

Studie über die Einnahme
von
Weidenrinden-Extrakt, Salicin und Salicortin
sowie Synthesen
von
Salicylsäure-Glycosiden und Salicin-Analoga

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Tanja Buß
aus Lich

Marburg/Lahn

2005

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter:

Prof. Dr. P. Imming

Zweitgutachter:

Prof. Dr. G. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung:

07.12.2005

Die vorliegende Arbeit entstand
am Institut für pharmazeutische Chemie
des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Peter Imming

Für sein Interesse an dieser Arbeit, seine stets großzügige Unterstützung und die anregenden Diskussionen möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Imming an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Seitz möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens
sehr herzlich danken.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H Seyberth, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Erlaubnis, das Eicosanoidlabor zur Durchführung der *in-vivo*-Untersuchungen und zur LC-/MS-Analytik zu benutzen.

Herrn B. Watzer, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg, danke ich ganz herzlich für die wertvollen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit, sowie für die Unterstützung bei den *in-vivo*-Untersuchungen und die Durchführung der LC-/MS-Analytik.

Frau Caroline Knob, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Überwachung der Probanden während der *in-vivo*-Untersuchungen.

Meinen Probanden danke ich für die „mutige“ Teilnahme an den *in-vivo*-Untersuchungen.

Der Firma Robugen GmbH, Esslingen, insbesondere Herrn Dr. B. Hempel, danke ich für die fachliche und materielle Unterstützung dieser Arbeit. Der Firma Martin Bauer GmbH, Vestenbergsgreuth, besonders Dr. Hans-Jürgen Hannig danke ich für die Bereitstellung von Drogenmaterial. Der Bodenhausen-Stiftung, Bad Arolsen, danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. B.H. Meier danke ich für die fachliche Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit.

Folgenden Studenten danke ich für die hilfreiche Mitarbeit im Rahmen der so genannten Literatuarbeit (in chronologischer Reihenfolge): Tim Freiburger, Katja Griesing, Johanna Kanzer, Nicole Tietze, Anke Ottermann, Katrin Reuber. Besonders danke ich der Literaturarbeiterin Anna Fick, die außerdem einige Wochen als wissenschaftliche Hilfskraft an dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Auch den Mitarbeitern des Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Insbesondere Herrn Stephan Newel und Frau Susanne Lüttebrandt von der NMR-Abteilung, sowie Frau Nina Zitzer von der MS-Abteilung danke ich für die Erfüllung zahlreicher Sonderwünsche. Frau Claudia Cloos danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, sowie das gute Arbeitsklima. Vor allem danke ich Konstanze An, Peter Block, Paul Czodrowski, Flores van Elsäcker, Daniela Heller, Uta Hülsermann, Sascha Illgner, Achim Meyer, Christian Rack, Mai Ramadan, Tobias Rogosch, Sonja Schleich und dem Team der Schiffenberg-Apotheke, ohne die mir vieles gefehlt hätte.

Lieben Dank an meine Freunde Stefan Böhm, Sebastian Fischer, Anke Junker und Marcus Winter.

Herzlichen Dank an meinen Freund Tobias Stock, der mir mit viel Geduld und Unterstützung zur Seite gestanden hat.

Herzlichen Dank an meine Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mir den nötigen Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit geboten haben.

Für meine Familie

**Das Leben kann nur rückwärts verstanden,
muss aber vorwärts gelebt werden.**

S. Kierkegaard

Inhaltsverzeichnis

I.	THEORETISCHER TEIL.....	1
1.	Einleitung	1
2.	Die Weide.....	2
3.	Die Weidenrinde	7
3.1	Anwendung der Weidenrinde.....	7
3.2	Monographien von Weidenrinde.....	8
3.3	Wirkmechanismus von Salicin.....	9
4.	Zielsetzung.....	13
5.	Vergleichende Studie über die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, β-Salicin und Salicortin..	15
5.1	Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt	15
5.1.1	<i>Beurteilung der Wirksamkeit mittels verschiedener Schmerzindices</i>	<i>15</i>
5.1.2	<i>Beurteilung der Wirksamkeit mittels Salicylsäure-Konzentration im Blut.....</i>	<i>17</i>
5.2	In-vivo-Untersuchung von Salicin und Weidenrinden-Extrakt an Ratten	19
5.3	Schlussfolgerungen zur Untersuchung der Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt	20
5.4	Salicortin	21
5.4.1	<i>In-vitro-Untersuchungen mit Salicortin.....</i>	<i>21</i>
5.4.2	<i>Extraktion und Isolierung von Salicortin.....</i>	<i>23</i>
5.5	Salicoylsalicin	24
5.6	Klinische Studie	25
5.6.1	<i>Orale Gabe von Weidenrinden-Extrakt, β-Salicin und Salicortin.....</i>	<i>25</i>
5.6.2	<i>Plasmaspiegelkurven der Salicylsäure</i>	<i>25</i>
5.6.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	<i>29</i>
5.6.4	<i>Schlussfolgerung.....</i>	<i>31</i>
6.	Antibakterielle Wirksamkeit von Salicylsäure und verschiedenen Salicylsäure-Metaboliten.....	33
7.	Synthese verschiedener Salicin-ähnlicher Glykoside.....	36
7.1	Synthese geschützter Zucker	39
7.1.1	<i>1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-α-D-glucopyranose</i>	<i>40</i>
7.1.2	<i>2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-glycopyranosylbromide</i>	<i>40</i>
7.2	α - β -Glycoside.....	42
7.2.1	<i>Salicylsäure-β-glycopyranosid-Synthesen</i>	<i>42</i>
7.2.2	<i>Salicylsäure-α-glycopyranosid-Synthese</i>	<i>43</i>
7.2.3	<i>α-β-Salicin-Synthesen</i>	<i>44</i>
8.	In-vitro-Untersuchungen des α-Salicins.....	49
8.1	Behandlung mit künstlichem Magensaft	49
8.2	Behandlung mit künstlichem Darmsaft	49
9.	Salicylsäurearachidonat	50
9.1	Synthese des Salicylsäurearachidonats.....	51
10.	Zusammenfassung und Ausblick.....	52

III. EXPERIMENTELLER TEIL	53
1. Allgemeine Vorbemerkungen	53
1.1 Allgemeines.....	53
1.2 Chromatographie.....	53
1.3 Analytik.....	53
1.4 Chemikalien und Materialien	54
2. Vorschriften und Daten zur klinischen Studie	56
2.1 Isolierung von Salicortin aus Weidenrinde	56
2.2 Herstellung von Salicylsalicin.....	58
2.3 Klinische Studie	60
2.3.1 Einnahme von Weidenrinden-Extrakt	61
2.3.2 Einnahme von β -Salicin.....	62
2.3.3 Einnahme von Salicortin.....	63
2.3.4 Analytik.....	64
2.3.5 Validierung	67
3. Synthesevorschriften	71
3.1 Zuckerderivate.....	71
3.1.1 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-glucopyranose	71
3.1.2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl-bromid	73
3.1.3 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-bromid	75
3.1.4 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -L-glucopyranosyl-bromid	77
3.2 Glykoside	79
3.2.1 Salicylsäure- β -D-glucopyranosid.....	79
3.2.2 Salicylsäure- β -D-galactopyranosid.....	83
3.2.3 Salicylsäure- β -L-glucopyranosid.....	87
3.2.4 Salicylsäure- α -D-glucopyranosid.....	91
3.3 Salicin-Synthesen	95
3.3.1 Acetylierung von Saligenin	95
3.3.2 β -Salicin.....	97
3.3.3 Galactose-Analogon von β -Salicin	99
3.3.4 α -Salicin	101
4. Synthese des Salicylsäurearachidonats.....	107
IV. LITERATURVERZEICHNIS	109
V. ANHANG	114
1. Verzeichnis der Abkürzungen:.....	114

I. Theoretischer Teil

1. Einleitung

Die Weide zählt zu den ältesten Arzneipflanzen Europas. Bereits in der Antike empfahl Hippokrates (460-377 v. Chr.) Extrakte aus der Weidenrinde (*Salix alba*) bei Schmerzen und Fieber. Auch Plinius (23-79 n. Chr.), Dioskurides (40-80 n. Chr.) und Galen (ca. 129-199 n. Chr.) beschrieben verschiedene medizinische Anwendungen der Rinde (Wagner et al., 2003).

Der englische Geistliche Edward Stone berichtete 1763 in einem Brief an die Royal Society über den erfolgreichen Einsatz von Weidenrinden-Extrakt bei fieberhaften Erkrankungen (Stone, 1763). 1828 isolierte Buchner das Phenolglycosid Salicin aus Weidenrinde (Buchner, 1828). Die Bezeichnung Salicin leitet sich von der botanischen Ordnungsbezeichnung Salicales ab. 1831 zeigte Buchner die Wirkung der Reinsubstanz Salicin bei Fieber auf (Buchner, 1831). Der schottische Arzt T. J. Maclagan berichtete 1896 in seinem Werk „Rheumatism; Its Nature, Its Pathology And Its Successful Treatment“ von einer Salicin-Gabe zur Behandlung von akutem rheumatischem Fieber (Maclagan, 1896).

Dem Italiener Raffaele Piria gelang 1838 die Gewinnung von Salicylsäure aus Salicin. Der deutsche Chemiker Kolbe synthetisierte 1859 erstmals Salicylsäure. Mit der Synthese von Acetylsalicylsäure durch Hoffmann im Jahr 1897 und dem Verkauf des Fertigarzneimittels Aspirin® verlor die Weidenrinde zunächst an Bedeutung. Erst in den letzten Jahren rückte sie im Rahmen der modernen Phytotherapie wieder verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (Wagner et al., 2003).

2. Die Weide

Die Familie der Weidengewächse (Salicaceae) umfasst die bekannten Gattungen *Salix* (Weiden) und *Populus* (Pappeln) und die auf Nordostasien begrenzten Gattungen *Chosenia* und *Toisusu* (Egloff, 1982).

Die systematische Gliederung der Weidenarten ist durch ihre Fähigkeit zur Bastardisierung und Bildung fertiler Hybriden sehr schwierig. In der Literatur werden zwischen 350 und 500 Weidenarten benannt, von denen etwa 50 in Mitteleuropa vorkommen.



Abb. 1: Foto von *Salix purpurea* L.

Die Gattung *Salix* weist eine für Holzgewächse einmalige Arten- und Formenvielfalt auf. Man findet sie als hohe Bäume des Auwaldes und als Sträucher verschiedener Größe bis hin zu den Zwergsträuchern an der Waldgrenze der Hochgebirge vor.

Die Blütenstände bestehen aus Kätzchen (Ähren). Blühbeginn ist im Vorfrühling, bei einigen Arten vor dem Laubaustrieb. Die Blüten sind in der Regel eingeschlechtlich (zweihäusig) und von einem ungeteilten Tragblatt gestützt. Die männlichen Blüten besitzen 2-5 (unter

Umständen sogar bis zu 24) Staubbeutel, die meist gelb oder rötlich gefärbt sind. Die weiblichen Blüten haben einen länglichen, aus zwei Fruchtblättern bestehenden einfächerigen Fruchtknoten.

Die Frucht ist eine zweiklappig aufspringende, flachspaltige Kapsel (Meier und Meier-Liebi, 1998).

Die Samen sind nur knapp 1.5 mm lang und mit feinen Härchen versehen. Die Samenreife ist meist schon Ende Mai oder Anfang Juni abgeschlossen.

Mit Ausnahme der Salweide (*Salix caprea* L.) haben die Weiden auch eine sehr ausgeprägte Fähigkeit zur vegetativen Vermehrung, was die Gewinnung von Drogenmaterial mit gleichem Inhaltsstoffspektrum vereinfacht.



Abb. 2: Zeichnung von *Salix purpurea* L. aus Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz
A: Kätzchen vor Blühbeginn; B: Blüten ♂, C: Blüten ♀, D: Blätter; 1: Staubbeutel, 2: Kapsel Frucht

Pharmazeutische Anwendung findet hauptsächlich die Weidenrinde bestehend aus der ganzen oder geschnittenen getrockneten Rinde junger oder einjähriger Triebe.

Für die Rindengewinnung geeignete Weiden sind 6-10 m hohe Bäume oder Sträucher, die zum Teil kultiviert werden.

Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe kann je nach Weidenart stark variieren. Innerhalb einer Art unterscheidet sich das Inhaltsstoffspektrum jedoch meist nur quantitativ.

Hauptinhaltsstoffe der Rinde sind die Phenolglycoside, Flavonoide und Catechin-Gerbstoffe.

Phenolglycoside:

Salicin war das erste Phenolglycosid, welches im Jahr 1828 von Buchner aus der Weidenrinde isoliert wurde. Lange Zeit hielt man Salicin für das Hauptglycosid der Weidenrinde, aber nach neuem Erkenntnisstand liegt es genuin in der Pflanze nur in geringen Mengen vor (unter 1% des Trockengewichts). Der hohe Gehalt an Gesamt-Salicin in der Rinde von bis zu 16% ist vielmehr auf die Ester des Salicins, wie 2'-O-Acetylsalicin, Salicortin, Tremulacin und 2'-O-Acetylsalicortin (Abb. 3) zurückzuführen, die nach alkalischer Hydrolyse den Gesamt-Salicingehalt ergeben.

