte, daß – je nach Verhältnis und Struktur der

Verbindungen – eine Reversion der PGE₂-induzierten Cl⁻-Sekretion um bis zu 47 % hervorgerufen wird. Bewirkt wird dieser Effekt bei einer serosalen Konzentration von 25 µg/ml.

Eine Beeinflussung der Sekretionsvorgänge am Epithel durch Pflanzenextrakte bzw. Verbindungen mit einer vergleichbaren Struktur, zum Teil auch aus der Familie der Rutaceae wurde durch verschiedene Untersuchungen bereits belegt. So wurde beispielsweise für Ternatin, ein an Position 7 und 8 methoxyliertes Flavon aus *Egletes viscosa* LESS. (Asteraeae) in einem *in vivo*-System (durch Rizinusöl hervorgerufene Flüssigkeitssekretion bei Mäusen) eine Reduktion der Sekretion nachgewiesen (RAO et al., 1997). Eine Untersuchung der beiden lipophilen polymethoxylierten Flavone Tangeritin und Nobiletin aus *Citrus* in der USSING-Kammer zeigte, daß diese beiden Verbindungen die Cl⁻-Sekretion nicht inhibieren, sondern stimulieren (NGUYEN und CANADA, 1993). Diese Aktivierung der Sekretion erwies sich als synergistisch mit der Wirkung von Carbachol, nicht aber mit der von VIP (vasoactive intestinal peptide). Bei den Verbindungen handelt es sich ebenfalls um für die Rutaceae charakteristische Flavone. Diese sind jedoch am A-Ring im Vergleich zu den Flavonen aus *C. tetrameria* oder *E. viscosa* vollständig methoxyliert.

Insgesamt liegen – unter Einschluß dieser Arbeit – somit inzwischen mehrere sich ergänzende Untersuchungen zur Beeinflussung der Sekretion durch polymethoxylierte Flavone vor. Dieser Substanzgruppe kommt eine wesentliche Bedeutung bei der Erklärung der Wirksamkeit von Rutaceae bei Testsystemen den Bereich Gastrointestinaltrakt betreffend zu. Daneben gibt es experimentelle Belege zur antisekretorischen Wirkung nicht-methoxylierter Flavonoide (DI CARLO et al., 1992). So konnte unter anderem gezeigt werden, daß sowohl Kaempferol als auch Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) die durch Rizinusöl induzierte Flüssigkeitsakkumulation im Darmlumen bei Mäusen um 63 % bzw. um 68 % (Dosis: 100 mg/kg) reduzieren können. In diesem *in vivo*-System wurde nachgewiesen, daß die antisekretorische Aktivität Ca²⁺ - vermittelt ist. Die Fraktion des Extraks von *C. tetrameria*, die insgesamt 4 verschiedene Flavonoidglykoside, darunter Rutin enthielt, wies hingegen in der USSING-Kammer keine bemerkenswerte antisekretorische Aktivität auf. Der bei Reinsubstanzen im Vergleich zu den Polymethoxyflavon-Gemischen beobachtete Aktivitätsverlust ist ein interessanter, aber nicht leicht erklärbarer Befund. Es besteht zum einen die Möglichkeit synergistischer Effekte (WILLIAMSON, 1999) unter den einzelnen Flavonen, zum anderen können Löslichkeitsprobleme, wie sie Reinsubstanzen

ohne lösungsvermittelnde begleitende Verbindungen bisweilen aufweisen - und damit zusammenhängend - eine tatsächliche niedrigere Konzentration in der Lösung verantwortlich sein.

Diarrhoe ist zum einen bedingt durch eine erhöhte Sekretion von Wasser und Elektrolyten über das Darmepithel ins Darmlumen, zum anderen durch eine erhöhte Darmmotilität. Um den zweiten Aspekt zu berücksichtigen wurde der Rohextrakt von *C. tetrameria* auch auf seine spasmolytische Wirkung hin getestet. Zu diesem Zweck wurden der Rohextrakt und entsprechende Fraktionen auf die kontraktionsinhibierende Aktivität gegen die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen an der glatten Muskulatur des Meerschweinchen-Ileums untersucht. Es konnte sowohl für die Flavonoidglykoside als auch für die Polymethoxyflavone eine entsprechende biologische Aktivität nachgewiesen werden. Die Fraktion, die die 4 isolierten Glykoside und geringfügige Verunreinigungen enthielt, bewirkte bei einer Konzentration von 70 µg/ml eine Abschwächung der Histamin-induzierten Kontraktionen um etwa 50 %. Für die polymethoxylierten Flavone konnte eine beachtliche kontraktionsinhibierende Aktivität nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Mischfraktionen zeigte, daß eine Konzentration von jeweils 12.5 µg/ml zu einer Inhibition der Kontraktionen zwischen 64 und 88 % führte. Die Reinsubstanz Cerosillin B bewirkte bei dieser Konzentration (12.5 µg/ml bzw. 34 µM) eine Abschwächung um 79 %. Es liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor zur spasmolytischen Wirksamkeit von Flavonoiden an der glatten Muskulatur (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1994). So zeigten beispielsweise verschiedene Flavonoide (Quercetin, Fisetin, Tangeretin, Hesperitin, Naringin) in einer Konzentration von 10 - 50 µM eine bemerkenswerte Aktivität gegen die durch verschiedene Agonisten (Histamin, Acetylcholin, PGE₂) am isolierten Meerschweinchen-Ileum ausgelösten Kontraktionen (MACANDER, 1986). Es konnte eine strukturabhängige Aktivität nachgewiesen werden, die bei Quercetin, das auch *in vivo* kontraktionsinhibierend wirkt (MELI et al., 1990), den höchsten Wert zeigte. In einigen Untersuchungen konnte der inhibitorische Effekt der Flavonoide auf die Motilität in Zusammenhang gebracht werden mit der Verwendung bestimmter diese Inhaltsstoffe aufweisende Arzneipflanzen bei Diarrhoe (MECKES et al., 1998). *Conyza filaginoides* (D.C.) HIERON (Asteraceae) beispielsweise, eine Arzneipflanze, die in Mexiko bei gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt wird, zeigte am isolierten Ratten-Ileum kontraktionsinhibierende Aktivität. Diese Art enthält zum Teil Verbindungen wie sie auch aus *C. tetrameria*

isoliert werden konnten. Unter anderem Quercetin-3-O-glucosid, das die höchste biologische Aktivität zeigte (IC_{50} : 0.0016 µg/ml). Als nahezu ebenso aktiv erwies sich Rutin, gefolgt von Quercetin, Hyperin und Pinostrobin (MATA et al., 1994). Auch bei Ternatin lies sich eine kontraktionsinhibierende Aktivität nachweisen. Eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht führte bei Mäusen zu einer 31%-igen Inhibition (RAO et al., 1997).

Somit kommt, neben den sehr aktiven Polymethoxyflavonen den Flavonoidglykosiden, die in den USSING-Kammer-Experimenten nicht aktiv waren, eine Bedeutung bei der spasmolytischen Wirkung zu. Die sehr viel höher liegende Konzentration, die zu einer Inhibition der Kontraktion um 50 % führte, kann möglicherweise durch die Verunreinigung der Fraktion mit unbekannten Verbindungen begründet werden. Zum anderen ist über das Maß der spasmolytischen Aktivität der beiden Kaempferolglykoside, Kaempferol-3-O-glucosid und Kaempferol-3-O-rutinosid, im Vergleich zur Wirkung des Aglykons Kaempferol nichts bekannt.

Die Untersuchungen mit einem aus luftgetrockneter Droge hergestellten Tee führten zu überraschenden Ergebnissen. Dieses Decoct wurde in beiden Testsystemen auf biologische Aktivität hin untersucht. In der USSING-Kammer führte die Zugabe des Tee-Extrakts zur serosalen Seite des Epithels zu einer Reversion der PGE₂-induzierten Cl⁻-Sekretion um ein Drittel innerhalb von 30 min. Dies belegt, daß eine Teezubereitung, wie sie von den Maya Yucatáns hergestellt wird, eine antisekretorische Wirkung hat. Die Aktivität dieses wässrigen Extrakts ist vergleichsweise niedrig, da eine Extraktion der lipophilen Polymethoxyflavone in ausreichenden Mengen kaum zu erwarten war. Die vorhandene Aktivität kann vermutlich auf eine der Hauptkomponenten des ethanolischen Rohextrakts, Cerrosillin B zurückgeführt werden. Diese Verbindung wurde, zusammen mit geringeren Mengen zweier weiterer Polymethoxyflavone extrahiert.

Die Ergebnisse am Meerschweinchen-Ileum waren – obwohl es hierfür bereits Hinweise bei der Untersuchung des Rohextraktes gab – ebenfalls überraschend. Die Teezubereitung erwies sich am isolierten Meerschweinchen-Ileum als kontraktionsinhibierend, gleichzeitig aber wurden dosisabhängig starke, bisweilen anhaltende Kontraktionen ausgelöst. Diese Reaktion, so kann vermutet werden, ist auf die nicht identifizierten Verbindungen zurückzuführen, die auch für die Auslösung von Kontraktionen durch die wässrige Phase des Rohextrakts verantwortlich sind. Eine wesentliche Frage, die sich aus diesen Untersuchungen ergibt: Inwieweit ist es tatsächlich möglich, eine indigene Zubereitungsart im

Labor nachzustellen. Es liegen keine Daten zu den Unterschieden bei der Extraktion luftgetrockneter im Vergleich zu frischer Droege aus dieser Art vor.

Wesentlich für eine weiter gehende Diskussion ist die Frage nach der Resorbierbarkeit der Flavonoide. Am Beispiel Quercetin wird deutlich, daß Untersuchungen bezüglich der Bioverfügbarkeit und Metabolisierung nach wie vor zu widersprüchlichen Ergebnissen führen (GRAEFE et al., 1999). Generell haben Untersuchungen bezüglich der Resorption von Flavonen gezeigt, daß Flavonaglyka intakt resorbiert werden können, die Aufnahme von Flavonglykosiden hingegen kann nicht nachgewiesen werden (MERFORT und HEILMANN, 1998). Diskutiert wurde allerdings die Möglichkeit, daß Quercetinglykoside beispielsweise über einen Glucose-Transporter in die Enterozyten gelangen könnten und erst dort hydrolysiert werden (GEE et al., 1998). Dies zeigt aber, daß vor allem die Wirksamkeit der Metaboliten interessant wäre. Wichtig ist die Frage der Resorbierbarkeit insbesondere für die Untersuchung der antisekretorischen Aktivität in der USSING-Kammer, da die polymethoxylierten Aglykone lediglich bei einer serosalen Applikation eine bemerkenswerte Aktivität zeigten. Dies setzt eine Möglichkeit für die Verbindungen voraus, mit den Biomembranen in Wechselwirkung zu treten. So würden sie mittels Permeation ins Innere der Epithelzellen zu gelangen und damit möglicherweise zur serosalen Seite der Mucosa, den potentiellen Angriffsorten der Flavone. Die Beeinflussung unterschiedlicher zellulärer Prozesse, wie sie bei Flavonoiden nachgewiesen wurde, setzt in zahlreichen Fällen eine Wechselwirkung mit den Biomembranen bzw. dort gebundenen Enzymen voraus (HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON und KANDASWAMI, 1994) Die tatsächliche Fähigkeit verschiedener Verbindungen dieser Stoffgruppe, in Abhängigkeit ihrer Struktur mit Membranen zu interagieren wurde beispielsweise durch einen Versuch, der sich der Fluoreszenzlösung bedient, nachgewiesen. In diesem Fall war für die Lösung der Fluoreszenz einer in der Membran verankerten Substanz, Diphenylhexatrien (DPH) ein direkter Kontakt mit derselben, also ein Eindringen der Flavonoide in die Membran notwendig. Quercetin erwies sich als aktivste Verbindung, gefolgt von Chalcon, Fisetin und Tangeretin (PRICE und MIDDLETON, 1985).