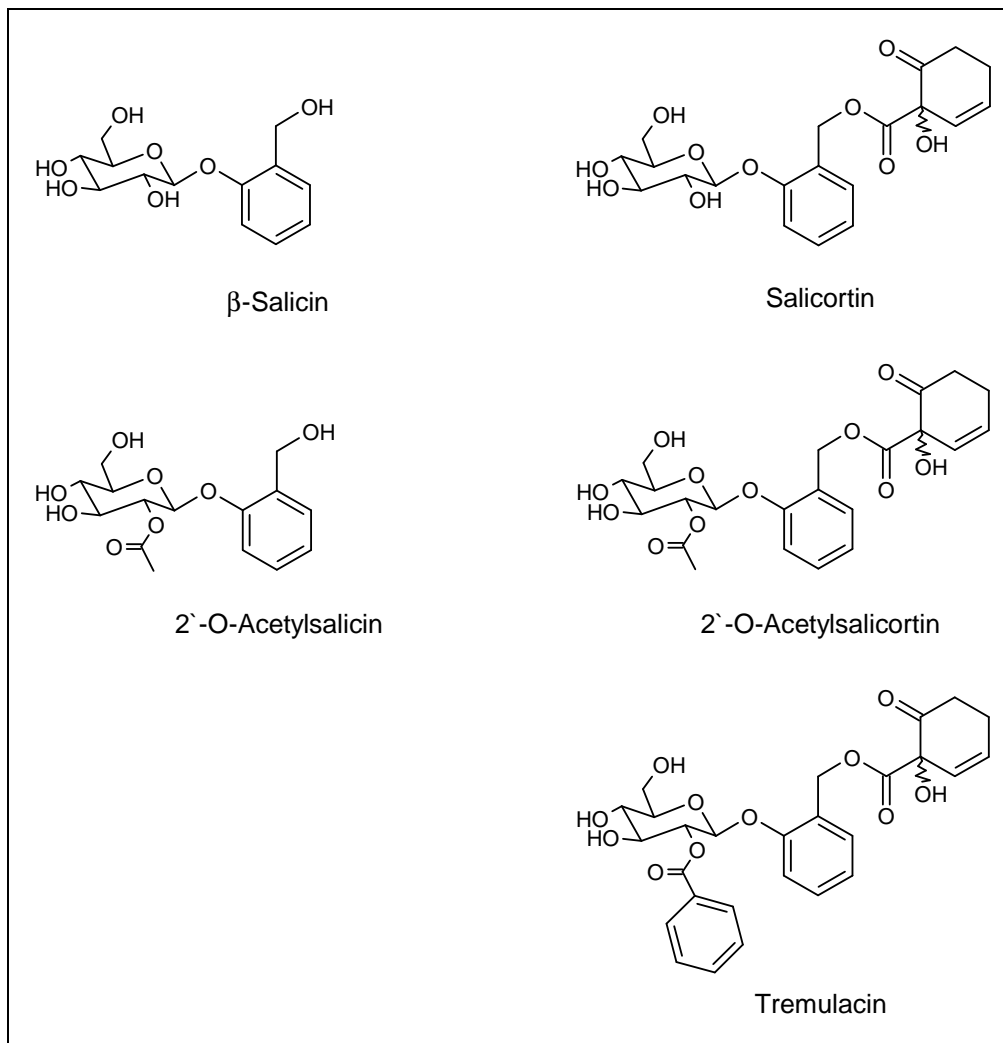


Abb. 3: wichtige Phenolglycoside der Weidenrinde

Der Weide dienen diese Phenolglycoside zur Abwehr von Pflanzenfressern. Die verschiedenen Salicin-Ester werden nach Zerstörung von Zellkompartimenten durch einen alkalischen pH-Wert oder durch Blatt-Enzyme abgebaut. Die dabei entstehenden Substanzen, wie z. B. Salicin, Catechol und 6-Hydroxy-2-cyclohexenon, wirken auf Insekten als Abwehrstoffe (Lindroth und Pajutee, 1987; Ruuhola et al., 2003).

Freie Salicylsäure konnte bisher in Weidenrinde nicht nachgewiesen werden (Meier und Meier-Liebi, 1998; Soto und Larque-Saavedra, 1982).

Weitere eher vereinzelt vorkommende Phenolglycoside sind Picein, Syringin, Triandrin, Vimalin, Salireprosid, Salidrosid und Purpurein (Abb. 4) (Meier und Meier-Liebi, 1998).

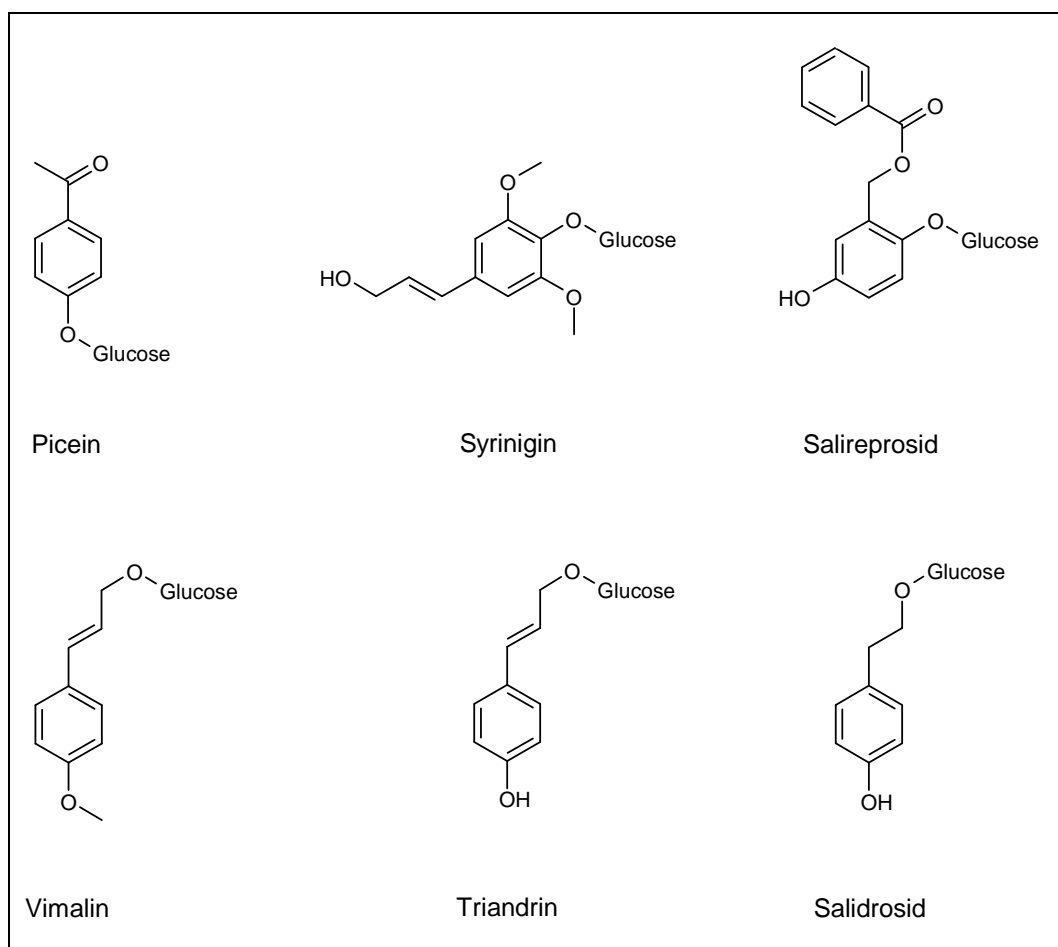


Abb. 4: weitere Phenolglycoside der Weidenrinde

Flavonoide:

In der Rinde der Salicaceen findet sich Narigenin-5-glucosid und Isosalipurpursid. In den äußersten Schichten der Weidenrinde wurden außerdem verschiedene Anthocyane, wie Cyanidin-3-glucosid, Delphinidin-3-glucosid und Petunidin-3-glucosid identifiziert (Meier und Meier-Liebi, 1998).

Catechin-Gerbstoffe:

Die Familie der Salicaceen zählt zu den polyphenolreichen Sippen. Hauptsächlich handelt es sich bei den Gerbstoffen um Catechinderivate ((+)-Catechin und in geringen Mengen (-)-Epicatechin).

Mittels des Hauptpulververfahrens wurden Polyphenolkonzentrationen zwischen 8 und 20% bestimmt (Meier und Meier-Liebi, 1998).

3. Die Weidenrinde

3.1 Anwendung der Weidenrinde

Pharmazeutische Anwendung findet die Weidenrinde heutzutage bei leichten fieberhaften Erkältungs- und Infektionskrankheiten, akuten und chronischen rheumatischen Beschwerden, leichten Kopfschmerzen und bei durch Entzündungen bedingten Schmerzen (Wichtl, 2002).

Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt befinden sich derzeit 4 Weidenrinden-Monopräparate. Assplant® der Firma Robugen, Assalix® der Firma Bionorica und Rheumakaps® der Firma Steigerwald enthalten 60 mg Salicin pro Tablette. Salix Bürger® der Firma Ysatisfabrik ist eine wässrige Zubereitung und enthält pro ml ca. 20 mg Salicin (Rote Liste 2005).

Alle Weidenrindenpräparate sind auf einen Gesamt-Salicingehalt standardisiert. Das bedeutet, dass die in der Droge vorliegenden Salicin-Ester vor Bestimmung des Gesamt-Gehaltes im basischen Milieu hydrolysiert werden.

Bereits in der Antike fand die Weidenrinde Anwendung. Allerdings kannte man eine Unterscheidung zwischen akuten und chronischen rheumatischen Beschwerden bis ins 19. Jahrhundert hinein noch nicht.

Man verstand unter dem Krankheitsbild „Rheuma“ eine Überproduktion von kaltem Schleim, einem der vier Säfte in der Krankheitslehre der Humoralpathologie, welcher in den Extremitäten und Gelenken ein schmerzhaftes „Fließen“ hervorrief. Hinter dem Begriff „rheumata“ verbarg sich eine große Anzahl von Krankheitsbildern, darunter fielen die rheumatischen Erkrankungen, aber z. B. auch Katarrhe (Voll, 1999).

Erst 1836 verfasste der Pariser Arzt Jean-Baptiste Bouillaud die erste vollständige Beschreibung des akuten rheumatischen Fiebers (ARF), stellte eine Beziehung her zwischen ARF und Karditis und grenzte diese Erkrankung damit von dem chronischen Gelenkrheumatismus ab (Britannica Concise Encyclopedia, 2005).

Bei der Behandlung von rheumatischen Erkrankungen wurde also zunächst nicht nach Ursache unterschieden, sondern vielmehr verfolgte man eine experimentelle Therapie.

Die Weidenrinde wurde demnach bei zwei völlig unterschiedlichen Erkrankungen eingesetzt, die zwar beim Patienten zum Teil ähnliche Symptome hervorrufen, aber verschiedener Ätiologie sind.

Bei akutem rheumatischem Fieber handelt es sich um eine Zweiterkrankung nach einer Streptokokken-Infektion. Ausgelöst durch den bakteriellen Erreger kommt es zu entzündlichen Veränderungen unter anderem der großen Gelenke.

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche überwiegend die Gelenke befällt. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Autoimmunerkrankung (Mutschler et al., 2001).

Auf beide Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und die eventuell unterschiedliche Wirkweise der Weidenrinde wird in Kapitel 6 noch genauer eingegangen.

3.2 Monographien von Weidenrinde

1984 bewertete die Kommission E des damaligen Bundesgesundheitsamtes die Weidenrinde positiv. Für die Rinde wurde ein Gesamt-Salicingehalt von 1% gefordert. Die mittlere Tagesdosis sollte 60-120 mg betragen (Monographie-Kommission E, 05.12.1984).

1991 wurde die Monographie der Weidenrinde (*Salicis cortex*) in das Deutsche Arzneibuch (DAB 10) aufgenommen (Kaul und Lagoni, 1999). Nach dem DAB besteht Weidenrinde aus der im Frühjahr gesammelten, ganzen, geschnittenen oder gepulverten, getrockneten Rinde junger Zweige von *Salix purpurea* L., *Salix daphnoides* Villars oder anderen *Salix*-Arten, die dem geforderten Gehalt von 1% Gesamt-Salicin entsprechen (DAB 10, 1991).

1997 wurde die Monographie der Kommission E durch die Europäische Monographie Willow bark von der European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) aktualisiert und bestätigt. Die Tagesdosis wurde auf 240 mg heraufgesetzt (ESCOP-Monographie, 1997).

Nach der aktuellen Monographie des europäischen Arzneibuchs besteht *Salicis cortex* aus der ganzen oder geschnittenen, getrockneten Rinde junger Zweige oder aus getrockneten Stücken junger Zweige einer Vielzahl von Arten der Gattung *Salix*, die *Salix purpurea* L., *Salix daphnoides* Villars und *Salix fragilis* L. einschließen und den geforderten Gesamt-Salicingehalt von 1.5% aufweisen (Ph.Eur. 5, 2005).

3.3 Wirkmechanismus von Salicin

Das genuin nur in geringen Mengen vorkommende Salicin sowie seine Ester Salicortin, Tremulacin und 2'-O-Acetylsalicortin dienen als Prodrugs, die zur eigentlichen Wirkform Salicylsäure erst im Körper verstoffwechselt werden.

Die Ester werden größtenteils bei der Extrakterstellung und zu einem geringen Teil durch den alkalischen pH-Wert des Darms zu Salicin hydrolysiert (Abb. 5) (Meier, 1987).

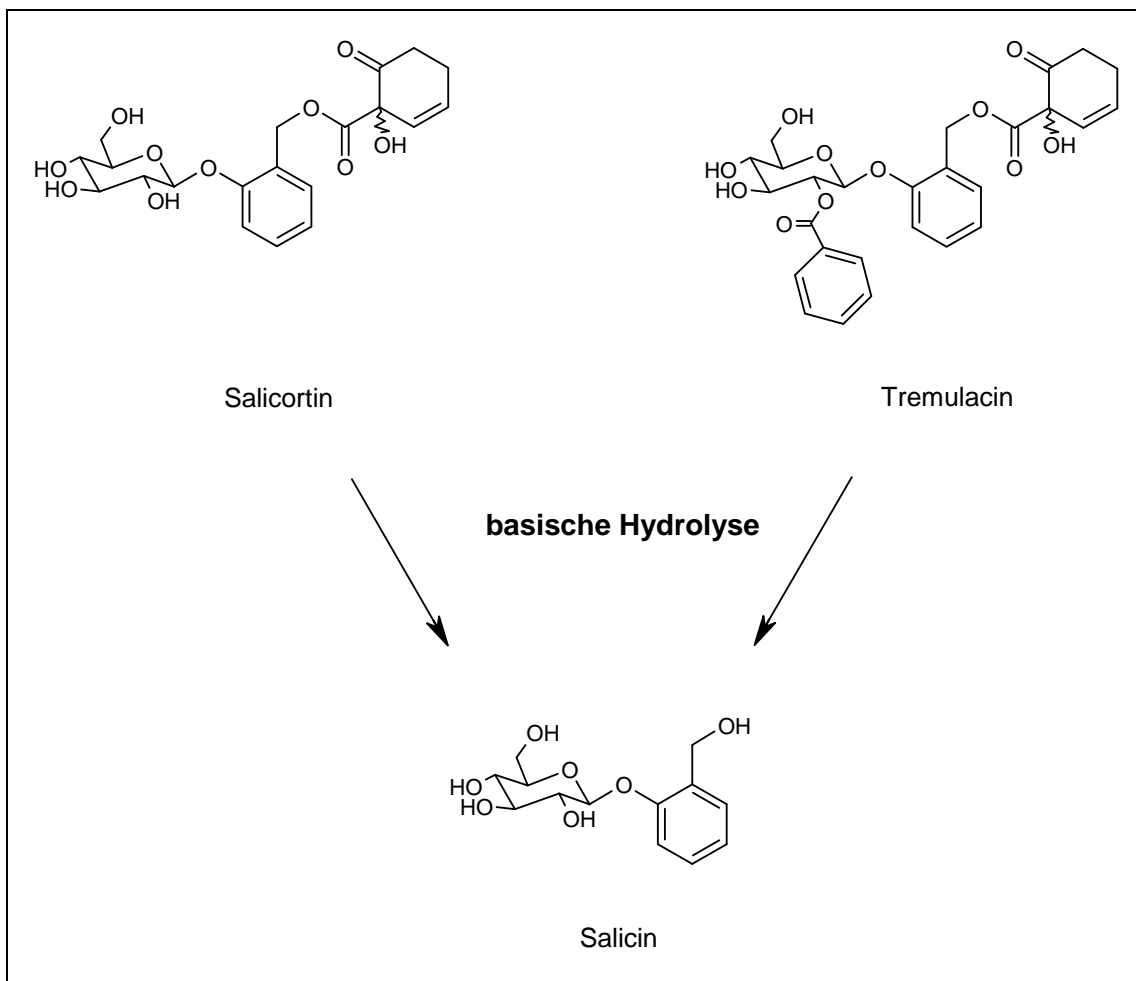


Abb. 5: basische Hydrolyse der Salicin-Ester

Der Mechanismus der Verstoffwechslung von Salicin zur Salicylsäure im Menschen basiert weitestgehend auf Vermutungen. Einige *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass Salicin zunächst durch β -Glucosidasen im Darm in Salicylalkohol (Saligenin) und Glucose gespalten wird und anschließend das Aglykon resorbiert und im Körper zu Salicylsäure oxidiert wird (Abb. 6).

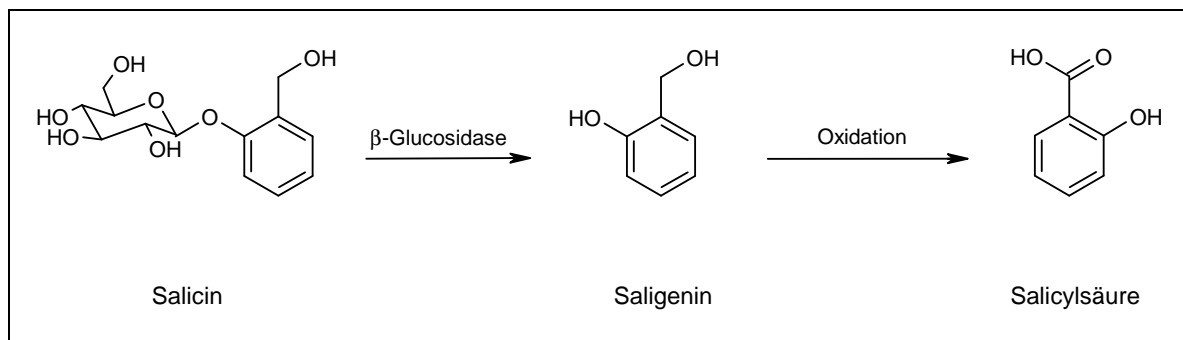


Abb. 6: Bioaktivierung von Salicin

Untersuchungen von Steinegger haben gezeigt, dass Salicin weder durch Mundspeichel noch durch den sauren pH-Wert des Magens gespalten werden kann (Steinegger und Hövel, 1972). Um das Verhalten von Salicin im sauren pH-Bereich des Magens zu untersuchen, wurde eine 0.5% Salzsäure-Lösung verwendet. Diese Konzentration entspricht einem pH-Wert von ca. 1-2. Im nüchternen Magen liegt der pH-Wert etwa bei 5, während der Verdauung liegt er infolge der Salzsäure-Sekretion bei 1-2. Allerdings findet sich dieser Wert im gefüllten Magen nur in Nähe der Magenwand. Im Mageninneren liegen meist höhere Werte vor. Das intakte Glucosid scheint demnach den Magen unverändert zu verlassen, da *in vitro* drastischere Bedingungen gewählt wurden, als sie *in vivo* vorliegen.

Durch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kann bestätigt werden, dass Salicin weder durch künstlichen Magensaft noch durch künstlichen Darmsaft, hergestellt nach den Vorschriften der USP (USP24-NF19, 2000), gespalten wird.

Bei weiteren Untersuchungen von Steinegger wurde Salicin bei Menschen rektal appliziert, resorbiert, aber unverändert wieder ausgeschieden. Auch die parenterale Applikation am Hund (Steinegger und Hövel, 1972) bzw. an der Ratte (Fötsch et al., 1989) führte zu einer weitgehend unveränderten renalen Elimination des Glucosids. Es konnte also nicht durch Enzyme des Blutes oder der Leber gespalten werden.

Untersuchungen an Ratten haben ergeben, dass Salicin im Organismus der Ratte durch bakterielle Enzyme des Darms gespalten wird. Im Darm antibiotisch vorbehandelter (Fötsch et al., 1989) bzw. keimfreier (Akao et al., 2002) Ratten findet eine Glycosid-Spaltung nicht statt. Im Unterschied zur Ratte besitzt der Mensch neben den β -Glucosidasen der Darmflora auch intestinale β -Glucosidasen (de Graaf et al., 2003), die ebenfalls zur Spaltung des Glucosids führen können. Welche der beiden Glucosidase-Spezies dabei die größere Aktivität zeigt, wurde bisher nicht untersucht. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine antibiotische

Behandlung und damit einhergehende Schädigung der Darmflora die Spaltung des Salicins negativ beeinflussen könnte.

Unterschiede zwischen dem menschlichen Organismus und der Ratte finden sich des Weiteren in der Absorption des Aglykons Saligenin und der Oxidation zur Salicylsäure. Während bei Ratten die maximale Salicylsäure-Konzentration im Blut erst nach 5 bis 7 Stunden erreicht ist, kommt es beim Menschen bereits nach 3 bis 4 Stunden zu Salicylsäure-Maxima (Pentz et al., 1989; Schmid et al., 2001; Steinegger und Hövel, 1972). Das bedeutet, dass anders als in der Ratte die Hydrolyse des Salicins nicht erst in den unteren Darmabschnitten, sondern bereits in dem oberen Dünndarmabschnitt stattfinden muss. Die Passagezeit für den Dünndarm beträgt ca. 4 Stunden (Mutschler et al., 2001). Der Dünndarm scheint daher das Hauptorgan für die Resorption des Salicylalkohols zu sein. Aber auch eine weitere Resorption des Aglykons im Dickdarm ist möglich, da die Resorptionsverhältnisse des Dickdarms qualitativ denen des Dünndarms entsprechen, doch die Resorptionsfläche ist wegen des Wegfalls der Zotten erheblich kleiner (Mutschler et al., 2001).

Die Oxidation des freigesetzten Salicylalkohols bleibt weiter im Unklaren. Denkbar ist eine Oxidation schon während der Resorption durch die Darmschleimhaut, aber ebenso eine Oxidation durch das Enzymsystem Cytochrom-P-450 in der Leber, zu der oral applizierte Wirkstoffe nach der Resorption über die Pfortader gelangen.

Da der Gehalt an Salicin-Derivaten die Wirkung der Weidenrinden-Extrakte nicht ausreichend erklären kann, wird in einigen Veröffentlichungen die Wirksamkeit auf den Synergismus der verschiedenen Inhaltsstoffe zurückgeführt (Chrubasik, 2000; Nahrstedt, 2000). Nach neusten Ergebnissen wurde für den Extrakt BNO 1455, der zur Herstellung des Weidenrinden-Präparates Assalix verwendet wird, eine anxiolytische und antidepressive Wirkung auf Nager nachgewiesen (Vortrag von M. Hegger über zentralnervöse Effekte des Salixextraktes BNO 1455 auf der Tagung „Phytopharmaka und Phytotherapie 2005“ in Berlin). Diese komplexen Wirkmechanismen konnten jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht auf definierte Inhaltsstoffe zurückgeführt werden.

Mit großer Wahrscheinlichkeit beruht die Wirksamkeit des Weidenrinden-Extrakts hauptsächlich auf dem Phenolglycosid Salicin als Prodrug von Salicylsäure.

Die anschließende Biotransformation und Elimination verläuft analog zu den synthetisch hergestellten Salicylaten. Nach oraler Applikation von Salicin bzw. Weidenrinden-Extrakt wird neben Salicylsäure und Gentsinsäure Salicylursäure als Hauptmetabolit ausgeschieden (Schmid et al., 2001; Steinegger und Hövel, 1972).

4. Zielsetzung

In den letzten Jahren rückte die Weidenrinde erneut in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Mit dem Auftreten der unerwünschten Nebenwirkungen der nicht-steroidalen Antirheumatika wuchs das Interesse an pflanzlichen Alternativen.

Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass die Verabreichung von Salicin als intaktes Glucosid lokal keine Reizung der Magenschleimhaut hervorruft. Bei der Gabe von Saligenin und Natriumsalicylat gleicher Konzentration kam es dagegen zu starken Läsionen der Magenwand (Akao et al., 2002). Das Glucosid dürfte daher bei oraler Applikation am Menschen deutlich verträglicher sein als seine synthetisch hergestellten Alternativen.

Die schmerzstillende Wirkung der Weidenrinde wurde in etlichen Studien untersucht. Die aus dem Extrakt freigesetzte Salicylsäure besitzt analgetische und anti-inflammatorische Eigenschaften. Ob jedoch die aus dem Weidenrinden-Extrakt freigesetzte Menge an Salicylsäure für einen analgetischen Effekt ausreicht, konnte jedoch bisher nicht endgültig belegt werden. Der guten Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt bei chronischen Rückenleiden (Chrubasik et al., 2000; Chrubasik et al., 2001) oder Knie- und Hüftgelenkarthrose (Schmid et al., 2000) stehen zwei Studien mit keiner signifikanten Verbesserung der Beschwerden bei Einnahme von Weidenrinden-Extrakt bei Cox- und Gonarthrose-Patienten und bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Biegert et al., 2004) und geringe Plasamkonzentrationen an Salicylsäure bei der Einnahme von Weidenrinden-Extrakt im Vergleich zur Einnahme von ASS gegenüber (Schmid et al., 2001).

In den aufgeführten Studien wurde ein auf Salicin standardisierter Weidenrinden-Extrakt verwendet. Der Wirkmechanismus sowohl des komplexen Extraktes als auch des Glucosids Salicin ist jedoch noch nicht exakt aufgeklärt. Dass β -Glucosidasen Salicin in Saligenin und Glucose spalten, kann durch die in Kapitel 3.3 besprochenen Tierversuche als gesichert angenommen werden. Bei der Verabreichung eines Extraktes, der neben Salicin und Salicin-Ester noch eine Vielzahl von anderen Inhaltsstoffen enthält, stellt sich die Frage, inwiefern die anderen Inhaltsstoffe die Wirkung der „Salicylate“ beeinflussen könnten.

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch, Institut für pharmazeutische Chemie, Marburg, wurde das Enzym β -Glucosidase durch Zugabe von isolierten Gerbstoffen aus einer Lösung ausgefällt. Dieser Versuch weist auf eine Hemmung der β -Glucosidase durch Gerbstoffe hin. Dass Gerbstoffe Proteine fällen und somit „unbrauchbar“ machen, ist in der Literatur seit langem bekannt (Bate-Smith und Swain, 1957). Gerbstoffe des Catechin-Typs konnten auch

in Weidenrinde nachgewiesen werden (Meier und Meier-Liebi, 1998). Daraus ergibt sich die Frage, ob man höhere Salicylsäure-Plasmaspiegel durch eine Einnahme von Salicin als Reinsubstanz erreicht?

Salicin liegt je nach Weidenart genuin nur in geringen Mengen vor. Der hohe Salicingehalt der Droge geht hauptsächlich auf den Salicin-Ester Salicortin zurück. Bei der Herstellung von Weidenrinden-Extrakt hängt der Salicortingehalt von der Art der Aufbereitung ab. Inwiefern beeinflusst ein hoher Salicortingehalt im fertigen Extrakt den Plasmaspiegel der Salicylsäure? Wird der Ester im Darmtrakt schnell genug gespalten, um als Salicin weiter verstoffwechselt zu werden? Oder entsteht *in vivo* ein anderes Produkt als Salicin?

Diese Fragen sollen durch eine vergleichende Studie beantwortet werden. Dazu wird vier freiwilligen Probanden eine wässrige Lösung von Weidenrinden-Extrakt, Salicin und Salicortin peroral appliziert und anschließend die Plasmakonzentration von Saligenin und Salicylsäure bestimmt.

Des Weiteren stellte sich die Frage, wie sich bei einer Modifizierung des Salicin-Glycosids die Hydrolyse von Salicin zu Saligenin verändert. Bei dem in der Weidenrinde enthaltenen Salicin handelt es sich um ein β -Glucosid. Wird ein synthetisch hergestelltes α -Salicin schneller hydrolysiert und steht somit das Aglykon schneller zur Absorption zur Verfügung? Kann man durch Gabe von α -Salicin eine höhere Plasmakonzentration an Salicylsäure erreichen?

Dazu sollen verschiedene Glycoside synthetisch hergestellt werden. Ausgehend von bereits bekannten Synthesen der Salicylsäure-Glucoside soll ein Synthese-Weg zu Herstellung von α -Salicin gefunden werden. Nach erfolgreicher Herstellung soll das α -Glucosid verschiedenen *in-vitro*-Untersuchungen unterzogen werden.

Außerdem soll die Wirksamkeit des Weidenrinden-Extrakts bzw. des Salicins bei akutem rheumatischem Fieber untersucht werden. Da es sich bei dieser Erkrankung um eine bakterielle Infektion handelt, sollen Saligenin, Salicylsäure und Metabolite auf ihre antibakterielle Wirksamkeit getestet werden.

Im Rahmen der Untersuchungen in unserem Arbeitskreis über zentrale Angriffsorte von Metaboliten sog. kleiner Analgetika soll außerdem eine Synthese von Salicylsäure-Arachidonsäure-Ester (= Salicylsäurearachidonat) entwickelt und das Produkt zu tierexperimentellen Studien herangezogen werden.

5. Vergleichende Studie über die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, β -Salicin und Salicortin

5.1 Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt

5.1.1 Beurteilung der Wirksamkeit mittels verschiedener Schmerzindices

Zur Wirksamkeit der Weidenrinde bei chronischen Schmerzzuständen wurden in der Vergangenheit verschiedene klinische Studien durchgeführt.

Einige Studien beziehen ihre Ergebnisse dabei auf eine Verbesserung der Schmerzintensität durch verschiedene Schmerzindices.

Von Chrubasik et al. wurden beispielsweise zwei Studien mit standardisiertem Weidenrinden-Extrakt bei akuten Exazerbationen chronischer Rückenschmerzen durchgeführt, deren Ergebnisse auf die Verbesserung eines modifizierten Arhus-Index bezogen wurden. Der Arhus-Index basiert auf der Auswertung bestimmter Fragen an die Patienten z.B. zu den Themen Schmerz, Arbeitsunfähigkeit und körperlicher Beeinträchtigung. In der modifizierten Version wurden die Fragen zur analgetischen Medikation ausgeschlossen, da nur Tramadol als Notfallmedizin erlaubt war. D.h., wenn die Studienpräparate nicht zur Schmerzstillung ausreichen, durfte der Proband zusätzlich ausschließlich Tramadol einnehmen.