Ergänzend zu den Untersuchungen der biologischen Aktivität wurde der Rohextrakt von *C. tetraptera* auf seine antimikrobielle Wirkung hin getestet. Hervorzuheben ist in diesem Rahmen die Wirksamkeit des Extraks gegen *Helicobacter pylori*, ein Organismus, der gegenwärtig in Klinik und Forschung stark an Bedeutung zunimmt. Die minimale Hemm-

konzentration (MIC) lag hier bei $3\mu\text{g}/\text{ml}$. Dieser Wert ist vergleichbar bzw. liegt sogar unter den entsprechenden Werten, wie sie in neueren Untersuchungen mit verschiedenen Pflanzenextrakten – beispielsweise *Allium sativum* und *Cinnamomum cassia* – nachgewiesen wurden (O'GARA et al., 2000; TABAK et al., 1999).

Bei der Untersuchung der Wirkungen einer Arzneipflanze sollte gleichzeitig die Cytotoxizität derselben untersucht werden. Für *C. tetrameria* hat sich bei HeLa-Zellen gezeigt, daß der Rohextrakt in einer Konzentration von $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ nach 5 h zumindest leichte Zellveränderungen hervor rief. Die Applikation einer polymethoxyflavonhaltigen Fraktion ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) führte bereits nach 20 min zu cytotoxischen Effekten. Dies steht im Gegensatz zu der Tatsache, daß im Verlauf sämtlicher durchgeföhrter physiologischer Experimente keine Schäden an den isolierten Geweben bzw. deren Funktion nachweisbar waren. Dennoch stellt dieser Aspekt der Untersuchungen die Verwendung der Arzneipflanze zum Teil in Frage. Er kann vielmehr als Bestätigung einer Aussage eines einzelnen Heilers gesehen werden, der *C. tetrameria* als toxisch einstuft und von deren Verwendung Abstand nimmt (ANKLI, pers. Mitteilung).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Untersuchungen erlauben es, naturwissenschaftliche Belege für die Wirkung der in indigenen Medizinsystemen eingesetzten Pflanzen zu erhalten und die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe zu charakterisieren. Dies kann kein Beleg für die *klinische Wirksamkeit* derartiger Arzneipflanzen sein. Vielmehr sind Studien, wie sie in dieser Dissertation durchgeföhrt wurden, ein wesentlicher Beitrag zur Ethnopharmakologie. Die Verwendung von *Casimiroa tetrameria* MILLSP. bei Beschwerden des Gastrointestinaltrakts, besonders bei Diarrhoe kann durch die aktivitätsorientierte Fraktionierung und damit einhergehend der Isolierung sowohl antisekretorisch als auch spasmolytisch aktiver Verbindungen gestützt werden, wobei die Ergebnisse der Cytotoxizitätsuntersuchungen in jedem Fall berücksichtigt werden müssen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit wesentliche Hinweise auf die Wirkung von *C. tetrameria* bei gastrointestinalen Erkrankungen und auf die hierfür verantwortlichen Inhaltsstoffe erhalten werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Blätter von *Casimiroa tetrameria* MILLSP. (Rutaceae) physiologisch-pharmakologisch und phytochemisch untersucht. Bei dieser Art handelt es sich um eine bei den Maya auf der mexikanischen Halbinsel Yucatán traditionell bei gastrointestinalen Beschwerden, insbesondere Diarrhoe verwendete Arzneipflanze (ANKLI, 2000a).

Für die physiologischen Untersuchungen dieser Pflanze wurde das Modellsystem USSING-Kammer verwendet, mit dessen Hilfe Ionentransportmechanismen an verschiedenen Epithelen untersucht werden können. Am distalen Colon des Kaninchens zeigte der ethanolische Rohextrakt bei serosaler Applikation eine dosisabhängige antisekretorische Wirkung bezüglich der durch PGE₂ induzierten Cl⁻ - Sekretion. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml wurde eine Reduktion um 53 % hervorgerufen. Bei einer Zugabe zur mucosalen Seite war der Extrakt kaum aktiv. Durch eine Grobfraktionierung des Rohextrakts konnte nachgewiesen werden, daß die EtOAc-Fraktion über die höchste antisekretorische Aktivität verfügte.

Eine an der biologischen Aktivität orientierte Fraktionierung der EtOAc-Phase führte zur Isolierung und Identifizierung von 8 polymethoxylierten Flavonen: 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon und 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon, zwei erstmals beschriebene Verbindungen, des weiteren 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon, 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon, 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon, 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon, 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon und 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon.

Als weitere, nicht antisekretorisch aktive Hauptverbindungen wurden Kaempferol-3-O-glucosid, Kaempferol-3-O-rutinosid, Quercetin-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-rutinosid und 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxyxpsoralen, ebenfalls erstmals beschrieben, nachgewiesen.

Bezüglich der antisekretorischen Aktivität konnte gezeigt werden, daß Fraktionen, die Polymethoxyflavone in unterschiedlicher Zusammensetzung enthielten bei einer Konzentration von 25 µg/ml eine Reversion der Cl⁻ -Sekretion von 26 bis 47 % bewirkten.

Am isolierten Meerschweinchen-Ileum wurden die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen durch den Rohextrakt in Abhängigkeit von der Konzentration inhibiert. Bei einer Applikation von 300µg/ml wurde eine Abschwächung der Kontraktionen um 86 % be-

wirkt. Gleichzeitig wurden dosisabhängig auch Spontankontraktionen am isolierten Organ ausgelöst. Die höchste biologische Aktivität in diesem System wies ebenfalls die EtOAc-Fraktion auf. Die kontraktioninduzierende Aktivität beschränkte sich auf die wässrige Phase des Rohextrakts. Es konnte gezeigt werden, daß die Flavonoidglykoside als Mischfraktion in einer Konzentration von 70 µg/ml zu einer Kontraktionsinhibition von 50 % führen. Die Polymethoxyflavone bewirkten, in unterschiedlichen Verhältnissen in Mischfraktionen bei einer Konzentration von jew. 12.5 µg/ml eine Inhibition der Kontraktionen von 64 bis 88 %.

Als biologisch aktiv erwies sich auch eine Teezubereitung nach Art der Maya. Im Modellsystem USSING-Kammer konnte durch die serosale Zugabe des Tee-Extrakts in einer Konzentration von 500 µg/ml eine antisekretorische Aktivität nachgewiesen werden, die in ihrer Höhe etwa 65 % der Aktivität des Rohextrakts bei Applikation der gleichen Dosis entsprach.

Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von *C. tetrapteria* hat gezeigt, daß das Wachstum von *Helicobacter pylori* durch den Rohextrakt merklich gehemmt wird. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) lag bei 3 µg/ml.

Der Rohextrakt und die getesteten Fraktionen hatten bei den physiologischen Modellsystemen keinen schädigenden Einfluß auf die isolierten Geweben und deren Funktion. Untersuchungen an HeLa-Zellen hingegen zeigten für den Rohextrakt und insbesondere für eine Fraktion, die die biologisch aktiven Polymethoxyflavone enthielt, cytotoxische Effekte.

6 Summary

In this thesis physiological as well as phytochemical investigations of *Casimiroa tetrameria* MILLSP. (Rutaceae) are presented. This species is a medicinal plant traditionally used by the Yucatec Maya in Mexico against gastrointestinal disorders, especially in case of diarrhoea (ANKLI, 2000a).

The epithelium of the distal part of the rabbit colon mounted in an USSING chamber was used as a model in the physiological part of the investigations. It gives an opportunity to study ion-transport mechanisms in various epithelia. It was possible to demonstrate, that the crude extract of *C. tetrameria* exhibits a dose dependent antisecretory activity against the PGE₂-induced Cl⁻ -secretion when applied to the serosal side of the epithelium. At a concentration of 500 µg/ml a reduction of about 53% was observed. When applied to the mucosal side the extract was practically inactive. By partitioning the crude extract into 3 phases of different polarity (ethylacetate, petrolether and water) it was demonstrated that the ethylacetate fraction exhibits the highest antisectrory activity.

A bioassay-guided fractionation of the ethylacetate phase made it possible to isolate 8 polymethoxylated flavones: 5,6,2',3',5',6'-hexamethoxyflavone and 5,6,2',3',6'-pentamethoxyflavone, two new natural compounds, as well as 5,6,2',6'-tetramethoxyflavone, 5,6,3',4'-tetramethoxyflavone, 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone, 5,6,3',4',5'-pentamethoxyflavone, 5,6,3',5'-tetramethoxyflavone and 5,6,2',3',4', 6'-hexamethoxyflavone.

Furthermore additional main compounds of the ethylacetate fraction - kaempferol-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-rutinoside and 5-methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyl-psoralene, a new natural compound as well - were isolated.

It could also be demonstrated that fractions containing the polymethoxylated flavones in various compositions produced a reversion of the Cl⁻ -secretion in the range of 26% to 47% when applied in a concentration of 25 µg/ml.

Using the isolated Guinea pig ileum as a testsystem it was shown that the crude extract of *C. tetrameria* was able to inhibit contractions induced by histamine in a dose dependent manner as well. When applied in a concentration of 300 µg/ml the contractions were reduced up to 86 %. At the same time dose dependent spontaneous contractions were induced by the crude extract. The highest biological activity was again observed for the

ethylacetate fraction. The contraction-inducing activity was restricted to the H₂O-phase of the crude extract. When applied as a mixture in a concentration of 70 µg/ml the flavonoid glycosides lead to a reduction of the histamine induced contractions of about 50%. The polymethoxylated flavones exhibited an inhibition in the range of 64% to 88% when applied in various combinations in a concentration of 12.5 µg/ml.

A tea preparation according to the Mayan prescription showed biological activity as well. In the USSING chamber the tea exhibited antisecretory activity when applied to the serosal side in a concentration of 500 µg/ml. The extend of the activity was about 65% of the reversion induced by the same amount of ethanolic crude extract.

The investigation of the antimicrobial activity of *C. tetrameria* showed that the growth of *Helicobacter pylori* was inhibited considerably by the crude extract. The minimal inhibitory concentration (MIC) was about 3 µg/ml.

In both physiological testsystems the crude extract and the fractions investigated had no visible damaging effect on the isolated tissues and their function. However, investigations using HeLa cell cultures showed that the crude extract and especially a fraction containing the biologically active polymethoxylated flavones have cytotoxic effects on the cells.

7 Resumen

En este trabajo se presenta una investigación fitoquímica y farmacológica de las hojas de *Casimiroa tetrameria* MILL. (Rutaceae), especie medicinal utilizada por los Mayas de la península de Yucatán en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, principalmente para detener la diarrea (ANKLI, 2000a).

Para el estudio farmacológico se utilizó el modelo del colon distal de cobayo en la cámara de USSING, con este modelo se pueden investigar mecanismos de transporte de iones en diversos epitelios. El extracto etanólico presentó un efecto antisecretorico (secreción de Cl⁻) en el modelo de diarrea inducida por PGE₂, si se aplica al lado serosal, en una concentración de 500μg/ml observamos una reducción de 53 %, si el extracto se aplica al lado de la mucosa se observaba un efecto (negligible). Fraccionando el extracto pudimos determinar que la fracción de acetato de etilo presentó el efecto antisecretorio más fuerte.

El resultado de la fraccionación basados en el modelo biológico como guía, dio como resultado el aislamiento de 8 flavonas polimetoxiladas: 5,6,2',3',5',6'-hexametoxiflavona y 5,6,2',3',6'-pentametoxiflavona, compuestos descritos por primera vez, además se aislaron la 5,6,2',6'-tetrametoxiflavona, 5,6,3',4'-tetrametoxiflavona, 5,6,2',3',4'-pentametoxiflavona, 5,6,3',4',5'-pentametoxiflavona, 5,6,3',5'-tetrametoxiflavona y 5,6,2',3',4',6'-hexametoxiflavona.

Otros compuestos abundantes, pero inactivos presentes en el extracto son; caempferol-3-O-glucosido, caempferol-3-O-rutinosido, quercetin-3-O-glucosido, quercetin-3-O-rutinosido y una furanocumarina linear, que se describe por primera vez.

Con respecto a la actividad antisecretoría podemos demostrar, que fracciones, que contienen polimetoxiflavonas (25 μg/ml) en composiciones diferentes muestran una reducción en la secreción del Cl⁻ de 26 – 47 %.

En el modelo del ileo de cobayo investigamos el efecto sobre la contracción inducida por histamina. Se demostró un efecto dependiente de la dosis. Aplicando 300μg/ml resultó en una reducción de la contracción de 86 %. Al mismo tiempo se indujeron contracciones espontáneas en dicho órgano aislado. La fracción de acetato de etilo demostró también la actividad más alta. El efecto inductor de contracción solamente se encontró en la fase acuosa. Pudimos demostrar que al aplicar una mezcla de glucósidos de flavonoides en

una concentración de 70 μ g/ml resultó en una inhibición de la contracción de un 50% , al aplicar las polimetoxiflavonas la contracción se inhibe en un 64 a 88 %. si se applican 12.5 μ g/ml de una mezcla de dichos compuestos.

Una preparación del té (extracción acuosa) también fue activa en el modelo de la camara de USSING. Si se aplican 500 μ g/ml de la mencionada preparación se obtuvo una actividad del extracto crudo que equivale a los 65 % de la actividad del extracto etanolico en la misma dosis.

Una investigación antimicrobiana demuestra que se inhibe el crecimiento der *Helicobacter pylori* si se aplica el extracto etanolico. La concentración mínima de inhibición (CIM / MIC) fue 3 μ g/ml.

El extracto crudo y las fracciones no tienen un efecto dañoso visible sobre los tejidos en los modelos utilizados. Pero el extracto etanolico y en particular una fracción que contiene un gran porcentaje de los polimetoxiflavonas activas demuestra un efecto citotoxicoo en cellulas He-La.

8 Literatur

- ANKLI A (2000a) Yucatec Mayan Medicinal Plants: Ethnobotany, Biological Evaluation and Phytochemical Study of *Crossopetalum gaumeri*. Diss. ETH No. 13555.
- ANKLI A, HEINRICH M, BORK P, WOLFRAM L, BAUERFEIND P, BRUN R, SCHMID C, WEISS C, BRUGGESSER R, GERTSCH J, WASESCHA M, STICHER O (2000b) Yucatec Mayan Medicinal Plants: Evaluation Based on Indigenous Uses. *Journal of Ethnopharmacology* (in press).
- APG (Angiosperm Phylogeny Group), BREMER et al. (1998) Classification of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 531 – 553.
(<http://www.systbot.uu.se/classification/APGclassification.html>).
- ASAKURA H, YOSHIOKA M (1994) Review Article: Cholera Toxin and Diarrhoea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9, 186 – 194.
- BARRERA MARIN A, BARRERA VAZQUEZ A, LOPEZ FRANCO RM (1976) Nomenclatura Etnobotanica Maya: una interpretación taxonómica. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Mexico D.F.
- BERGENDORFF O, DEKERMDJIAN K, NIELSEN M, SHAN R, WITT R, AI J, STERNER O (1997) Furanocoumarins with Affinity to Brain Benzodiazepine Receptors *in vitro*. *Phytochemistry* 44, 1121 – 1124.
- BERN C, MARTINES J, DE ZOYOSA I, GLASS RI (1992) The Magnitude of the Global Problem of Diarrhoeal Disease: A Ten Year Up-Date. *Bull. World Health Organ* 70, 705 – 714.
- BROUILLARD R, DANGLES O (1994) Flavonoids and Flower Colour. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. Ed.: JB Harborne, Chapman & Hall: London. 565 – 588.
- BURCKHARDT F (1992) Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 721 – 726.
- CAREY HV, HAYDEN UL, SPICER SS, SCHULTE BA, BENOS DJ (1994) Localization of Amiloride-sensitive Na⁺-Channels in Intestinal Epithelia. *American Journal of Physiology* 266, G504 – G510.
- CLAUSS W (1993) in: *Advanced Compendium of Environmental Physiology* (Ed.: W Clauss) 16, 95 – 112.
- CROWE SE, POWELL DW (1995) Fluid and Electrolyte Transport During Enteric Infections. In: *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Eds.: MJ Blaser, PD Smith, PD Ravdin, HB Greenberg, RL Guerrant. Raven Press, Ltd.: New York. 107 – 139.
- DATTA SC, MURTI VVS, SESARDI TR (1969) A New Synthesis of Zapotin, Zapotinin & Related Flavones. *Indian Journal of Chemistry* 7, 746 – 750.
- DE JONGE HR (1975) The Localization of Guanylal Cyclase in Rat Small Intestinal Epithelium. *FEBS Letters* 53, 237 – 242.

- DE JONGE HR (1981) Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase in Intestinal Brush Borders. Advances in Cyclic Nucleotide Research 14, 315 – 333.
- DECKMYN H, VAN GEET C, VERMYLEN J (1993) Dual Regulation of Phospholipase C Activity by G-Proteins. News in Physiological Sciences, 8, 61 – 63.
- DI CARLO G, AUTORE G, IZZO AA, MAIOLINO P, MASCOLO N, VIOLA P, DIURNO M V, CAPASSO F (1993) Inhibition of Intestinal Motility and Secretion by Flavonoids in Mice and Rats: Structure-Activity Relationships. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 45, 1054 – 1059.
- DOMÍNGUEZ XA, RODRÍGUEZ V, VILLEGAS AD, ROJAS MP (1972) Extractives from *Sargentia greggii*. Phytochemistry 11, 2648 – 2649.
- DOMÍNGUEZ XA, VILLEGAS D (1976) Estructura de la Cerrosillina B (5, 6, 3', 4', 5'-Pentamethoxyflavona) aislada de las hojas del Chapote Amarillo (*Sargentia greggii*). Revista Latinoamericana de Quimica 7, 45 – 46.
- DONOWITZ M, MADARA JL (1982) Effect of Extracellular Calcium Depletion on Epithelial Structure and Function in Rabbit Ileum: A Model for Selective Crypt or Villus Epithelial Cell Damage and Suggestion of Secretion by Villus Epithelial Cells. Gastroenterology 83, 1231 – 1243.
- DREYER DL (1968) *Citrus* Bitter Principles. IX. Extractives of *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. The Structure of Zapoterin. Journal of Organic Chemistry 33, 3577 – 3582.
- DREYER DL, BERTELLI DJ (1967) The Structure of Zapotin. Tetrahedron 23, 4607 – 4612.
- ENGLER A (1964) Syllabus der Pflanzenfamilien. Band II: Angiospermen. Hrsg. Prof. Dr. Hans Melchior. Gebrüder Borntraeger: Berlin-Nikolassee; 12. Auflage. 263 – 66.
- FARKAS L, GOTTSÉGEN A, NOGRADI M (1968) On the Structure of Zapotin and Zapotinin. II. The Synthesis of Zapotin. Tetrahedron Letters 37, 3993 – 3996.
- FIELD M (1981) Secretion of Electrolytes and Water by Mammalian Small Intestine. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract. Ed.: LR Johnson. Raven: New York. 963 – 982.
- FIELD M, SEMRAD CE (1993) Toxigenic Diarrheas, Congenital Diarrheas, and Cystic Fibrosis: Disorders of Intestinal Ion Transport. Annual Review of Physiology 55, 631 – 655.
- FONDACARO JD (1986) Intestinal Ion Transport and Diarrhoeal Diseases: Editorial Review 250/Gastrointestinal and Liver Physiology. American Journal of Physiology 13, G1 – G8.
- FRIZZEL RA, KOCH MJ, SCHULTZ SG (1976) Ion Transport by Rabbit Colon. I. Active and Passive Components. Journal of Membrane Biology 27, 297 – 316.
- FROHNE D, JENSEN U (1998) Systematik des Pflanzenreichs. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart. 190 – 194.
- FURUYA M, GALSTON AW, STOWE BB (1962) Isolation from Peas of Co-Factors and Inhibitors of Indolyl-3-Acetic Acid Oxidase. Nature 193, 456 – 457.

- GARRATT P J, SCHEINMANN F, SONDHEIMER F (1967) Constituents of *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. - VIII: The Structures of Zapotin and Zapotinin. *Tetrahedron* 23, 2413 – 2416.
- GARZON-DE LA MORA P, GARCIA-LOPEZ PM, GARCIA-ESTRADA J, NAVARRO-RUIZ A, VILLANUEVA-MICHEL T, VILLARREAL-DE PUGA LMA, CASILLAS-OCHOA J (1999) *Casimiroa edulis* Seed Extracts Show Anticonvulsive Properties in Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 275 – 282.
- GEE JM, DUPONT MS, RHODES MJC, JOHNSON IT (1998) Quercetin Glucosides Interact with the Intestinal Glucose Transport Pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 19 – 25.
- GILMAN AG (1984) G-Proteins and Dual Control of Adenylat Cyclase. *Cell* 36, 577 – 579.
- GRAEFE EU, DERENDORF H, VEIT M (1999) Pharmacokinetics and Bioavailability of the Flavonol Quercetin in Humans. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 37, 219 – 233.
- GREGER R, SCHLATTER E, WANG F, FORREST JN JR (1984) Mechanism of NaCl-Secretion in Rectal Gland Tubules of Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*). III. Effects of Stimulation of Secretion by Cyclic AMP. *Pflügers Archive* 402, 376 – 384.
- GREGER R, NITSCHKE RB, LOHRMANN E, BURHOFF I, HROPOT M, ENGLERT HC, LANG HJ (1991) Effects of Arylaminobezoate-type Chloride Channel Blockers on Equivalent Short-Circuit Current in Rabbit Colon. *Pflügers Archive* 419, 190 – 196.
- HARBORNE JB (1988) Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd Ed., Academic Press: London.
- HARBORNE JB, INGHAM JL, KING L, PAYNE M (1976) The Isopentenyl Isoflavone Luteone as a Pre-infectional Agent in the Genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 15, 1485 – 1487.
- HARKAR S, RAZDAN TK, WAIGHT ES (1984) Steroids, Chromone and Coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* 23, 419 – 426.
- HAVSTEEN B (1983) Commentary: Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochemical Pharmacology* 32, 1141 – 1148.
- HEGNAUER R (1973) Chemotaxonomie der Pflanzen: Band 6, Dicotyledonae: Rafflesiaceae – Zygophyllaceae. Birkhäuser Verlag: Basel, Stuttgart. 196 – 200.
- HELLER W, FORKMAN G (1994) Biosynthesis of Flavonoids. In: The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Ed.: JB Harborne. Chapman & Hall: London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 499 – 535.
- HÖR M, RIMPLER H, HEINRICH M (1995) Inhibition of Intestinal Chloride Secretion by Proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. *Planta Medica* 61, 208 – 212.
- HÖR M, HEINRICH M, RIMPLER H (1996) Proanthocyanidin Polymers with Antisecretory Activity and Proanthocyanidin Oligomers from *Guazuma ulmifolia* Bark. *Phytochemistry* 42, 109 – 119.
- HOROWITZ RM (1964) Relations Between the Taste and Structure of Some Phenolic Glycosides. In: Biochemistry of Phenolic Compounds. Ed.: JB Harborne. Academic Press: London. 545 – 572.

- HOYOS F. J (1994) Frutales en Venezuela (Nativos y exóticos). Sociedad de Ciencias Naturales. La Salle. Monografía No. 36. Segunda Edición. Caracas – Venezuela. 259 – 60.
- IINUMA M, OHYAMA M, TANAKA T, MIZUNO M, HONG S-K (1992) Three 2',4',6' – trioxxygenated Flavanones in Roots of *Echinosophora koreensis*. Phytochemistry 31, 665 – 669.
- IRIARTE J, KINCL FA, ROSENKRANZ G, SONDEIMER F (1956) The Constituents of *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. Part II. The Bark. Journal of the Chemical Society 4170 – 4173.
- ITO A, SHAMON LA, YU B, MATA-GREENWOOD E, LEE SK, VAN BREEMEN RB, MEHTA RG, FARNSWORTH NR, FONG HHS, PEZZUTO JM, KINGHORN AD (1998) Antimutagenic Constituents of *Casimiroa edulis* with Potential Cancer Chemopreventive Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3509 – 3516.
- JOSEPH-NATHAN P, SANTILLAN RL (1984) ¹H-NMR Study of Naphtoflavones with Shift Reagents. Organic Magnetic Resonance 22, 129 – 130.
- KEUSCH GT, DONOWITZ M (1983) Pathophysiological Mechanisms of Diarrhoeal Diseases: Diverse Aetiologies and Common Mechanisms. Scandivian Journal of Gastroenterology (Suppl.) 84, 33 – 43.
- KIMBERG DV, FIELD M, GERSHON E, HENDERSON A (1974) Evidence Against an Essential Role for Prostaglandins in the Action of Toxin. The Journal of Clinical Investigation 53, 941 – 949.
- KINCL FA, ROMO J, ROSENKRANZ G, SONDEIMER F (1956) The Constituents of *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. Part I. The Seed. Journal of the Chemical Society. 4163 – 4169.
- KINOSHITA T, FIRMAN K (1997) Myrecitin 5,7,3',4',5' - Pentamethyl Ether and other Methylated Flavonoids from *Murraya paniculata*. Phytochemistry 45, 179 – 181.
- LOO DD, KAUNITZ JD (1989) Ca²⁺ and cAMP Activate K⁺-Channels in the Basolateral Membrane. Journal of Membrane Biology 110, 19 – 28.
- MABBERLEY DJ (1997) The Plant Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants. Cambridge University Press: Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.
- MABRY TJ, MARKHAM KR, THOMAS MB (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- MACANDER PJ (1986) Flavonoids Affect Acetylcholine, PGE₂, and Antigen-Mediated Smooth Muscle Contraction. In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. Eds.: V Cody, E Middleton Jr, JB Harborne. Alan R Liss: New York. 489 – 492.
- MAGNUS R (1904) Versuche am überlebenden Dünndarm von Säugethieren. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere. 102, 123 – 151.