In der einen randomisierten, placebokontrollierten Doppelblind-Studie wurde die Wirksamkeit eines standardisierten Weidenrinden-Extrakts der Firma Plantina unterschiedlicher Dosierung bei Verschlimmerung chronischer Rückenschmerzen untersucht. 210 Patienten erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich entweder ein Placebo oder 786 mg Weidenrinden-Extrakt (= 120 mg Salicin) beziehungsweise 1573 mg Weidenrinden-Extrakt (= 240 mg Salicin). Bei ungenügender Schmerzlinderung während des Studienzeitraums durfte zusätzlich Tramadol in einer Dosierung bis zu 400 mg täglich eingenommen werden. Es wurde eine statistisch signifikante, dosisabhängige Wirksamkeit des Weidenrinden-Extrakts im Bezug auf den Anteil schmerzfreier Patienten in der vierten Behandlungswoche und auf die Abnahme des modifizierten Arhus-Schmerzindex` beschrieben (Chrubasik et al., 2000).

In der anderen randomisierten, kontrollierten Studie wurde die Wirksamkeit eines standardisierten Weidenrinden-Extraktes der Firma Plantina im Vergleich zu dem COX-2-Inhibitor Rofecoxib bei akuten Exazerbationen chronischer Rückenschmerzen untersucht.

228 Patienten erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich entweder Weidenrinden-Extrakt (entsprechend 240 mg Salicin) oder 12.5 mg Rofecoxib. Bei beiden Medikationen wurde von einer Verbesserung des modifizierten Arhus-Schmerzindex um ca. 20% berichtet und somit eine therapeutische Äquivalenz angenommen (Chrubasik et al., 2001).

Schmid untersuchte die Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt der Firma Salus-Haus bei Hüft- und Kniegelenksarthrosen mit Hilfe des WOMAC-Index (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index).

Bei diesem Index handelt es sich um einen international anerkannten und validierten Fragebogen mit insgesamt 24 visuellen Analogskalen. Auf den 10 cm langen Skalen markieren die Patienten Ihren Zustand bezüglich Schmerz, Gelenksteifigkeit und körperlicher Funktionsfähigkeit. Es werden 5 Schmerzfragen, 2 Fragen zur Gelenksteifigkeit und 17 Fragen zur körperlichen Funktionsfähigkeit gestellt (Wagner et al., 2003).

In dieser randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie erhielten 78 Patienten über 14 Tage entweder Weidenrinden-Extrakt entsprechend 240 mg Salicin oder ein Placebo. Nach zweiwöchiger Behandlung wurde bei der Weidenrinden-Extrakt-Gruppe eine Verbesserung des WOMAC-Index um 14% festgestellt. Bei der Placebo-Gruppe lag die Verbesserung bei 2%. Ein gewisser Therapie-Effekt ließ sich demnach aufzeigen, jedoch überrascht das Fehlen des Placebo-Effekts in der Kontrollgruppe.

Um den geringen Therapie-Effekt und das Fehlen des Placebo-Effekts genauer zu untersuchen, wurde von Biegert eine Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt der Firma Finzelberg bei Hüft- und Kniegelenksarthrosen mit Hilfe des WOMAC-Index durchgeführt.

Es wurde eine kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie mit 127 Patienten über 6 Wochen durchgeführt. 43 Patienten erhielten Weidenrinden-Extrakt (entsprechend 240 mg Salicin/Tag), 43 Patienten erhielten Diclofenac (100 mg/Tag) und 41 Patienten erhielten ein Placebopräparat. Nach Studienabschluss verzeichnete die Weidenrinden-Extrakt-Gruppe eine Verbesserung des WOMAC-Schmerzindex um 16.7%, die Diclofenac-Gruppe um 46.9% und die Placebo-Gruppe um 10%. Der Behandlungserfolg der Weidenrinde und des Placebos zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied, d. h. die analgetische Wirksamkeit des Weidenrinden-Extrakts konnte in dieser Studie nicht belegt werden (Biegert, 2003).

Da in die Auswertung eines Schmerzindex` immer das subjektive Empfinden der Patienten einfließt, ist die etwas uneinheitliche Datenlage der aufgeführten Studien schwierig zu bewerten. Es fällt jedoch auf, dass in den Studien Weidenrinden-Extrakte verschiedener

Firmen verwendet wurden. Auch wenn die Extrakte auf einen Gesamt-Salicingehalt standardisiert sind, kann die Zusammensetzung an Glucosiden genuin unterschiedlich sein. Der Gesamt-Salicingehalt wird erst nach alkalischer Hydrolyse aller Salicin-Ester bestimmt, d.h. vor allem der Anteil des Hauptglucosids Salicortin kann unterschiedlich hoch sein.

Biegert verglich in ihrer Arbeit den Salicin-Anteil des Studienextraktes von Schmid mit dem von ihr verwendeten Extrakt und stellte genuin eine 1.9-fach höhere Salicin-Konzentration bei nahezu gleichem Gesamt-Salicingehalt in dem von Schmid verwendeten Präparat fest. Je nach gewähltem Extraktionsverfahren können die Salicin-Ester bereits während der Herstellung zu Salicin hydrolysiert werden (Biegert, 2003). Sollte Salicortin *in vivo* nicht schnell genug zu Salicin hydrolysiert werden, kann ein hoher Salicortingehalt im Extrakt nachteilig sein.

5.1.2 Beurteilung der Wirksamkeit mittels Salicylsäure-Konzentration im Blut

Wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert wurde, dient Salicin als Prodrug, dass erst im Körper in die eigentliche Wirkform Salicylsäure umgewandelt wird. Zur Bestimmung des Salicylsäure-Spiegels im Blut nach Einnahme von Weidenrinden-Extrakt bzw. Salicin wurden ebenfalls verschiedene Studien durchgeführt.

Wegbereiter bei der Bestimmung der Salicylsäure-Konzentration im Plasma war 1972 E. Steinegger. In seiner Arbeit wurde zum ersten Mal die Resorption des Salicins, seine Umwandlung zur Salicylsäure und die anschließende Metabolisierung untersucht. Nach oraler Gabe von 4 g (= 13.97 mmol) reinem Salicin erhielt er einen maximalen Salicylsäuregehalt von über 100 mg/l nach 3 Stunden und das Spektrum der Metabolite entsprach dem der Salicylsäure. Außerdem beobachtete er bei dieser Dosierung eine ähnliche Bioverfügbarkeit von Salicin wie nach einer Gabe von 2 g (= 12.49 mmol) Natriumsalicylat (Steinegger und Hövel, 1972). Steinegger trug mit seinen Studien über Salicin maßgeblich zum Verständnis der Wirkungsweise bei, jedoch lässt sich die Einnahme von 4 (!) g Salicin nur schwer mit den folgenden Studien von Schmid und Pentz vergleichen.

In Untersuchungen von Pentz et al. wurde nach Einnahme eines Kombinationspräparates aus Weidenrinden-Extrakt und Colasamen (Zeller Kopfschmerz-Dragees) der Salicylsäure-Spiegel im Blutplasma bestimmt.

Am ersten Versuchstag wurden 12 männlichen Probanden einmalig 3 Dragees (= 55 mg Salicin) verabreicht und 12 h lang die Salicylsäure-Konzentration im Blut gemessen. Am

zweiten Versuchstag wurden den Probanden im Abstand von 4 Stunden dreimal 3 Dragees oral appliziert und je zwei Stunden nach der Gabe Blut entnommen.

Am ersten Tag lag nach oraler Gabe von 3 Dragees mit 55 mg Salicin der maximale Salicylsäuregehalt bei 130 µg/l nach 2-3 Stunden. Nach 4 Stunden und der Einnahme des Standard-Mittagessens war ein erneuter Anstieg der Salicylsäure-Konzentration auf über 100 µg/l zu beobachten. Auf dieses Phänomen der zwei Maxima soll auch in Kapitel 5.5 näher eingegangen werden.

Am zweiten Versuchstag stieg nach der ersten Applikation der Salicylsäure-Spiegel erneut auf den Maximalwert des ersten Tages an. Die wiederholte Gabe nach 4 Stunden führte zu einem maximalen Salicylsäure-Spiegel von 311 µg/l. Diese Konzentration konnte durch eine dritte Applikation nicht übertroffen werden. Da die dem Salicingehalt entsprechende Salicylsäuremenge nur teilweise im Plasma wieder gefunden wurde, schlussfolgerte Pentz in seiner Studie, dass es bei der Einnahme von 55 mg Salicin zu einer deutlich geringeren Bioverfügbarkeit an Salicylsäure kommt als bei der Gabe einer äquimolaren Menge von synthetisch hergestellten Salicylaten (Pentz et al., 1989).

In der Studie von Schmid wurde die Salicylsäure-Konzentration nach Einnahme eines Weidenrinden-Extrakt-Präparates bestimmt. 10 Probanden nahmen im Abstand von 3 Stunden zweimal je 680 mg Weidenrinden-Extrakt (= 120 mg Salicin) in Form von Tabletten ein. Nach der Gabe der ersten Dosis von 680 mg Weidenrinden-Extrakt kam es nach ca. einer Stunde zu einem ersten Maximum der Salicylsäure-Konzentration von 690 µg/l. Nach erneuter Einnahme von 680 mg Weidenrinden-Extrakt kam es nach ca. 4 Stunden zu einem zweiten Maximum der Salicylsäure-Konzentration bei 1170 µg/l.

Vergleicht man die beiden Studien von Pentz und Schmid miteinander, so erstaunt die stark differierende Bioverfügbarkeit von Salicylsäure. Die von Pentz verwendeten Dragees enthielten einen Extrakt aus Weidenrinde und Colasamen. Während die im Extrakt enthaltene Coffeinmenge der Plasmakinetik anderer Untersuchungen gut übereinstimmt, war die Salicylsäure-Konzentration nahezu um den Faktor 10 geringer als in der Studie von Schmid.

Dieses Phänomen könnte auf die Bedeutung sowohl der Zusammensetzung des Weidenrinden-Extrakts als auch auf die galenische Formulierung hinweisen.

5.2 In-vivo-Untersuchung von Salicin und Weidenrinden-Extrakt an Ratten

Bereits 2000 wurde von der Firma Robugen, Esslingen, eine Tier-experimentelle Studie mit Salicin und Weidenrinden-Extrakt in Auftrag gegeben. Die Testung wurde von der Firma LPT (Laboratory of Pharmacology and Toxicology KG), Hamburg, durchgeführt. Getestet wurde auf anti-inflammatorische Wirkung der beiden Substanzen nach oraler Applikation im Carrageenan-induzierten Rattenpfotenödem. Die Testwerte zur Rückbildung der Schwellung nach 1 Stunde und 3 Stunden sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Substanz	Dosis	nach 1 h	nach 3 h
WRE	1000 mg/kg (~150 mg Salicin)	-67.4%	-25.0%
WRE	2000 mg/kg (~300 mg Salicin)	-64.1%	-6.8%
WRE	3000 mg/kg (~450 mg Salicin)	-71.7%	-20.5%
Salicin	100 mg/kg	-58.7%	-
Salicin	300 mg/kg	-65.2%	-54.5%
Salicin	1000 mg/kg	-65.2%	-61.4%
ASS	600 mg/kg	-92.4%	-77.3%

Tab. 1: *in-vivo*-Testergebnisse, orale Applikation, Testmodell: Carrageenan-induziertes Rattenpfotenödem

Die Testergebnisse zeigen, dass nach einer Stunde in den niedrigen Dosierungen kaum ein Unterschied in der Rückbildung der Schwellung bei der Applikation von Weidenrinden-Extrakt und Salicin besteht. Erst in der Dosierung von 3000 mg/kg ist der Weidenrinden-Extrakt dem Salicin (1000 mg/kg) überlegen.

Jedoch hemmt die Acetylsalicylsäure die ödematöse Schwellung deutlich stärker mit 92.4%.

Nach 3 Stunden scheint die Wirksamkeit des WRE deutlich nachzulassen. Die Wirkung des Salicin ist nur leicht abgeschwächt, ähnlich wie die Wirkung von ASS.

Wie bereits in Kapitel 3.3 besprochen, gibt es bei der Verstoffwechslung von Salicin im menschlichen Organismus und in der Ratte gewisse Unterschiede. Inwiefern sich die Pharmakokinetik und somit auch die antiphlogistische Wirksamkeit des Weidenrinden-

Extrakts und des Salicins von dem Organismus der Ratte auf den Menschen übertragen lassen, soll die klinische Studie mit 4 freiwilligen Probanden zeigen (siehe Kap. 5.6).

5.3 Schlussfolgerungen zur Untersuchung der Wirksamkeit von Weidenrinden-Extrakt

Die veröffentlichten Studien sowohl an Menschen als auch an Tieren werfen einige Fragen auf.

Steinegger wählt für seine Untersuchung Salicin als Reinsubstanz. Zwar wird dieses in einer relativ hohen Dosis von 4 g verabreicht und lässt sich daher nur schwer mit den Salicylsäure-Konzentrationen der Studien von Pentz und Schmid vergleichen, dennoch liegt eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit an Salicylsäure vor, als es bei der Gabe von Weidenrinden-Extrakt der Fall ist. Auch in der Tier-experimentellen Studie zeigt die Applikation von Salicin als Reinsubstanz einen geringfügig besseren Effekt auf das Carageenan-induzierte Ratenpfotenödem als Weidenrinde.

Wie wird sich der Plasmaspiegel von Salicylsäure nach Einnahme von reinem Salicin im Vergleich zur Einnahme von Weidenrinden-Extrakt in der von der ESCOP empfohlenen Dosierung unterscheiden?

Die Plasmaspiegel an Salicylsäure unterscheiden sich auch nach der Einnahme von Zeller Kopfschmerz-Dragees (Pentz) und dem Studienextrakt von Schmid stark.

Wie wichtig ist daher die Zusammensetzung des Weidenrinden-Extrakts im Bezug auf den Anteil von Salicin und Salicortin und eventuell anderen Begleitstoffen? Und wie verhält sich die Salicylsäure-Konzentration im Blut nach Einnahme von Salicortin als Reinsubstanz?

In einer klinischen Studie mit 4 freiwilligen Probanden sollen die genannten Fragestellungen genauer untersucht werden. Für die Einnahme von Salicortin als Reinsubstanz, wird dieses zunächst aus der Pflanze isoliert.

5.4 Salicortin

5.4.1 In-vitro-Untersuchungen mit Salicortin

Bei dem Weidenrinden-Glucosid Salicortin handelt es sich um 1-Hydroxy-6-oxo-cyclohex-2-en-carboxyl-2-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-benzylester.