- MAGOS GA, VIDRIO H (1991) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; Part I. Blood Pressure and Heart Rate Effects in the Anesthetized Rat. *Planta Medica* 57, 20 – 24.
- MAGOS GA, VIDRIO H, ENRÍQUEZ R (1995) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; III. Relaxant and Contractile Effects in Rat Aortic Rings. *Journal of Ethnopharmacology* 47, 1 – 8.
- MAGOS GA, VIDRIO H, REYNOLDS WF, ENRÍQUEZ RG (1999) Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive Effects of Compounds Isolated from Methanolic Extracts in Rats and Guinea Pigs. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 35 – 44.
- MANUEL Y KEENOY B, VERTOMMEN J, DE LEEUW I (1999) The Effect of Flavonoid Treatment on the Glycation and Antioxidant Status in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes, Nutrition and Metabolism* 12, 256 – 63.
- MARKHAM KR (1982) Techniques in Flavonoid Identification. Academic Press: London, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto
- MARTINEZ H, RYAN GW, GUISCAFRE H, GUTIERREZ G (1998) An Intercultural Comparison of Home Case Management of Accute Diarrhoea in Mexico: Implications for Program Planners. *Archives of Medical Research* 29, 351 – 360.
- MARTÍNEZ M (1951) Las Casimiroas de Mexico Y Centroamerica. *Anales del Instituto de Biología [Mexico, D.F.]* 22 (1), 25 - 81.
- MARTÍNEZ M (1959) Las Plantas Medicinales de Mexico. 4th ed..Ediciones Botas, Mexico. 349 – 355.
- MASUDA T, TAKASUGI M, ANETAI M (1998) Psoralen and Other Linear Furanocoumarins as Phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry* 47, 13 – 16.
- MATA R, ROJAS A, ACEVEDO L, ESTRADA S, CALZADA E, ROJAS I, BYE R, LINARES E (1997) Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica* 63, 31 – 35.
- MC CLURE JW (1975) Physiology and Functions of Flavonoids. In: *The Flavonoids*. Eds.: JB Harborne, TJ Mabry, H Mabry. Chapman and Hall: London. 970 – 1055.
- MECKES M, PAZ D, ACOSTA J, MATA R (1998) The Effects of Chrysanthemum and Pinostrobin, Two Flavonoids Isolated from *Teloxys graveolens* Leaves, on Isolated Guinea-Pig Ileum. *Phytomedicine* 5, 459 – 463.
- MELI R, AUTORE G, DI CARLO G, CAPASSO F (1990) Inhibitory Action of Quercetin on Intestinal Transit in Mice. *Phytotherapy Research* 4, 201 – 202.
- MENDIETA RM, DEL AMO RS (1981) Plantas Medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, Xalapa, Veracruz; Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V., Mexico. 83, XXV.
- MERFORT I, HEILMANN J (1998) Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden: II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit* 27, 173 – 183.

- MEYER BN, WALL ME, WANI MC, TAYLOR HL (1985) Plant Antitumor Agents. 21. Flavones, Coumarins, and an Alkaloid from *Sargentia greggii*. *Journal of Natural Products* 48, 952 – 956.
- MIDDLETON E JR, KANDASWAMI C (1994) The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Ed.: JB Harborne. Chapman & Hall: London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 619 – 652.
- MISIEWICZ JJ, WALLER SL, HORTON EW (1969) Effect of Oral Prostaglandin E₁ on Intestinal Transit in Man. *Lancet*, 648 – 651.
- MORTON JF (1962) The Drug Aspects of the White Sapotes. *Economic Botany* 16, 288 – 294.
- MORTON JF (1981) *Atlas of Medicinal Plants of Middle America: Bahamas to Yucatán*. Charles C. Thomas, Publisher: Springfield, Illinois, USA. 372 – 373.
- MOSMANN T (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application for Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55 – 63.
- MURER H, BERGER EG (1992) 11. Physiologie des Magen-Darm-Traktes. In: *Physiologie*. Eds.: P Deetjen, E.-J Speckmann, Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore. 397 – 437.
- NAVARRO RUÍZ A, BASTIDAS RAMÍREZ BE, GARCÍA ESTRADA J, GARCÍA LÓPEZ P, GARZÓN P (1995) Anticonvulsant Activity of *Casimiroa edulis* in Comparison to Phenytoin and Phenobarbital. *Journal of Ethnopharmacology* 45, 199 – 206.
- NEDENSKOV P (1994) Nutritional Requirements for Growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3450 – 3453.
- NGUYEN TD, CANADA AT (1993) Citrus Flavonoids Stimulate Secretion by Human Colonic T84 Cells. *Journal of Nutrition* 123, 259 – 263.
- O'GARA EA, HILL DJ; MASLIN DJ (2000) Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents Against *Helicobacter pylori*. *Applied Environmental Microbiology* 66, 2269 – 2273.
- PARKER WH, BOHM BA (1975) Flavonol Glycosides of *Limnanthes douglasii*. *Phytochemistry* 14, 553 – 555.
- PARVEEN M, KHAN NU-D (1987) Two New Flavones from *Ardisia floribunda* WALL in ROXB.. *Indian Journal of Chemistry* 26B, 894 – 895.
- PENNINGTON CW (1958) Tarahumar Fish Stupefaction Plants. *Economic Botany* 12, 95 – 102.
- POWER FB, CALLAN T (1911) The Constituents of the Seeds of *Casimiroa edulis*. *Journal of the Chemical Society*. 1993 – 2012.

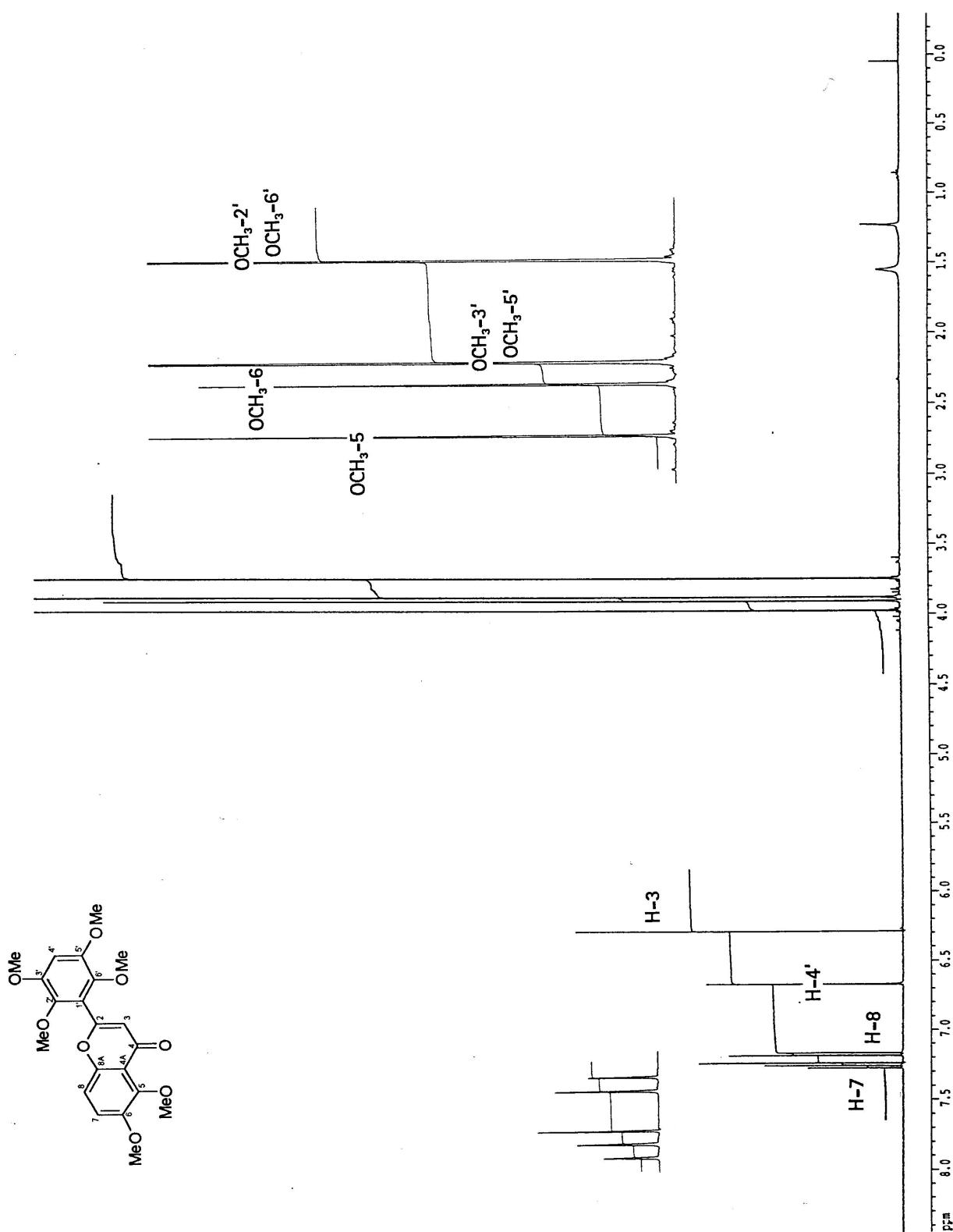
- PRICE RM, MIDDLETON E JR (1986) Interaction of Flavonoids with Model Membranes.
In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. Eds.: V Cody, E Middleton Jr, JB Harborne. Alan R Liss: New York. 507 – 509.
- RAO VSN, SANTOS FA, SOBREIRA TT, SOUZA MF, MELO CL, SILVEIRA ER (1997) Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. *Planta Medica* 63, 146 – 149.
- RAZDAN TK, QADRI B, HARKAR S, WAIGHT ES (1987) Chromones and Coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry* 26, 2063 – 2069.
- ROMERO ML, ESCOBAR LI, LOZOYA X, ENRÍQUEZ RG (1983) High-Performance Liquid Chromatographic Study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of Imidazole Derivatives and Rutin in Aqueous and Organic Extracts. *Journal of Chromatography* 281, 245 – 251.
- ROY RL (1931) The Ethno-Botany of the Maya. Dept. Of Middle American Research, Tulane Univ. of Louisiana, New Orleans.
- SAMUELSSON G (1991) 11. Assays for Pharmacological Activity: Non-Specific Assays.
In: Methods in Plant Biochemistry. Series Eds.: PM Dey, JB Harborne.
Vol. 6: Assays for Bioactivity. Ed.: K Hostettmann. Academic Press Ltd.: London 261 – 280.
- SCHMIDT RF, THEWS G (1997) Physiologie des Menschen. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. 27. Auflage.
- SMITH CA, WOOD EJ (1997) Cell Biology. 2nd ed. Chapman and Hall: London, New York, Weinheim, Philadelphia. 313 – 315.
- SONDHEIMER F, MEISELS A, KINCL FA (1959) Constituents of *Casimiroa edulis* LLAVE et LEX. V. Identity of Casimirolid and Obacunone. *Journal of Organic Chemistry* 24, 870.
- STANDLEY PC, STEYERMARK JA (1946) Flora of Guatemala. Vol. 24, Part V. *Fieldiana: Botany*; Chicago Natural History Museum. 401 – 404.
- STRACK D, HEILEMANN J, WRAY V, DIRKS H (1989) Structures and Accumulation Patterns of Soluble and Insoluble Phenolics from Norway Spruce Needles. *Phytochemistry* 28, 2071 – 2078.
- STRUCKMANN JR (1999) Clinical Efficacy of Micronized Purified Flavonoid Fraction: An Overview. *Journal of Vascular Research*. 36 Suppl. 1, 37 – 41.
- SWANSON SM, PEZZUTO JM (1990) Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis. In: EB Thompson (Ed.) Drug Bioscreening. Drug Evaluation Techniques in Pharmacology. VCH Publishers, Inc.: New York, Weinheim, Cambridge. 273.
- TABAK M, ARMON R, NEEMAN I (1999) Cinnamon Extracts' Inhibitory Effect on *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 269 – 277.
- TAKHTAJAN A (1997) Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. 310 - 311.