Das Verhalten von Salicortin als Reinsubstanz im menschlichen Körper ist bisher nicht genauer untersucht worden. In den aus der Literatur bekannten Studien, die in Kapitel 5.1 aufgeführt sind, wurde den Probanden Weidenrinden-Extrakt oder Salicin als Reinsubstanz verabreicht, ohne Angaben über den Salicortingehalt der jeweiligen Extrakte und Präparate. Eine orale Applikation von Salicortin und eine anschließende Messung des Salicylsäure-Plasmaspiegel sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht veröffentlicht. Da es sich bei Salicortin um das genuine Hauptglucosid der Weidenrinde handelt, ist seine Verstoffwechslung im menschlichen Körper von großem Interesse.

Pearl und Darling untersuchten das Verhalten von Salicortin nach Zugabe von 0.1 M Salzsäure bei Raumtemperatur. Nach zehn Tagen lies sich neben Brenzcatechin und Saligenin hauptsächlich Salicoylsalicin mit einer Ausbeute von 12% nachweisen (Pearl und Darling, 1971).

Die Umwandlung von Salicortin zu Salicoylsalicin wird in Abb. 7 erläutert:

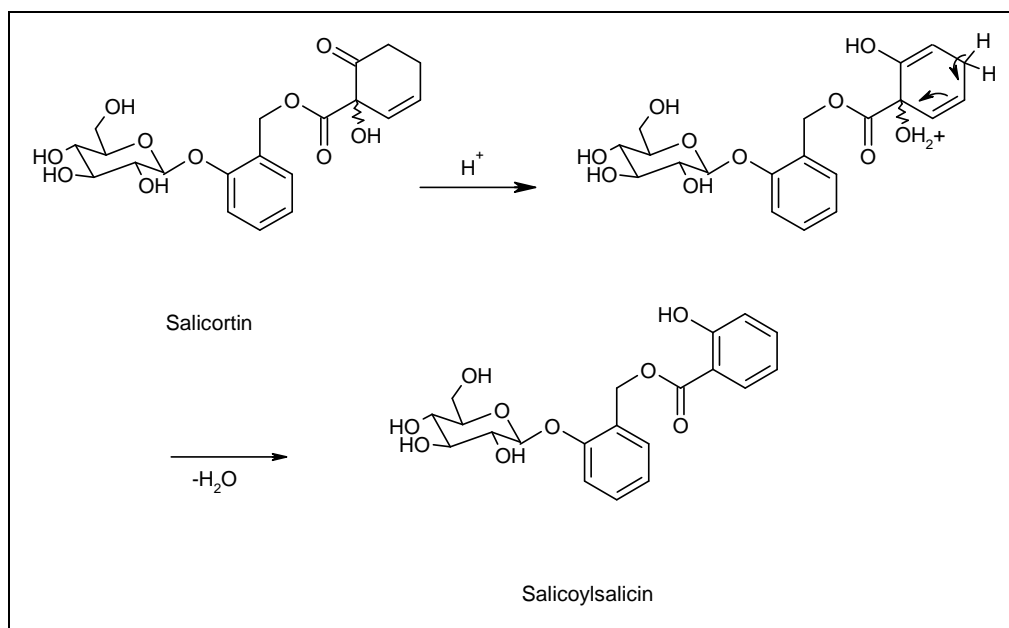


Abb. 7: Umwandlung von Salicortin zu Salicoylsalicin

Meier untersuchte in seiner Habilitationsschrift ebenfalls den Abbau von Salicortin sowohl im künstlichen Magensaft als auch im künstlichen Darmsaft.

Im künstlichen Magensaft (= 0.1 M Salzsäure) fand bei einer Verweildauer von einer Stunde bei 37 °C keine Umsetzung von Salicortin zu Salicin statt. Diese Tatsache deckt sich mit der Untersuchung von Pearl und Darling.

Im künstlichen Darmsaft (= Natriumhydrogenphosphat/Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 7.4-7.6) fand ein unvollständiger Abbau von Salicortin zu Salicin statt, bei dem nach sechs Stunden ca. 60% des vorliegenden Salicortins abgebaut waren (Meier, 1987).

Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass ein hoher Salicortingehalt in einem Weidenrinden-Extrakt eher von Nachteil ist, da es mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht ausreichend schnell im menschlichen Körper zu bioverfügbarem Salicin umgewandelt wird.

Des Weiteren wurde von Clausen der Abbau von Salicortin unter Katalyse von β -Glucosidase untersucht. Bei der Behandlung von Salicin mit β -Glucosidase wird das Aglykon Saligenin freigesetzt. Im Gegensatz dazu wird bei der Behandlung von Salicortin (**1a**) mit β -Glucosidase zwar Glucose als Zuckerbaustein freigesetzt, als Hauptprodukt erhält man jedoch nicht das freie Aglykon 1-Hydroxy-6-oxo-cyclohex-2-en-carboxy-2-hydroxy-benzylester (**1b**), sondern Verbindung **2**. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Rekombination der o-Chinonmethid- (**3**) und Enol-Fragmente (**4**) (Abb. 8).

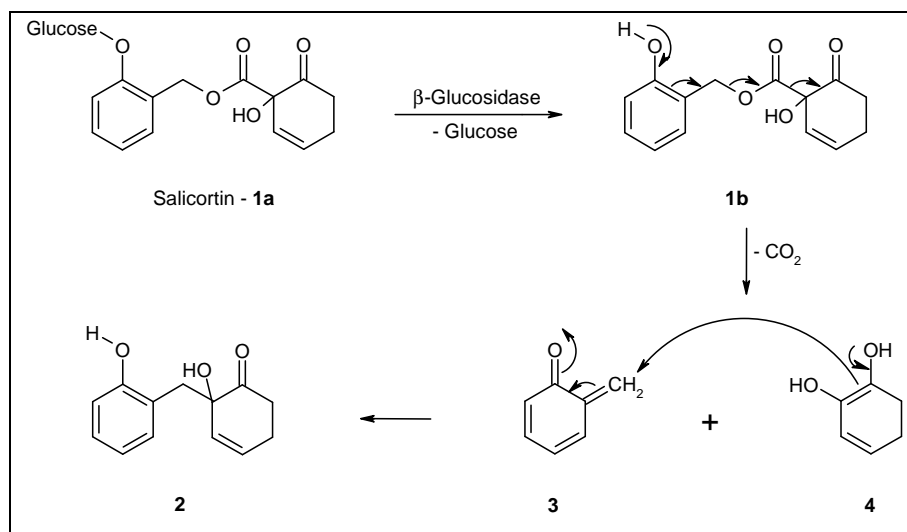


Abb. 8: Abbau von Salicortin durch β -Glucosidase

Die beschriebene Umsetzung von Salicortin durch die β -Glucosidase führt nicht nur zum Verlust der Saligenin-Einheit des Moleküls, sondern Clausen beobachtete auch eine irreversible Hemmung des Enzyms durch das o-Chinonmethid (Clausen et al., 1990).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass bei einer Einnahme von Salicortin-reichem Weidenrinden-Extrakt nicht nur der Precursor der Salicylsäure verloren geht, sondern auch eine Enzymhemmung der Umsetzung von im Extrakt enthaltenen Salicin schaden könnte.

Wie sich Salicortin tatsächlich im menschlichen Körper verhält, sollte mittels der klinischen Studie untersucht werden.

5.4.2 Extraktion und Isolierung von Salicortin

Da Salicortin im Rahmen der klinischen Studie verabreicht wird, muss die Substanz zunächst aus gemahlene Weidentriebspitzen mittels Methanol extrahiert werden. Nach 20 Minuten unter gelegentlichem Schütteln werden die festen Bestandteile abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der verbleibende, grünliche Rückstand wird zunächst per Flash-Chromatographie über Kieselgel und anschließend über eine Sephadex-Säule gereinigt.

Zurück bleibt eine farblose, sirupartige Masse. Details der Isolierung von Salicortin sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden.

5.5 Salicoylsalicin

Wie in Kapitel 5.4.1 besprochen, wird Salicortin unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur sehr langsam zu Salicoylsalicin umgewandelt. Erst der Einsatz 4 M Salzsäure beschleunigt die Umwandlung zu Salicoylsalicin.

Bei der Umsetzung zu Salicoylsalicin entsteht aus dem 1-Hydroxy-6-oxo-cyclohex-2-en-Ring des Salicortins eine Salicylsäure-Einheit.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es interessant zu wissen, wie sich Salicoylsalicin nach oraler Applikation im Körper verhält. Wie in Abbildung 9 zu sehen, enthält das Glucosid sowohl eine Salicin- als auch eine Salicylsäure-Einheit.

Um die Verstoffwechslung im Körper näher zu untersuchen, wird das Verhalten von Salicoylsalicin von uns zunächst im künstlichen Magen- und Darmsaft getestet.

Salicoylsalicin hydrolysiert im künstlichen Magensaft, hergestellt nach der Vorschrift der USP (USP24-NF19, 2000), in einem Zeitraum von 90 Minuten nicht zu Salicin und Salicylsäure.

Im künstlichen Darmsaft, hergestellt nach der Vorschrift des USP (USP24-NF19, 2000), kommt es nach 90 Minuten zu einer Freisetzung von Salicin. Allerdings kann dabei keine Salicylsäure detektiert werden.

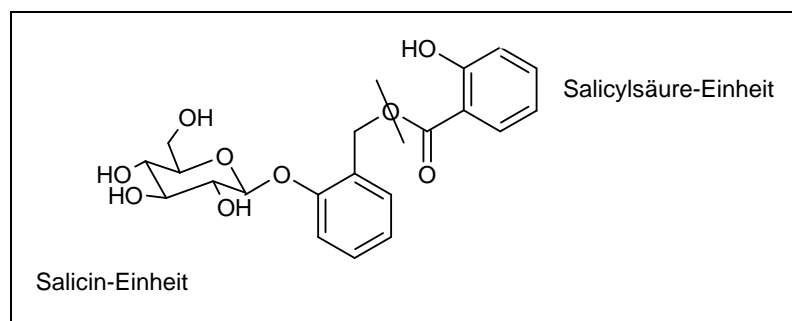


Abb. 9: Salicoylsalicin

Daher stellt sich die Frage, was im menschlichen Körper nach der Spaltung mit β -Glucosidase passiert und ob aus einem Mol Salicoylsalicin letztlich zwei Mol Salicylsäure entstehen.

Um diesen Fragen nachzugehen, wollten wir auch Salicoylsalicin in der klinischen Studie verabreichen, doch die Substanz wurde zur oralen Applikation von der Ethikkommission des Klinikums der Philipps-Universität Marburg nicht genehmigt.

5.6 Klinische Studie

5.6.1 Orale Gabe von Weidenrinden-Extrakt, β -Salicin und Salicortin

Nach Zustimmung der Ethikkommission des Klinikums der Philipps-Universität Marburg wird in einer kleinen pharmakokinetischen Studie der Salicylsäure-Plasmaspiegel nach der Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, β -Salicin und Salicortin untersucht.

Um die Substanz mit der besten Bioverfügbarkeit zu ermitteln, nehmen 4 gesunde, freiwillige Probanden, im Alter von 28 bis 30 Jahren, im Abstand von 3 Wochen jeweils eine der drei aufgeführten Substanzen ein.

Die Dosierung für Weidenrinden-Extrakt und β -Salicin richtet sich nach der Empfehlung der ESCOP-Monographie, die eine tägliche Dosis von 240 mg Salicin vorsieht. Von dem Glucosid Salicortin wird nur die Hälfte der äquimolaren Menge oral appliziert, da diese Dosierung von der Ethikkommission genehmigt wurde.

Den Probanden wird eine wässrige Suspension von 1463 mg Weidenrinden-Extrakt (= 240 mg Salicin) bzw. eine wässrige Lösung von 240 mg Salicin und 178 mg Salicortin als Reinsubstanz verabreicht.

Über einen Zeitraum von 8 Stunden werden den Probanden 13 Blutproben entnommen und der Salicylsäuregehalt im Plasma wird nach einer von Herrn Bernhard Watzer, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg, entwickelten LC/MS-Methode bestimmt (Pirker et al., 2004).

5.6.2 Plasmaspiegelkurven der Salicylsäure

Die Diagramme der folgenden Seiten zeigen den Plasmaspiegel von Salicylsäure nach der oralen Applikation von Weidenrinden-Extrakt sowie Salicin und Salicortin. Das obere Diagramm zeigt zunächst den Verlauf der Plasma-Kurve für jeden einzelnen Probanden. Das untere Diagramm zeigt dann die Mittelwerte der gemessenen Plasma-Konzentrationen aller Probanden. Durch die Fehlerbalken werden die 99% Konfidenzintervalle angezeigt.

Bei der Einnahme von Weidenrinden-Extrakt muss ein Proband während der Blutabnahme aus gesundheitlichen Gründen ausscheiden. Daher zeigt das Diagramm des Weidenrinden-Extraktes nur die Plasmaspiegel von 3 Probanden.

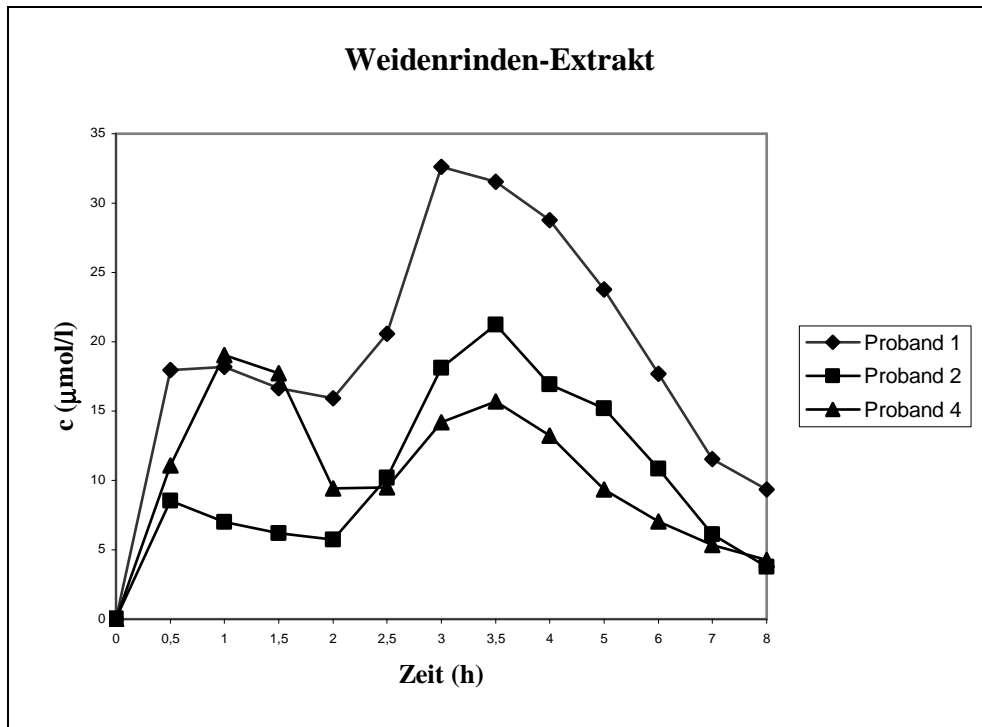


Abb. 10: Salicylsäure-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 1463 mg WRE an 4 Probanden. Ein Proband ist aus gesundheitlichen Gründen ausgeschieden.

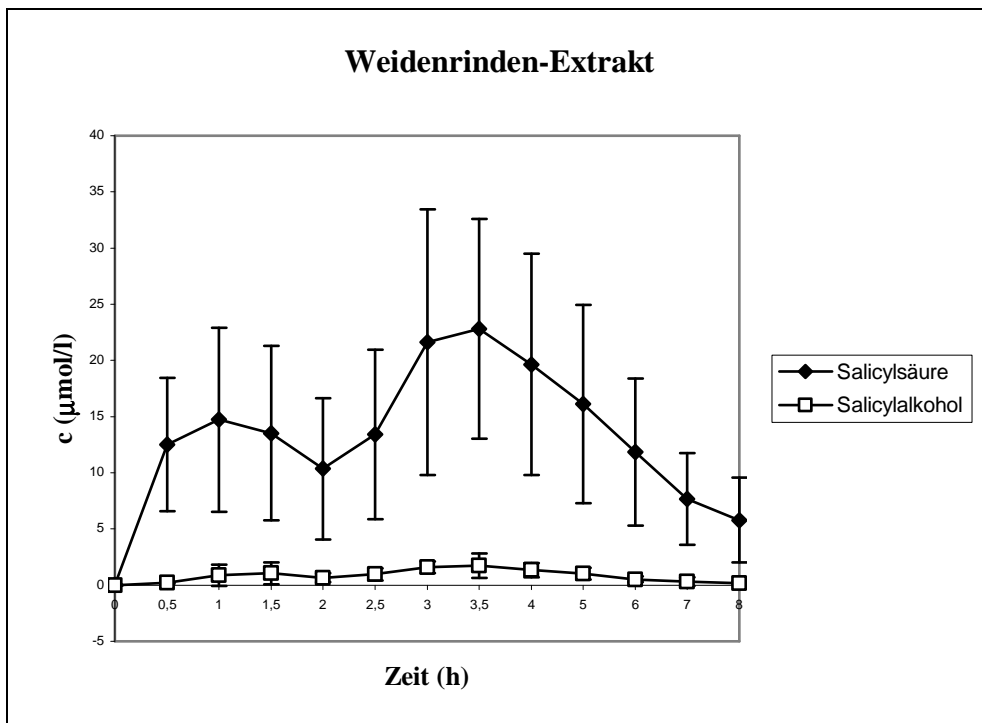


Abb. 11: Mittelwerte des Salicylsäure- und Saligenin (= Salicylalkohol)-Plasmaspiegels von 4 Probanden. Fehlerbalken zeigen die 99% Konfidenzintervalle der Mittelwerte.

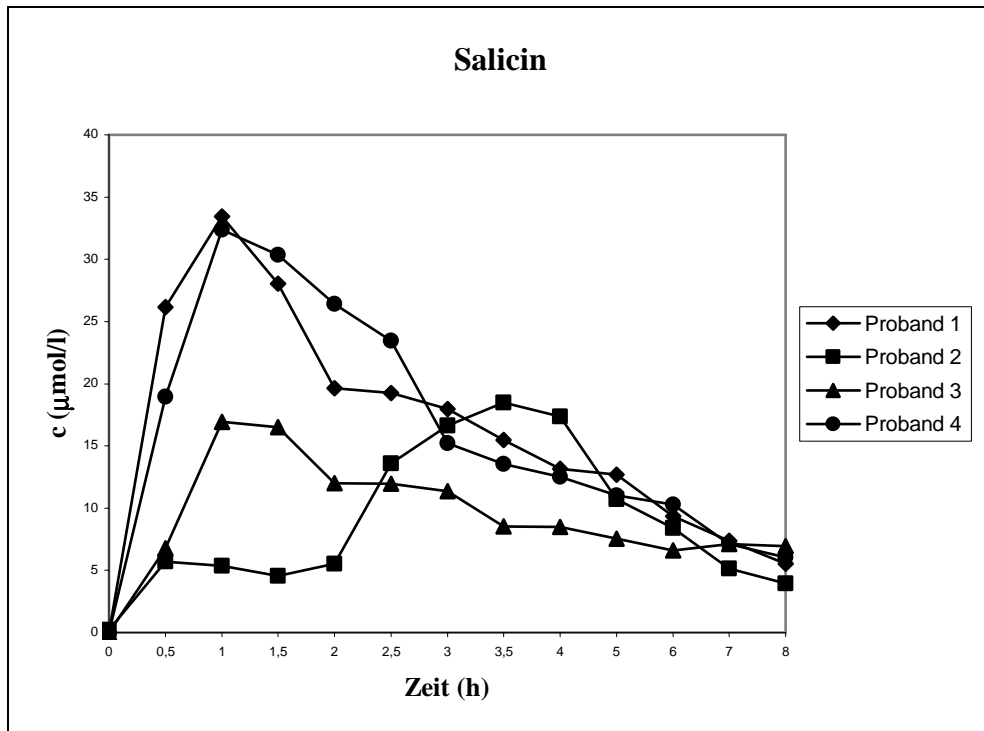


Abb. 12: Salicylsäure-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 240 mg Salicin an 4 Probanden.

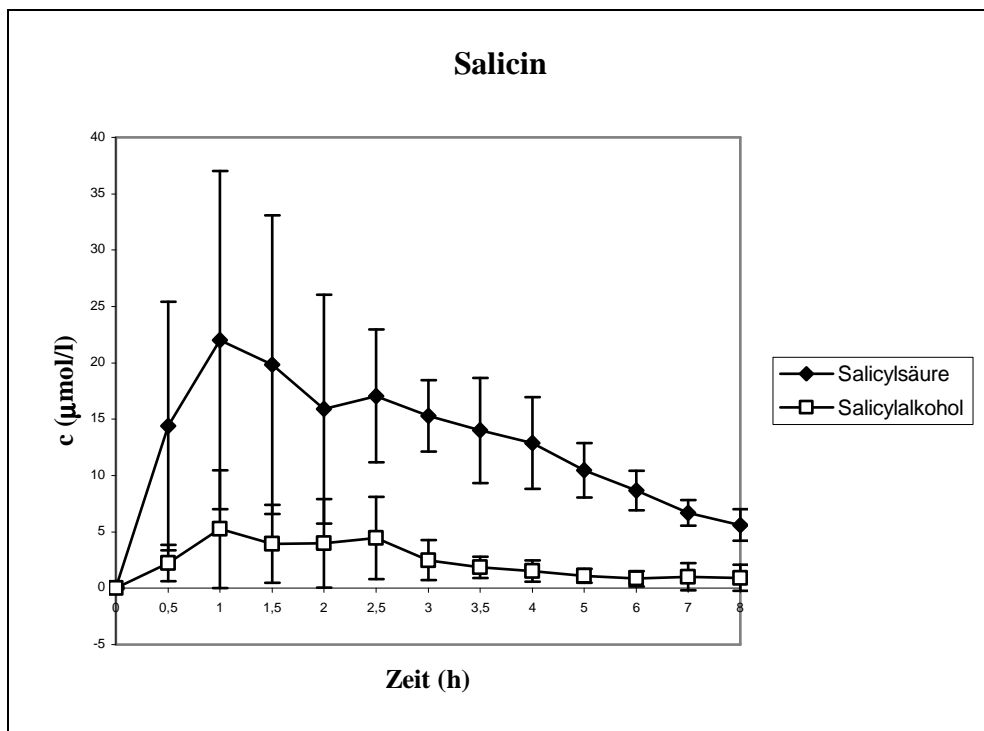


Abb. 13: Mittelwerte des Salicylsäure- und Saligenin (= Salicylalkohol)-Plasmaspiegels von 4 Probanden. Fehlerbalken zeigen die 99% Konfidenzintervalle der Mittelwerte.

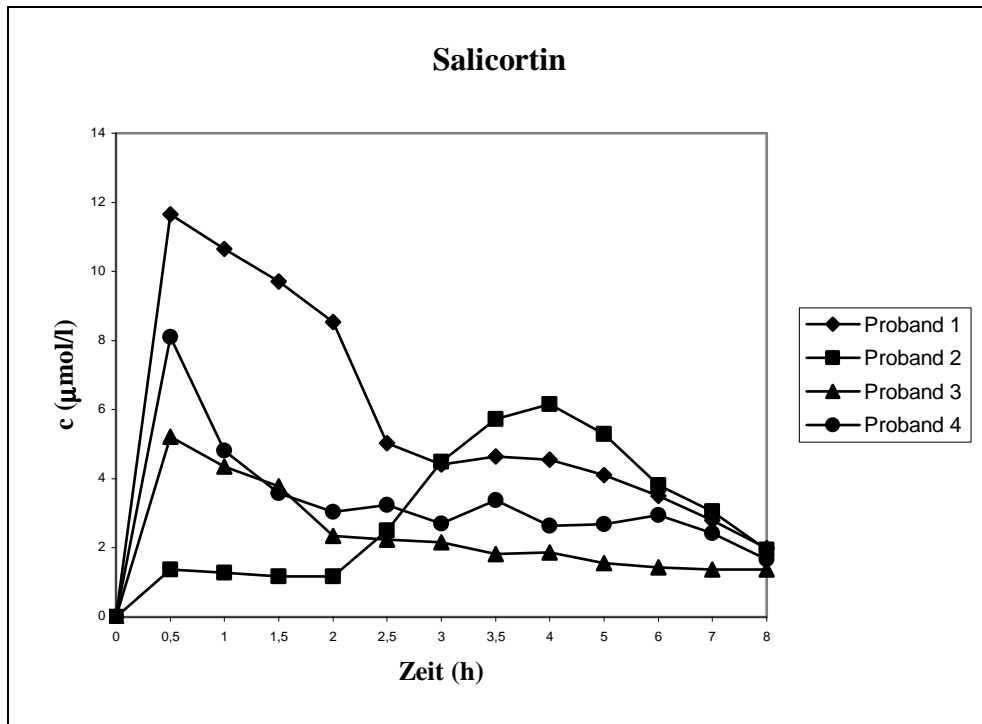


Abb. 14: Salicylsäure-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 178 mg Salicortin an 4 Probanden.

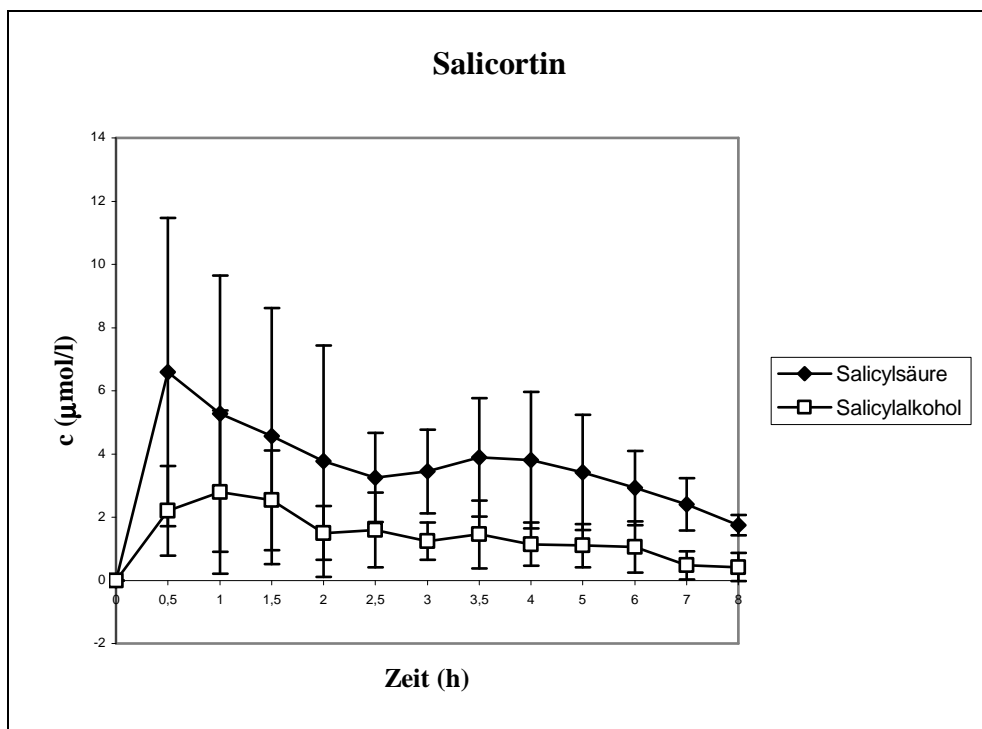


Abb. 15: Mittelwerte des Salicylsäure- und Saligenin (= Salicylalkohol)-Plasmaspiegels von 4 Probanden. Fehlerbalken zeigen die 99% Konfidenzintervalle der Mittelwerte.

5.6.3 Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 2 werden zunächst alle wichtigen Parameter aufgeführt.

	WRE	Salicin	Salicortin
Dosis	1463 mg	240 mg	178 mg
n_{Salicin}	0.84 mmol	0.84 mmol	0.42 mmol
C_{max}	22.8 µmol/l	22.0 µmol/l	6.6 µmol/l
t_{max}	3.5 h	1 h	0.5 h
AUC	107.74 µmol*h/l	97.58 µmol*h/l	27.86 µmol*h/l

Tab. 2: verschiedene Parameter der klinischen Studie

Die maximale Plasmakonzentration an Salicylsäure und der AUC-Wert (area under the curve) unterscheiden sich nach der oralen Applikation von Weidenrinden-Extrakt und Salicin nur geringfügig. Allerdings liegt eine deutliche Differenz in der Zeit des Anflutens der Salicylsäure im Blut nach der Einnahme des Extrakts und der Reinsubstanz. Während der maximale Plasmaspiegel nach der Salicin-Gabe bereits nach 1 Stunde erreicht wird, dauert es bei dem Weidenrinden-Extrakt 3.5 Stunden.

Die Ergebnisse der Salicortin-Einnahme entsprechen nicht ganz den Erwartungen. Bezogen auf die Weidenrinden-Extrakt- bzw. Salicin-Menge (= 0.84 mmol) wird nur die Hälfte an Salicortin (= 0.42 mmol) verabreicht. Die Konzentration an Salicylsäure nach Applikation von Salicortin sollte daher nur halb so hoch sein. Dennoch liegen die Salicortin-Werte für C_{max} und AUC deutlich unter der halbmaximalen Konzentration. Das zeigt, dass nicht die komplett eingesetzte Menge an Salicortin zu Salicin und letztlich zu Salicylsäure verstoffwechselt wird, doch es weist darauf hin, dass die Vorhersage von Clausen (Kapitel 5.4.1) *in vivo* nicht ganz zutreffend sein kann. Nach Clausen kommt es bei dem Zusammentreffen von β-Glucosidase und Salicortin zum Verlust des Salicylalkohols unter gleichzeitiger Hemmung des Enzyms (Clausen et al., 1990). Nach Einnahme von Salicortin als Reinsubstanz dürfte daher keine Salicylsäure im Blut vorhanden sein. Da nur ein geringer Teil des applizierten Salicortins als Salicylsäure im Blut aufgetreten ist, lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass der andere Teil der Verstoffwechslung nach Clausen unterlegen ist.