- TANAKA T, IINUMA M, MIZUNO M (1986) Spectral Properties of 2'-Oxygenated Flavones. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 34, 1667 – 1671.
- THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart.
- THOMPSON CB (1995) Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* 267, 1456 – 1462.
- TODA M, OKUBO S, HIYOSHI R, SHIMAMURA T (1989) The Bactericidal Activity of Tea and Coffee. *Letters in Applied Microbiology* 8, 123 – 125.
- TODA M, OKUBO S, IKIGAI H, SUZUKI T, SUZUKI Y, SHIMAMURA T (1991) The Protective Activity of Tea Against Infection by *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 109 – 112.
- TURNAMIAN SG, BINDER HJ (1989) Regulation of Active Sodium and Potassium Transport in the Distal Colon of the Rat. Role of the Aldosterone and Glucocorticoid Receptors. *Journal of Clinical Investigation* 84, 1924 – 1929.
- TURNBERG L, BIEBERDORF F, MORAWSKI S, FORDTRAN JS (1970) Interrelationships of Chloride, Bicarbonate, Sodium and Hydrogen Transport in Human Ileum. *Journal of Clinical Investigation*. 49, 557 – 567.
- TURNBERG L (1991) Cellular Basis of Diarrhoea: The Croonian Lecture 1989. *Journal of the Royal College of Physicians of London* 25, 53 – 62.
- USSING H H, ZEHREN K (1951) Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-Circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiologica Scandinavica* 23, 110 – 127.
- VAANDRAGER AB, SCHULZ S, DE JONGE HR, GARBERS DL (1993) Guanylylcyclase C is an N-linked Glycoprotein Receptor that Accounts for Many Heat Stable Enterotoxin-binding Proteins in the Intestine. *Journal of Biological Chemistry* 268, 2174 – 2179.
- VIDRIO H, MAGOS GA (1991) Pharmacology of *Casimiroa edulis*; II. Cardiovascular Effects in the Anesthetized Dog. *Planta Medica* 57, 217 – 220.
- WALTER K (1966) Vorkommen von Flavonoiden in den Exkretträumen von *Citrus*-Früchten. *Planta Medica* 14, 453.
- WILLIAMS CA, HARBORNE JB (1994) Flavone and Flavone Glycosides. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. Ed.: JB Harborne; Chapman & Hall: London. 337 – 386.
- WILLIAMSON EM (1999) Synergy: Myth or Reality. *Herbal Medicine: A Concise Overview for Professionals*. Ed.: EE Butterworth-Heinemann.
- WILLS NK (1985) Apical Membrane Potassium and Chloride Permeabilities in Surface Cells of Rabbit Descending Colon Epithelium. *Journal of Physiology (London)* 358, 433 – 445.
- WOLLENWEBER E (1994) Flavones and Flavonols. In: *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. Ed.: JB Harborne; Chapman & Hall: London. 259 – 336.

- WOLLENWEBER E, JAY M (1988) Flavones and Flavonols. In: The Flavonoids. Advances in Research. Since 1980. Ed.: JB Harborne. Chapman and Hall: London. 233 – 302.
- YOUNG YA, COOK DI, LINGARD JM, VAN LENNEP EW, WEGMAN E (1994) Lehrbuch der Physiologie. Eds.: R Klinke, S Silbernagel. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 387 – 437.

9 Anhang

Abbildung 9.1: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon	S. 134
Abbildung 9.2: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon	S. 135
Abbildung 9.3: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon/ 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)	S. 136
Abbildung 9.4: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon/ 5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin)	S. 137
Abbildung 9.5: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin)	S. 138
Abbildung 9.6: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B)	S. 139
Abbildung 9.7: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1)	S. 140
Abbildung 9.8: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2)	S. 141
Abbildung 9.9: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon	S. 142
Abbildung 9.10: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)- prenyloxypsoralen	S. 143
Abbildung 9.11: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)- prenyloxypsoralen	S. 144
Abbildung 9.12: HMQC145Hz-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)- prenyloxypsoralen	S. 145
Liste der verwendeten Abkürzungen	S. 146



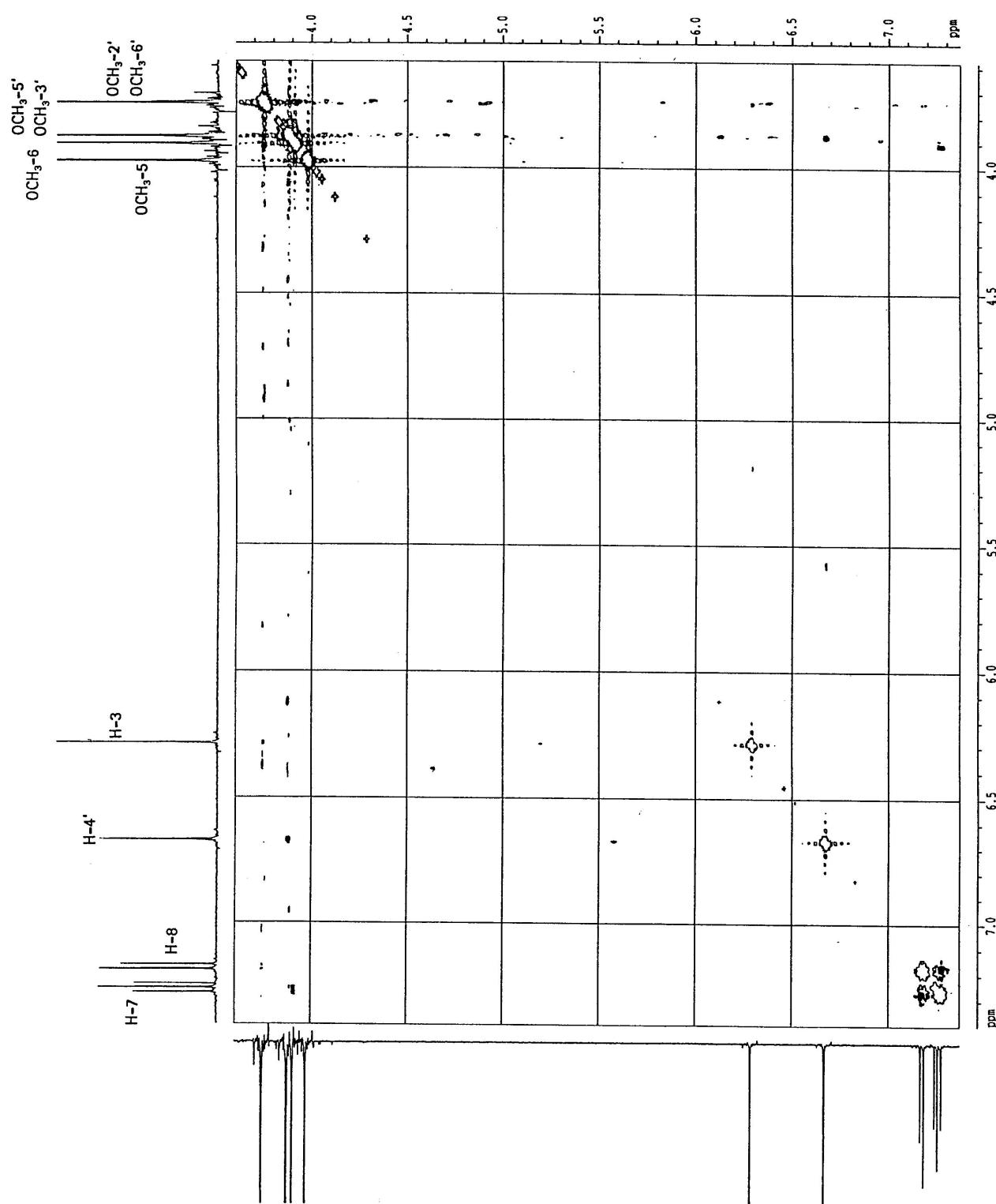


Abb. 9.2: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5,6,2',3',5',6'-Hexamethoxyflavon (aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

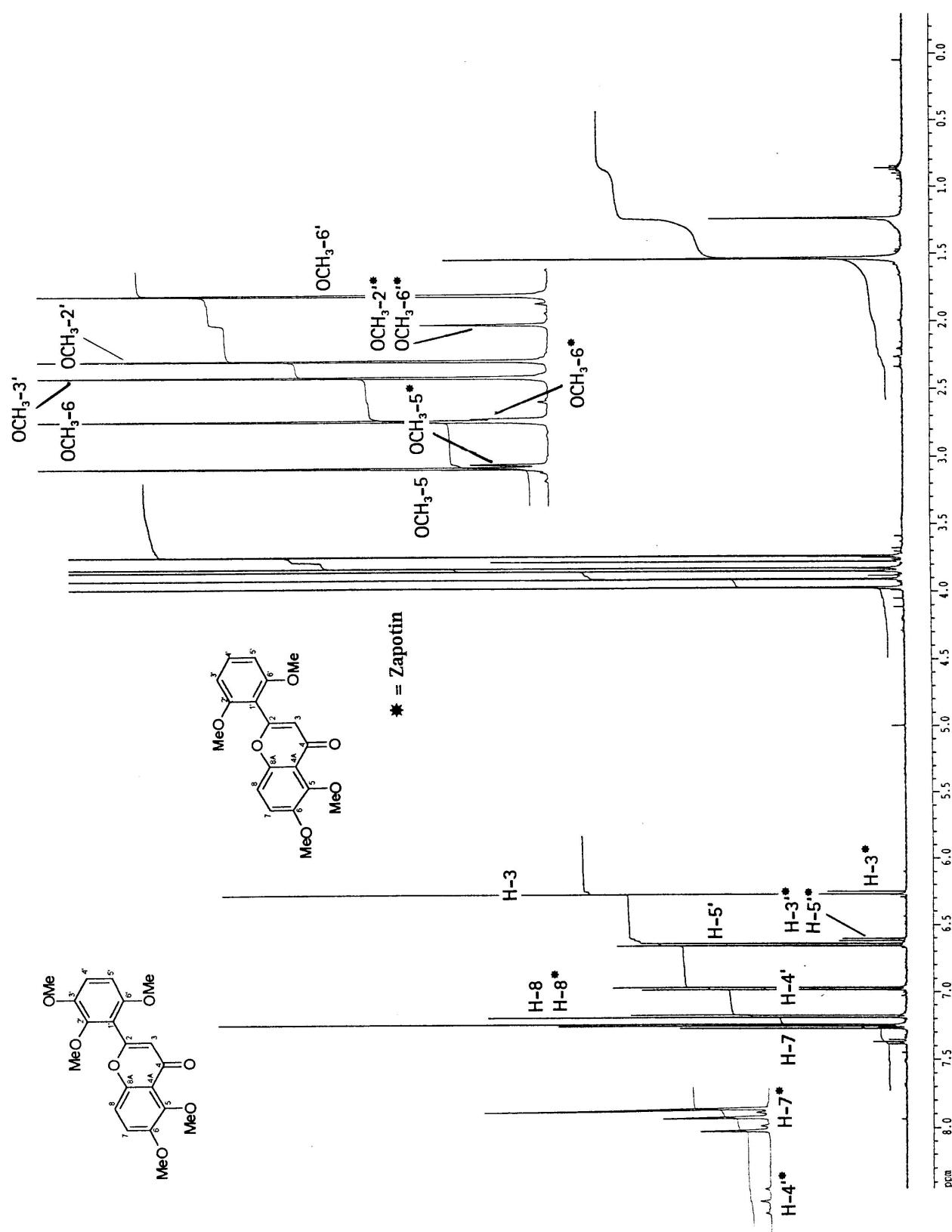


Abb. 9.3: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon/5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon (Zapotin; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