Neben der Salicylsäure als Hauptmetabolit des Salicins kann auch bei allen drei Bestimmungen eine geringe Konzentration an Saligenin im Plasma nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist erneut darauf hin, dass die Spaltung des Salicins bereits vor der Absorption stattfindet. Da es sich jedoch nur um niedrige Konzentrationen des Alkohols handelt, wird dieser offensichtlich rasch zur Salicylsäure umgesetzt.

Bei der Applikation des Weidenrinden-Extraktes ist ein interessanter Verlauf der Kinetik zwischen der 2. und 5. Stunde bei Proband 1 und 4 zu beobachten. Nach dem Absinken des ersten Maximums resultiert ein erneuter Anstieg der Salicylsäure-Konzentration. Diese übersteigt sogar die Konzentration des ersten Maximums. In den Zeitraum des zweiten Anstiegs fällt das Frühstück. Pentz berichtet in seiner Studie bei der Applikation von Weidenrinden-Extrakt von einem ähnlichen Phänomen und findet dafür zwei denkbare Erklärungen. Zum einen, dass der für die Resorption des Saligenins notwendige Transport des Salicins vom Magen in den Darm durch die Mahlzeit erneut stimuliert wird. Und zum anderen, dass die für die Resorption notwendige Spaltung des Salicins zu Saligenin durch die Verdauungstätigkeit beschleunigt wird (Pentz et al., 1989). Das gleiche Phänomen kann bei der Verabreichung von Salicin und Salicortin bei den Probanden 1, 3 und 4 nicht beobachtet werden. Allerdings ist die Menge an Salicin und Salicortin auch deutlich geringer als die Menge des applizierten Weidenrinden-Extrakts, so dass es durch die Nahrungsaufnahme zu einem erneuten Transport des Extrakts vom Magen in den Darm gekommen sein kann. Eine Beschleunigung der Spaltung ist eher unwahrscheinlich, da diese Kinetik dann auch bei Salicin vorherrschen müsste. Eine exakte Klärung der beschriebenen Kinetik kann jedoch im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden.

Bei Proband 2 ist bei der Verabreichung aller drei Substanzen eine ungewöhnliche Kinetik im Vergleich zu den anderen drei Probanden zu beobachten. Offensichtlich flutet die Salicylsäure bei Proband 2 zunächst nur sehr langsam an. Erst nach dem Frühstück kommt es bei diesem Probanden zu dem starken Anstieg der Salicylsäure-Konzentration. Proband 2 ist asiatischer Herkunft, der jedoch seit langem in Deutschland lebt und sich auch in den Monaten vor der Studie in Deutschland aufhielt. Da der Aufnahme des Saligenins die Spaltung des Salicins vorausgeht, sind für diese Beobachtung zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnte bei Menschen asiatischer Herkunft eine andere Lokalisation der menschlichen β -Glucosidase vorherrschen. Zum anderen könnte auch die Darmflora und somit die bakteriellen β -Glucosidasen durch eine unterschiedliche Ernährung verändert sein. Um diese Kinetik jedoch genauer untersuchen zu können, müsste man in die Studie mehrere Menschen asiatischer Herkunft aufnehmen.

Wie bereits in Kapitel 5.1 besprochen, kann bei Weidenrinden-Extrakt der Gehalt an freiem Salicin je nach Herstellungsverfahren stark variieren. Um den aus dem Extrakt resultierenden Salicylsäuregehalt und somit dessen Wirksamkeit in diesem Zusammenhang besser beurteilen zu können, wird von der analytischen Abteilung der Firma Robugen der Gehalt an freiem Salicin bestimmt. Anhand dieses Wertes kann auf den ungefähren Gehalt der noch vorhandenen Salicin-Ester geschlossen werden. Dazu wird der Salicingehalt vor der Hydrolyse der Salicin-Ester bestimmt. Dabei ergab sich ein Wert von ca. 15%. Der Gesamt-Salicingehalt im Extrakt betrug 16.4% nach der Verseifung der Ester, d.h. der Anteil an Salicin-Estern beträgt nur ca. 1.4 %. Wie wichtig die Zusammensetzung des Weidenrinden-Extrakt bezüglich der Salicin-Ester ist, zeigt das Studienergebnis der Salicortin-Applikation. Nach der Einnahme von Salicortin als Reinstoff wird nur eine maximale Salicylsäure-Konzentration von 6.6 $\mu\text{mol/l}$ erreicht. Ein hoher Salicortingehalt in dem Weidenrinden-Extrakt wird daher zu einem Wirkungsverlust führen.

5.6.4 Schlussfolgerung

Bei der Applikation von Weidenrinde und Salicin als Reinsubstanz ergibt sich in der maximalen Plasmakonzentration an Salicylsäure kaum ein Unterschied. Nach Salicin-Applikation flutet die Salicylsäure zwar etwas schneller an, doch ergibt sich daraus für die Anwendung der Weidenrinde bei chronischen Schmerzzuständen kein Unterschied. Die zahlreichen Begleitstoffe des Extrakts scheinen die Resorption des Salicins nicht negativ zu beeinflussen. Eine Hemmung der β -Glucosidase durch im Extrakt enthaltene Gerbstoffe kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, aber die Spaltung scheint, wie der Plasmaspiegel an Salicylsäure deutlich macht, davon nicht weiter beeinflusst zu werden. Man erlangt keine höheren Salicylsäure-Plasmaspiegel durch die Gabe von Salicin als Reinsubstanz. Allerdings ist die Belastung des Verdauungstrakts durch die Vielzahl der Inhaltsstoffe des Weidenrinden-Extrakts wesentlich stärker als bei der Applikation der Reinsubstanz Salicin.

Weidenrinden-Extrakt bzw. Salicin als Reinsubstanz kann durchaus für die Anwendung bei chronischen Schmerzzuständen wegen der guten Verträglichkeit empfohlen werden. Allerdings entspricht die Einnahme-Empfehlung der ESCOP von Weidenrinden-Extrakt standardisiert auf 240 mg Salicin im Vergleich zu der synthetisch hergestellten Acetylsalicylsäure eher einer „Low-Dose-Gabe“. Die Applikation von 240 mg Salicin ist

einer ASS-Menge von 150 mg äquivalent. Zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen kann eine Tagesdosis von bis zu 6 g ASS erforderlich werden, die aufgrund der starken Magentoxizität kaum toleriert werden (Mutschler et al., 2001). Eine Gabe von 150 mg ASS entspricht eher einer Tagesdosis zur Herzinfarktprophylaxe als zur Analgesie.

Des Weiteren entspricht die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt standardisiert auf 240 mg (= 0.84 mmol) Salicin ungefähr einer Einnahme von 80 mg (= 0.44 mmol) ASS (Benedek et al., 1995). Analgetische Dosierungen von ASS (640 mg) erreichen maximale Salicylat-Plasma-Konzentrationen von über 350 $\mu\text{mol/l}$ (Schrör, 1992).

Ausgehend von unserer Studie müsste man die Salicin-Dosierung mehr als 10-fach erhöhen, um an die analgetische Dosierung von ASS heranzureichen. Ob diese Dosierung ebenso gut verträglich ist wie die von der ESCOP empfohlene Gabe von 240 mg Salicin, bleibt fraglich.

Wichtig für die therapeutische Verwendung von Weidenrinden-Extrakt ist ein möglichst geringer Salicortin-Anteil. Bei der Herstellung des Extrakts sollten daher die Salicin-Ester zu Salicin hydrolysiert werden. Zwar können wir keine Aussage über alle Salicin-Ester treffen, da in unserer Studie ausschließlich Salicortin untersucht wurde, jedoch handelt es sich bei Salicortin um das Hauptglycosid der Ester. Ein geringer Anteil an Salicin-Estern bedeutet daher auch eine geringe Salicortin-Konzentration.

6. Antibakterielle Wirksamkeit von Salicylsäure und verschiedenen Salicylsäure-Metaboliten

Heutzutage wird der Extrakt der Weidenrinde bei chronisch entzündlichen Erkrankungen empfohlen und eingesetzt. Die erfolgreiche Anwendung des Salicins an sehr vielen Patienten durch T. J. Maclagan (Maclagan, 1896) bezog sich jedoch auf die Behandlung des akuten rheumatischen Fiebers. Diese Erkrankung war bis Anfang des 20. Jahrhundert auch in Europa weit verbreitet.

Bei akutem rheumatischem Fieber (ARF, akuter Gelenkrheumatismus) handelt es sich um eine Zweiterkrankung nach einer Infektion mit β -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe A. Ausgelöst durch den bakteriellen Erreger kommt es zu entzündlichen Veränderungen der großen Gelenke, des Herzens, der Haut und des zentralen Nervensystems. Besonders betroffen sind Kinder und jüngere Erwachsene. Die klinischen Symptome, wie akute Polyarthrit, Karditis, Hauterscheinungen und Chorea minor, können einzeln oder nebeneinander vorliegen (Mutschler et al., 2001). Heutzutage tritt diese Erkrankung in den Industrieländern wegen gesteigerter Hygienemaßnahmen kaum noch auf (Carapetis et al., 2005; Meador und Russell, 2001).

Bei rheumatoider Arthritis (RA, chronische Polyarthrit) handelt es sich dagegen um eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche überwiegend die Gelenke, aber auch innere Organe befallen kann. Es ist heutzutage die häufigste Form der rheumatischen Erkrankungen. Als Folge der Entzündungsprozesse verformen sich die Gelenke nach und nach und werden schließlich unbeweglich. Die eigentliche Krankheitsursache ist noch nicht vollständig geklärt, es bestehen jedoch Zusammenhänge zwischen genetischen Faktoren und Autoimmunprozessen (Mutschler et al., 2001).

Da Maclagan mit der Behandlung von ARF durch Salicin in einer Dosierung von bis zu 10 g pro Tag Erfolg hatte, haben wir die Arbeitshypothese formuliert, dass die Wirkung auf einen antibakteriellen Effekt der Salicylate zurückgeht.

Unser Verdacht auf eine antibakterielle Wirksamkeit der Salicylate nach Verstoffwechslung des Salicins wird von anderer Seite bestärkt. In der Literatur sind verschiedene Studien beschrieben, die nach Verabreichung von Kranbeer-Saft Salicylsäure in Blut und Urin nachweisen konnten. Nach einmaliger Verabreichung von 1800 ml Kranbeer-Saft wurde eine Salicylsäure-Konzentration von 0.98 $\mu\text{g/ml}$ im Plasma nachgewiesen (Zhang und Yuegang, 2004). Nach einer zweiwöchigen Applikation von 750 ml Kranbeer-Saft pro Tag wurde eine

Plasmakonzentration von 0.05 µg/ml Salicylsäure und eine Salicylsäure-Konzentration von 1.4 nmol/mg Kreatinin im Urin gemessen (Duthie et al., 2005). In einer finnischen Studie mit 150 Frauen, die an einer durch *Escherichia coli* hervorgerufenen Harnwegsentzündung litten, konnte die Applikation von Cranberry-Saft die Zahl der Rückfälle auf 16% mindern. Die Erreger des ARF und der Harnwegsinfektion sind nicht dieselben, aber die Cranberry-Studie gibt einen Hinweis auf eine mögliche antibakterielle Wirkung der Salicylate.

Saligenin, Salicylsäure-Natrium und Gentsinsäure-Natrium werden im Nationalen Referenzzentrum für Streptococci auf antibakterielle Wirksamkeit getestet. Die Substanzen werden gegen 20 verschiedene Stämme von *Streptococcus pyogenes* (die bei Pharyngitis und invasiven Infektionen isoliert wurden) und gegen *Streptococcus pneumoniae* getestet. Dabei soll die minimale inhibitorische Konzentration bestimmt werden.

Die Berechnung der jeweiligen möglichen Konzentration an Salicylsäure im entzündeten Gelenk wird aus der Salicin-Gabe von 10 g pro Tag durch T. J. Maclagan abgeleitet. Die maximale Salicylat-Konzentration in der Synovialflüssigkeit beträgt 50% des Plasmaspiegels (Schrör, 1992).

Verglichen mit der Einnahme von 4 g Salicin durch Steinegger im Selbstversuch ergibt sich daraus ungefähr eine Konzentration von 160 µg Salicylsäure-Natrium/ml in der Synovialflüssigkeit.

Bei einer Verstoffwechslung von Salicylsäure zu Gentsinsäure von 5% (Schrör, 1992) ergibt sich für Gentsinsäure-Natrium eine ungefähre Konzentration von 12 µg/ml im Blut.

Die Salicin-Applikation von 240 mg, die in unserem Arbeitskreis durchgeführt wurde, führt zu einer maximalen Saligenin-Konzentration von 5.3 µmol/l im Blut. Rechnet man diese Einnahme auf 10 g Salicin pro Tag, ergibt sich daraus eine Konzentration von ca. 14 µg Saligenin/ml Blut.

Für alle drei Substanzen werden folgende Verdünnungen hergestellt und getestet:

512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.016 µg/ml.

Die getesteten Stämme unterscheiden sich nach Aussage von Prof. Reinert vom Nationalen Referenzzentrum für Streptococci nicht von den Stämmen, die das akute rheumatische Fieber auslösen.

Keine der getesteten Substanzen hat Wirksamkeit gegenüber den ausgewählten Streptococci-Stämmen.

Außer Gentsinsäure sollten daher noch andere Metabolite der Salicylsäure getestet werden. Salicylursäure, der Hauptmetabolit in der Salicylsäure-Biotransformation, scheint dabei noch

eine viel versprechende Substanz zu sein. Außerdem wäre auch eine Testung des Salicylsäure-Glucuronids interessant. Leider ist die Synthese dieses Glucuronids zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht völlig ausgereift, so dass zu wenig Substanz zur Analytik und Testung vorliegt.

Da keine der getesteten Substanzen bei den gewählten Konzentrationen eine antibakterielle Wirkung zeigt, kann unsere Hypothese auf eine antibakterielle Wirksamkeit der Salicylate nach Verstoffwechselung des Salicins bei akutem rheumatischen Fieber nicht bestätigt werden.