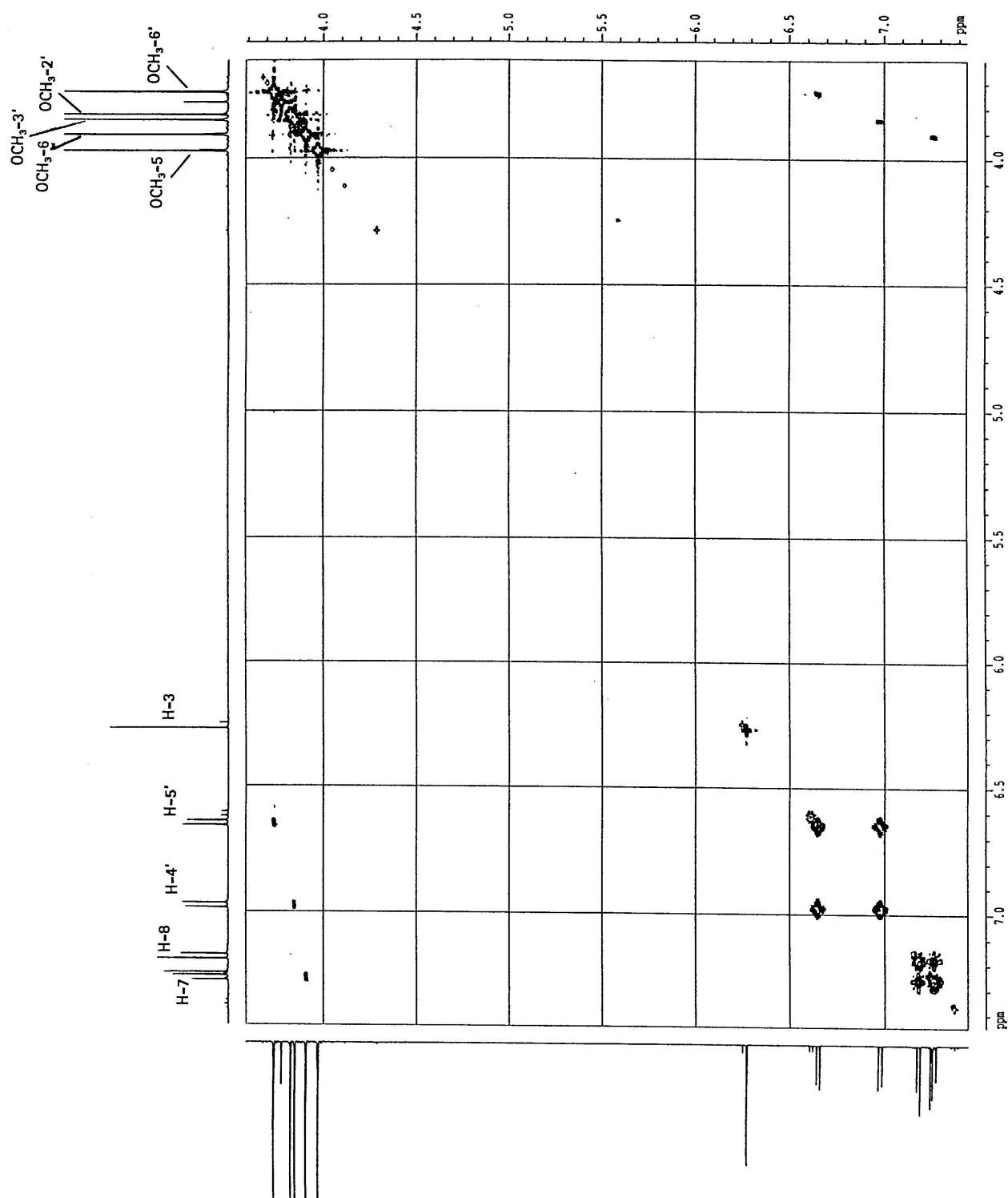


Abb. 9.4: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5,6,2',3',6'-Pentamethoxyflavon/5,6,2',6'-Tetramethoxyflavon
(Zapotin; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

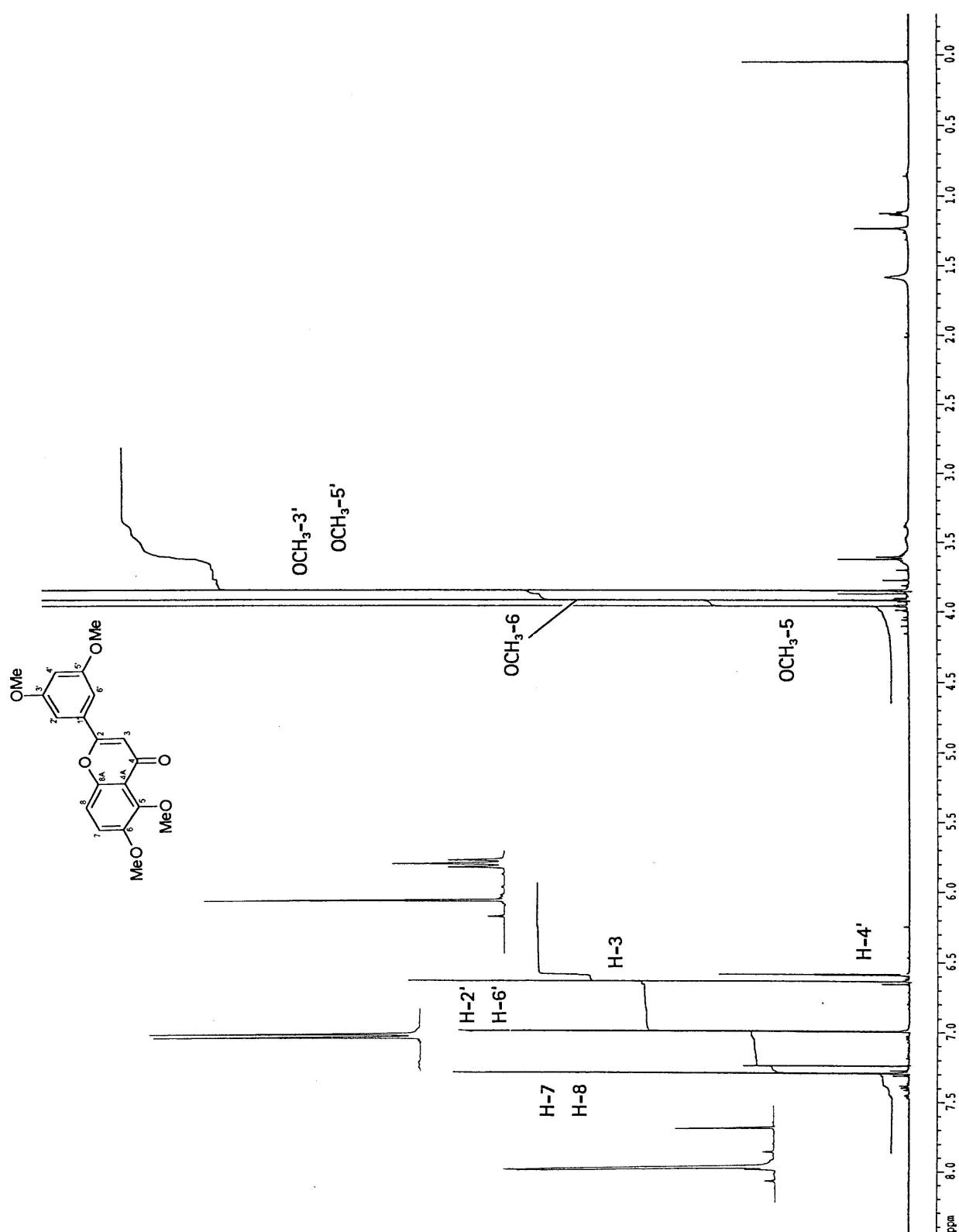


Abb. 9.5: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',5'-Tetramethoxyflavon (Cerrosillin; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

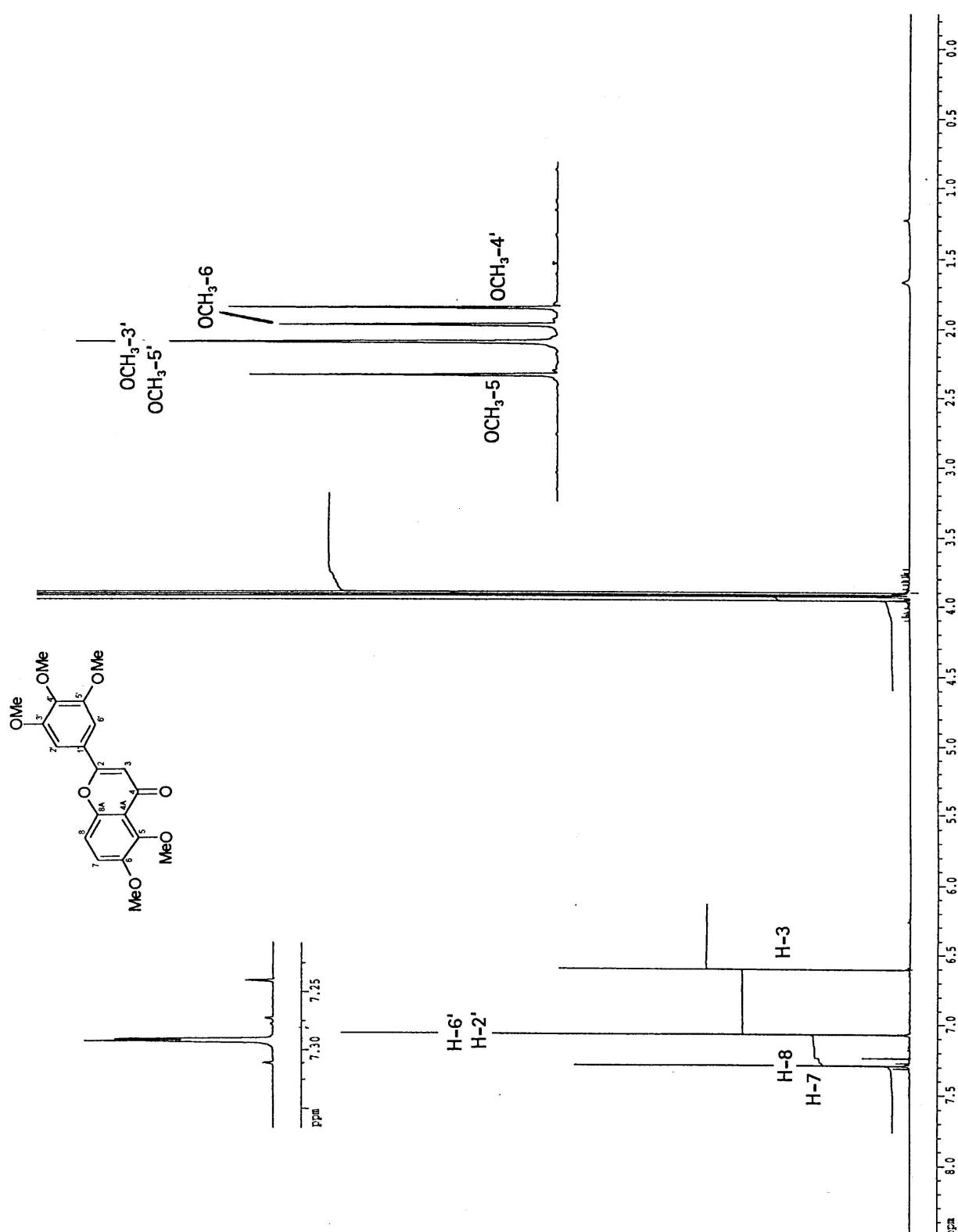


Abb. 9.6: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',4',5'-Pentamethoxyflavon (Cerrosillin B; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

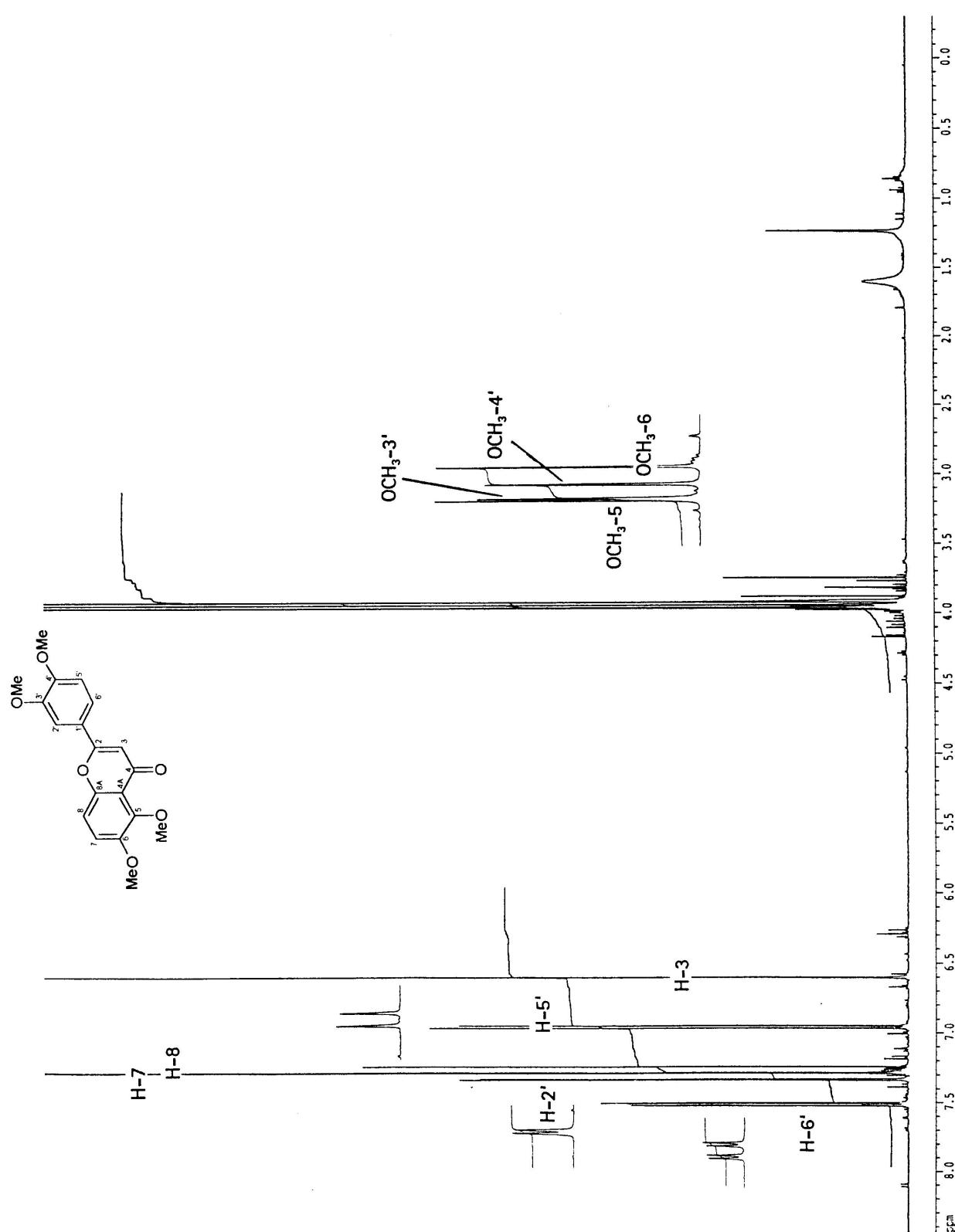


Abb. 9.7: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,3',4'-Tetramethoxyflavon (Af-1; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

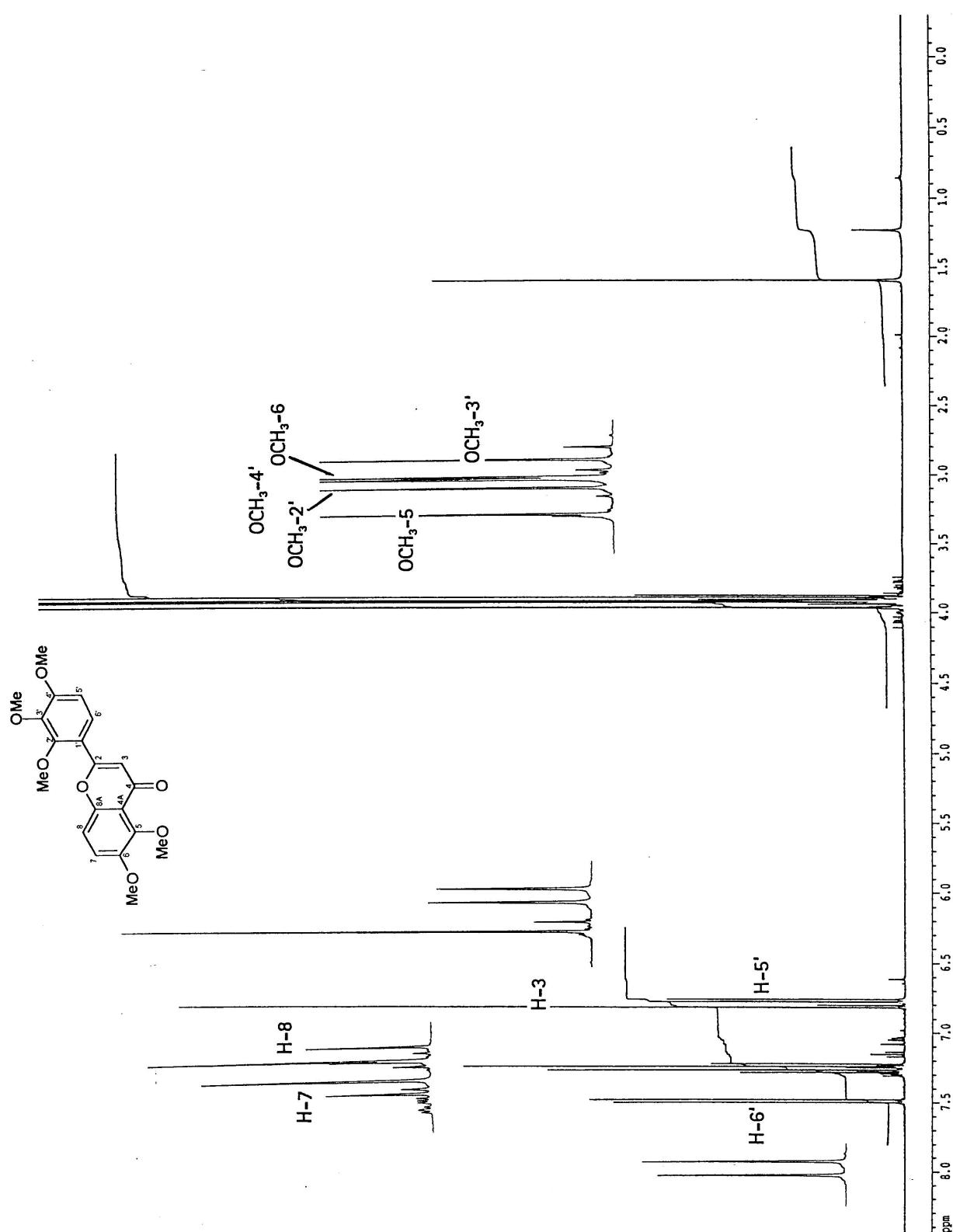


Abb. 9.8: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',4'-Pentamethoxyflavon (Af-2; aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

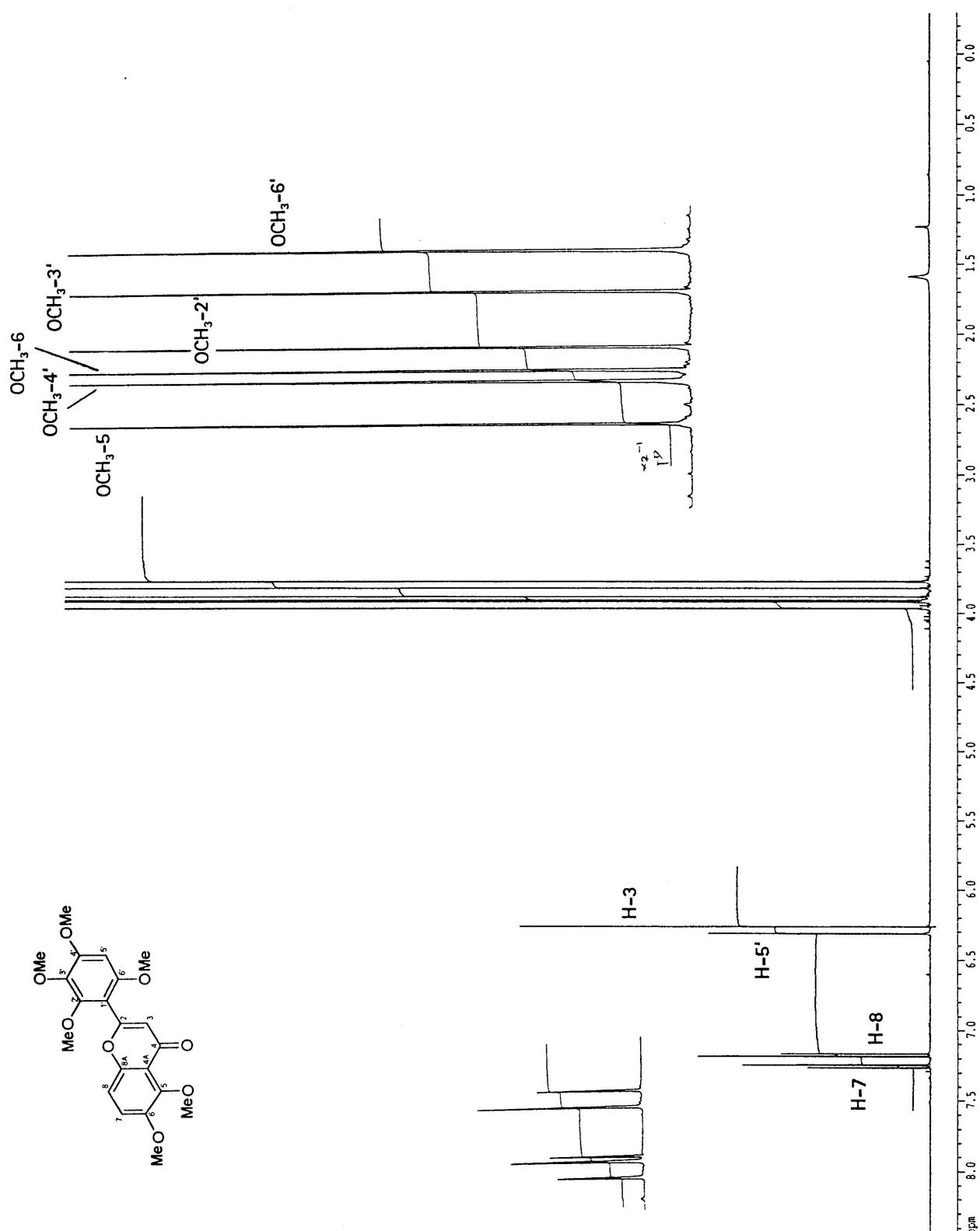


Abb. 9.9: ^1H -NMR-Spektrum von 5,6,2',3',4',6'-Hexamethoxyflavon (aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

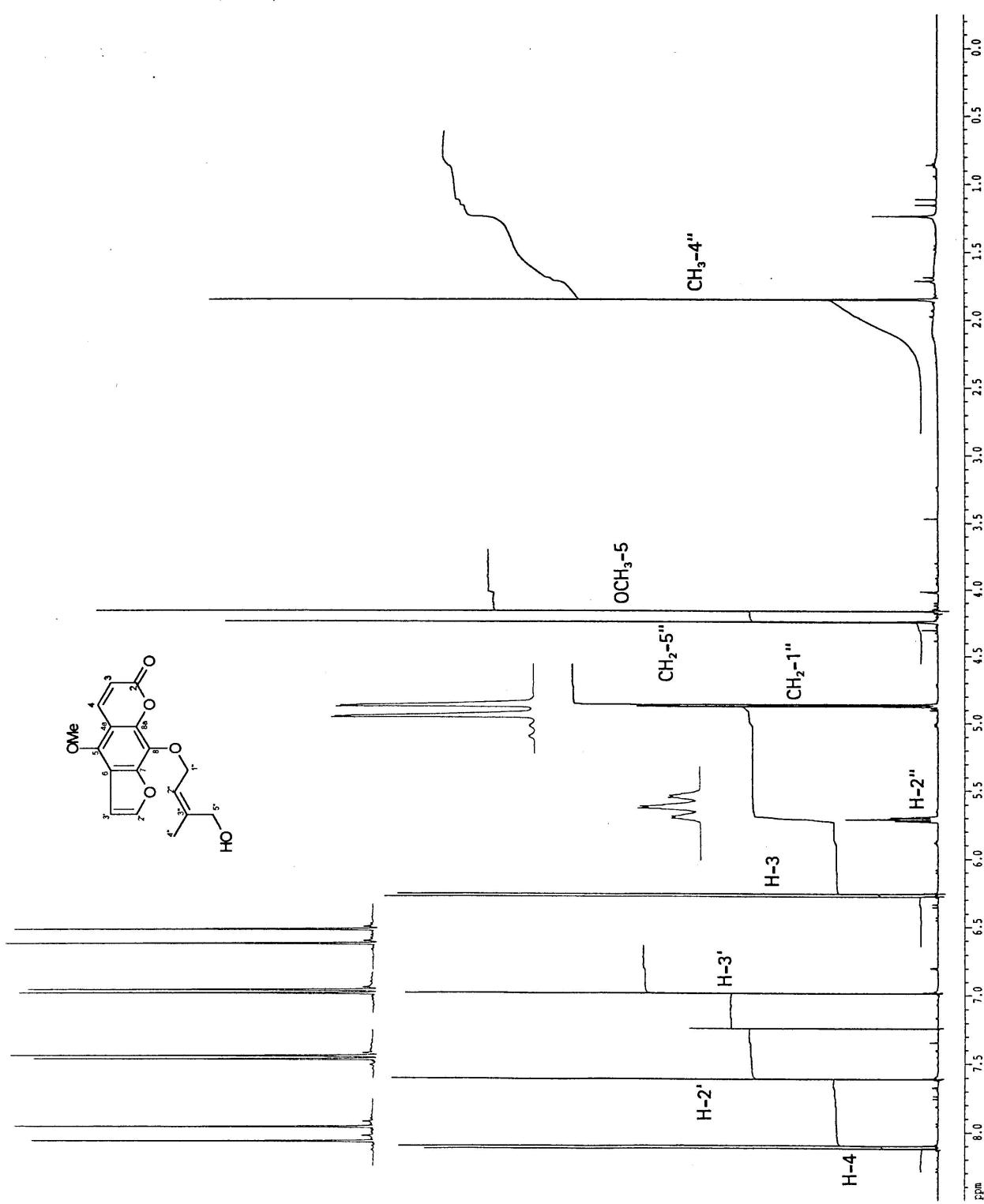


Abb. 9.10: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5'-hydroxy)-prenyloxypsalen (aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

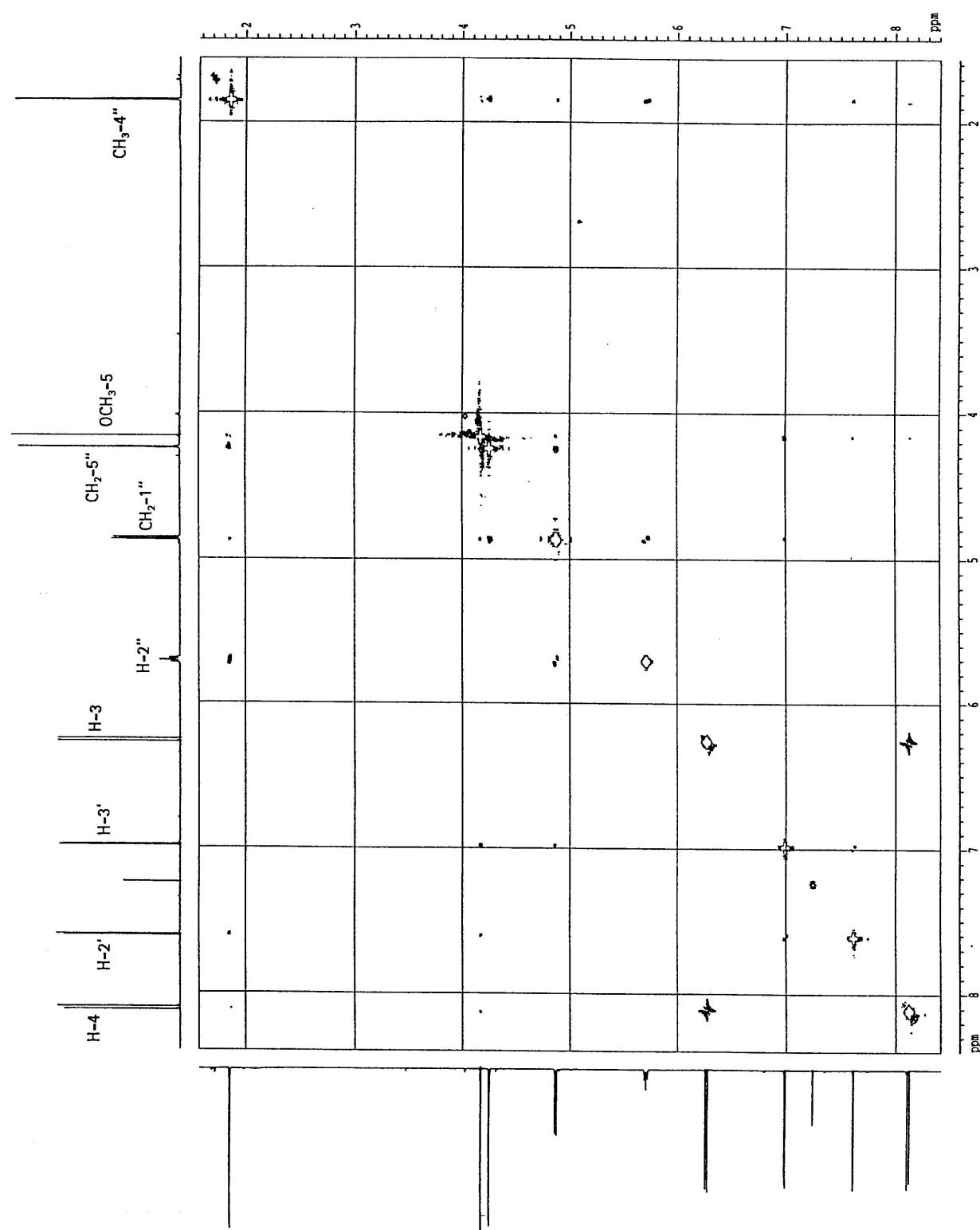


Abb. 9.11: ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxypsalalen
(aufgenommen in CDCl_3 ; 500 MHz)

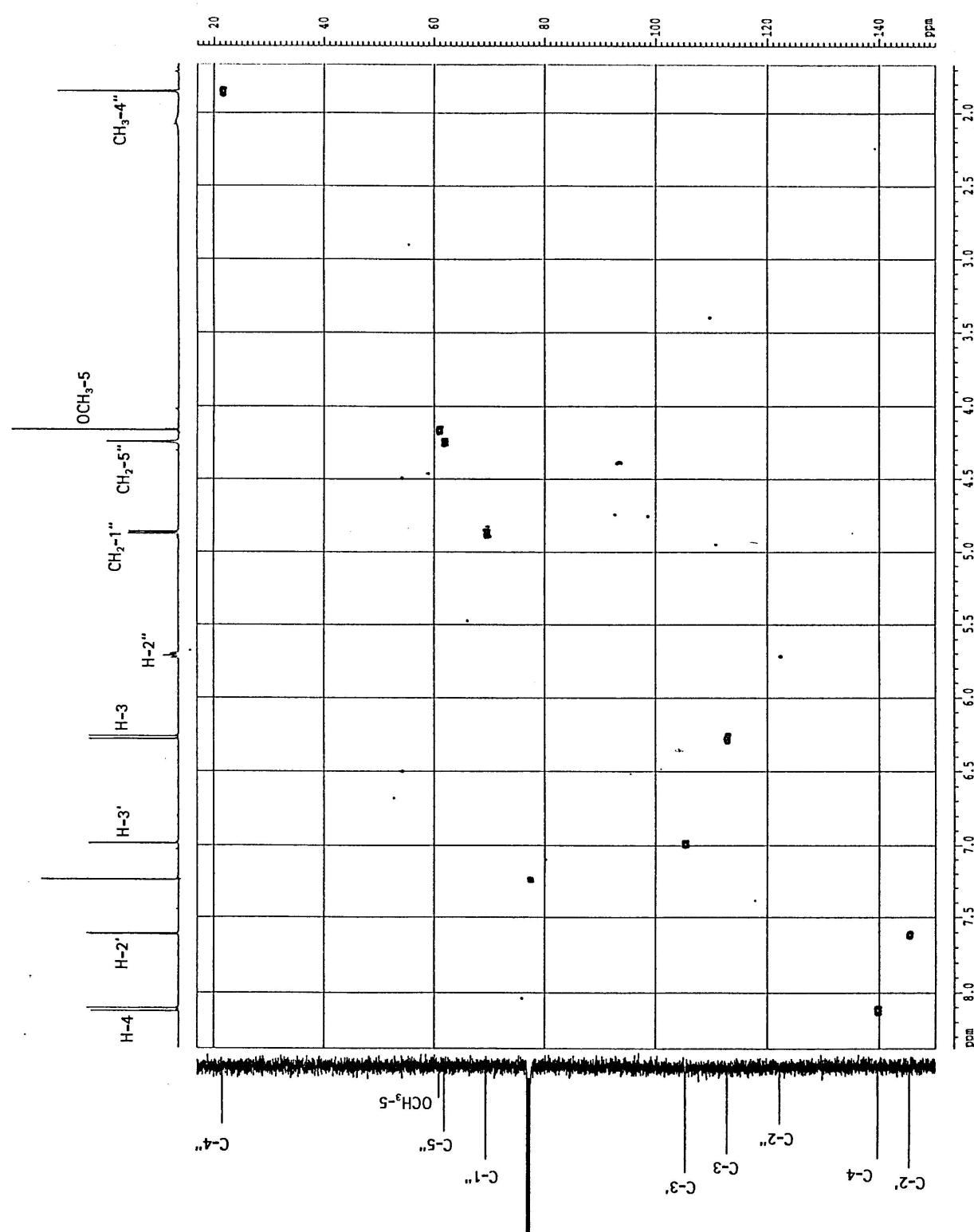


Abb. 9.12: HMQC145Hz-Spektrum von 5-Methoxy-8-(5"-hydroxy)-prenyloxypsonalen
(aufgenommen in CDCl₃; 500 MHz)

Liste der verwendeten Abkürzungen:

AMP/ATP	Adenosinmonophosphat/Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD ₃ OD	Deuteromethanol
CDCl ₃	Deuterchloroform
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHS	Chalconsynthase
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	chemische Verschiebung (angegeben in ppm)
d	Dublett
D ₂ O	Deuteriertes Wasser
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Doppeldublett
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Electron Impact
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
GC	Gaschromatographie
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
HMQC	Hetero Nuclear Multiple Quantum Coherence (Correlation)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HOAc	Essigsäure
HSCoA	Coenzym A
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IC ₅₀	50% Inhibition Concentration
I _{sc}	Äquivalenter Kurzschlußstrom
I _{test}	Teststrompuls
J	Kopplungskonstante
LM	Lösungsmittel
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
m	Multiplett
m/z	Masse pro Ladungseinheit
MeCN	Acetonitril
MEK	Methylethylketon
MeOH	Methanol
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
MIC	Minimum Inhibition Concentration
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NP	Normal Phase
p.A.	pro analysi
PAL	Phenylalaninammoniaklyase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Petrolether
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ppm	Parts Per Million
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase
rpm	Rounds Per Minute
R _{te}	Transepithelialer Widerstand
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
SDS	Sodiumdodecylsulphate
t	Triplet
TMS	Trimethylsilan
VLC	Vacuum Liquid Chromatography
V _{te}	Transepitheliales Potential