7. Synthese verschiedener Salicin-ähnlicher Glykoside

Glycoside sind im Pflanzenreich sehr weit verbreitet und spielen sowohl pflanzenphysiologisch als auch pharmazeutisch eine große Rolle. Einige Glycoside, wie z. B. die herzwirksamen Glycoside aus *Digitalis purpurea* L., wurden wichtige Arzneistoffe. In einigen Fällen, wie z. B. bei den herzwirksamen Glycosiden, ist das intakte Glycosid, meist jedoch das freie Aglykon (in unserem Fall das Saligenin) für den therapeutischen Effekt verantwortlich. Dies setzt die Spaltung der Glycosid-Bindung, entweder während der Arzneistoffproduktion bzw. -extraktion oder *in vivo*, voraus. Meist sind es die intakten Glycoside, die kristalline, stabile Verbindungen darstellen. In Fall der Weidenrinde ist der wirksame Inhaltsstoff Salicin, ein β -Glucosid. Salicin gilt als der Vorläufer des bereits seit über einem Jahrhundert sehr erfolgreichen Präparats Aspirin® bzw. dessen Wirkstoff Acetylsalicylsäure (ASS). Anders als bei der Einnahme von ASS oder Salicylsäure kommt es bei der Verabreichung von Salicin kaum zu unerwünschten gastro-intestinalen Störungen durch lokale Reizungen der Magen- und Darmschleimhaut. Bei der Applikation von ASS können bereits in niedriger Dosierung Blutungen im Gastrointestinaltrakt auftreten (Bidlingmaier et al., 1995).

Studien über ASS- und Salsalat(= *o*-Salicylsalicylsäure)-Applikation in anti-inflammatorischer Dosierung ergaben geringere gastro-intestinale Nebenwirkungen nach der Einnahme von Salsalat im Vergleich zu ASS (April et al., 1989). Allerdings waren auch die Plasmaspiegel an Salicylsäure nach der Applikation von Salsalat ca. 15% geringer als nach der Applikation von ASS (Dromgoole et al., 1983; Harrison et al., 1981). Dieses Ergebnis deutet auf die Problematik der Bioverfügbarkeit hin. Der Ester wird nicht schnell genug gespalten, um eine äquivalente Salicylsäure-Konzentration zu erreichen.

Die Verabreichung des „geschützten“ Salicylalkohols in Form eines Glycosid ist also aufgrund geringer Nebenwirkungen in Gastrointestinaltrakt durchaus erwünscht, allerdings sollte die Bioverfügbarkeit der Wirkform Salicylsäure nicht darunter leiden.

Das Aglykon muss *in vivo* aus dem Glucosid freigesetzt werden, dazu werden β -Glucosidasen benötigt. Allerdings gibt es im menschlichen Körper nur wenige aktive β -Glucosidasen. Die meisten β -Glucosidasen findet man in der intestinalen Microflora, was bedeutet, dass die Freisetzung der Aglyka beispielsweise nach einer Antibiotika-Therapie stark reduziert sein könnte.

Durch Plasma-Glucosidasen wird Salicin nicht gespalten. Nach rektaler Applikation beim Menschen wird Salicin zwar resorbiert, aber unverändert wieder ausgeschieden und nicht in Salicylsäure umgewandelt (Steinegger und Hövel, 1972).

Daher haben wir im Rahmen dieser Arbeit über eine Variation der Zuckereinheit in Glycosiden nachgedacht, um den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der Hydrolyse zu beschleunigen; denn die Oxidation des Aglykons Saligenin zum Wirkstoff Salicylsäure geht sehr rasch.

Unsere Überlegungen umfassen ein Glycosid, dessen Zuckereinheit im sauren pH-Bereich des Magens und ohne Hilfe eines Enzyms hydrolysiert werden kann.

Aus der Literatur ist uns bekannt, dass Furanoside um den Faktor 50-200 schneller hydrolysiert werden als Pyranoside. Phenyl- α -pyranoside werden um den Faktor 4 schneller gespalten als die β -Form. Und 2-Desoxyhexoside werden um den Faktor 2000-5000 schneller hydrolysiert als Hexoside (Jensen et al., 2001; Overend, 1972). Für eine Synthese im Rahmen dieser Arbeit scheinen daher die zwei Desoxyzucker D-Digitoxose und D-Desoxyribose gut geeignet. Beide Zucker sind kommerziell verfügbar und besitzen kein toxikologisches Risiko, wie z. B. 2-Desoxyglucose. Saligenin- α -D-digitoxosid und Saligenin- α -D-desoxyribosid sind aussichtsreiche Glycoside, die im sauren pH-Bereich hydrolysiert werden sollten.

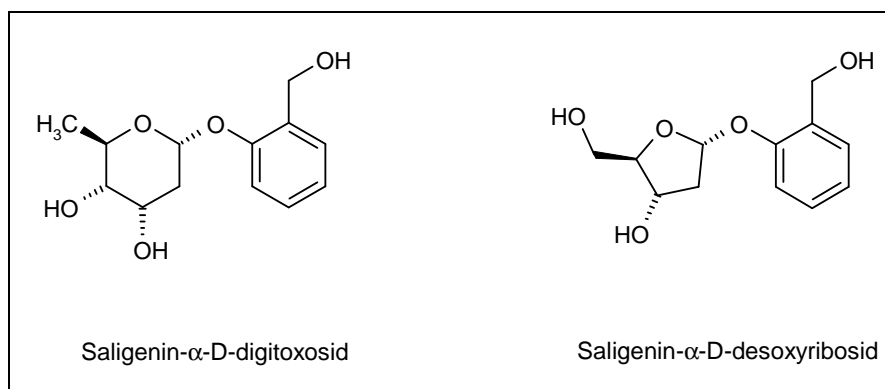


Abb. 16: säurelabile Glycoside

Die Freisetzung der Saligenin-Einheit im Magen könnte allerdings zu Magenbeschwerden führen. Im Tierversuch führte Salicylalkohol im Gegensatz zu Salicin zu Magenirritationen (Akao et al., 2002).

Daher dachten wir über ein Glycosid nach, dessen Zuckereinheit erst im alkalischen pH-Bereich des Dünndarms ohne enzymatische Hilfe gespalten werden kann. Glycoside mit Acetal-Struktur können nur unter drastischen Bedingungen gespalten werden. Aber wie

werden beispielsweise Glycoside gespalten, deren Glykon und Aglykon über einen Ester verbunden sind? Im Zusammenhang mit Salicylsäure-Glycosiden als Prodrug kommt eventuell der 2-Hydroxy-benzoesäure- α -glucopyranosyl-ester in Betracht.

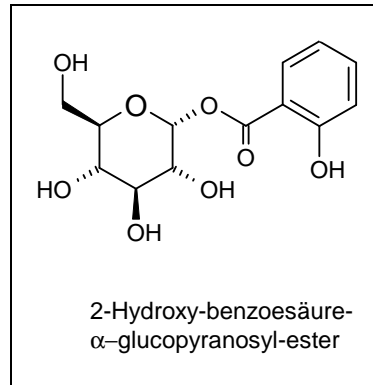


Abb. 17: Esterbindung zwischen Glykon und Aglykon

Ob dieser Ester jedoch tatsächlich im alkalischen Milieu oder bereits im Sauren gespalten wird, kann nicht ohne weiteres vorhergesagt werden.

Wir wollen jedoch zunächst und vor allem das Verhalten von α -Glycosiden im Vergleich zu der β -Form im menschlichen Körper untersuchen, um zu sehen, ob α -Glucosidasen, von denen es eine Vielzahl im menschlichen Körper gibt, schneller die entsprechenden Aglyka freisetzen.

α -Glycoside, bei denen die Zucker-Einheit direkt an das Aglykon gebunden ist, kommen in der Natur nicht vor. α -D-Glucose dagegen kommt in Oligosacchariden wie z.B. Saccharose und Polysacchariden (z.B. Stärke) vor. Damit der Mensch diese Kohlenhydrate zur Energiegewinnung nutzen kann, werden α -Glucosidasen benötigt.

Die Hemmung dieser α -Glucosidase nutzt man zur Behandlung von Diabetes mellitus. Zur medikamentösen Therapie von Typ-2-Diabetes werden unter anderem α -Glucosidase-Inhibitoren eingesetzt. Durch die Hemmung des Enzyms werden Di- und Oligosaccharide im Bürstensaum des Dünndarms nicht mehr gespalten und somit die Resorption von Kohlenhydraten verzögert. Einer der auf dem Markt befindlichen α -Glucosidase-Inhibitoren ist Arcarbose (Glucobay®). Arcarbose besteht aus drei Glucose-Bausteinen und einem Cyclohexenamin-Derivat. Alle vier Moleküle sind α -glycosidisch verknüpft. Das Pseudotetrasaccharid besitzt eine 15000-fach höhere Enzymaffinität als Saccharose (Mutschler et al., 2001).

Wir wollen untersuchen, wie sich α -Glycoside im menschlichen Körper verhalten und überprüfen, ob sie durch α -Glucosidasen gespalten werden oder ob sie diese ähnlich wie die Arcarbose hemmen.

Für diese Untersuchungen werden verschiedene α - und β -Glycoside synthetisch hergestellt.

7.1 Synthese geschützter Zucker

Ein Glycosid ist ein cyclisches Acetal, das aus einem Aglykon und einem glycosidischen Teil besteht.

Zur Herstellung von α - und β -Glycosiden erscheinen zunächst enzymkatalysierte Reaktionswege viel versprechend, da man ohne großen synthetischen Aufwand stereoselektive Produkte erhalten kann. Leider zeichnen sich diese Synthesen nicht durch hohe Ausbeuten aus. Bei der Herstellung von α -Isosalicin mittels Stärke und Amyloglucosidase und bei der Synthese von β -Isosalicin mittels Glucose und β -Glucosidase liegen unsere Ausbeuten unter 1%. Des Weiteren scheint die enzymkatalysierte Synthese je nach eingesetztem Enzym nicht regioselektiv zu verlaufen (Meier, 2004; Yoon et al., 2004). Daher wird diese Art der Synthese nicht weiter verfolgt.

Um die ausgewählten Zucker mit den entsprechenden Aglyka reagieren zu lassen und Produktgemische zu vermeiden, ist die Einführung bestimmter Schutzgruppen notwendig. Wichtig bei der Wahl der Schutzgruppe ist dabei, dass sie sich relativ leicht einführen lässt, unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil bleibt und anschließend auch unter milden Bedingungen wieder abgespalten werden kann. Außerdem können die zum anomeren Zentrum benachbarten Schutzgruppen die Stereoselektivität der Glycosid-Bildung beeinflussen. Allerdings hängt die Bildung stereoselektiver Glycoside nicht alleine von der Nachbargruppe des anomeren Zentrums, sondern auch von der Wahl des Katalysators sowie des Lösungsmittels ab (Paulsen, 1982).

Zur Durchführung der geplanten Glycosid-Synthesen werden zunächst verschiedene Glykone hergestellt.

7.1.1 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-glucopyranose

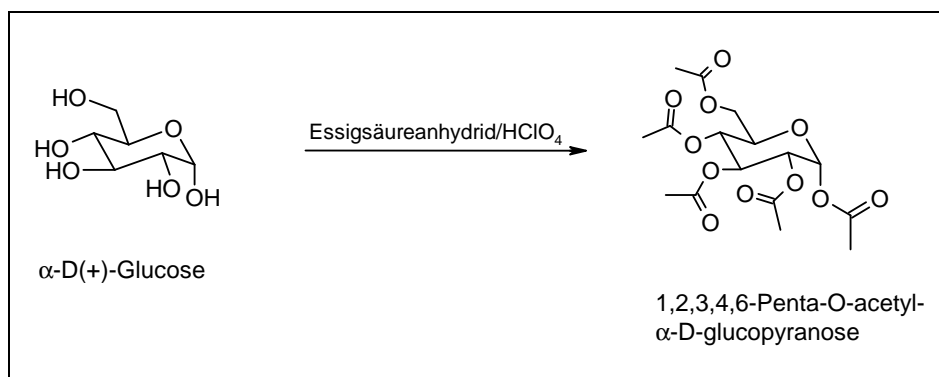


Abb. 18: Synthese von Penta-acetyl-glucose

In Anlehnung an die Literatur (Furniss et al., 1989) wird D-(+)-Glucose mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Perchlorsäure als Katalysator zu 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-glucose umgesetzt. Die Ausbeute betrug 93%.

Die α -Konformation des anomeren Zentrums wird gemäß der *Karplus*-Beziehung durch die Kopplungskonstante von $J = 3.7$ Hz zwischen 1-H und 2-H nachgewiesen.

7.1.2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glycopyranosylbromide

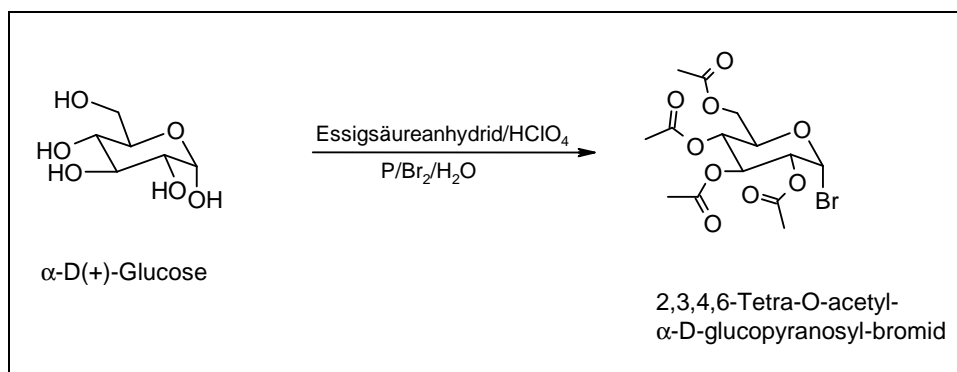


Abb. 19: Synthese von Tetra-acetyl-glucosyl-bromid

Analog zur Literatur (Furniss et al., 1989) werden die 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glycopyranosyl-bromide direkt aus D-(+)-Glucose, D-(+)-Galactose und L-(-)-Glucose synthetisiert. Dabei werden die Zucker zunächst in einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid

und katalytischen Mengen Perchlorsäure gelöst und nach Zugabe von rotem Phosphor durch Zutropfen von elementarem Brom und Wasser *in situ* halogeniert.

Die Ausbeute für 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucoopyranosylbromid beträgt 78%, für 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid 75% und für 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -L-glucoopyranosylbromid 80%.

Die α -Konformation der anomeren Zentren wird wiederum nach der *Karplus*-Beziehung durch die Kopplungskonstante von $J = 3.9-4.1$ Hz zwischen 1-H und 2-H nachgewiesen.

7.2 α -/ β -Glycoside

7.2.1 Salicylsäure- β -glycopyranosid-Synthesen

Das Verfahren zur Herstellung der Salicylsäure-Glycoside basiert auf der Synthese nach Koenigs-Knorr (Koenigs und Knorr, 1901). Die Salicylsäure-Glycoside bestehen aus den Glykonen Glucose bzw. Galactose und dem Aglykon Salicylsäure. Um diese beiden Komponenten miteinander reagieren zu lassen, werden zunächst 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glycopyranosylbromide, wie in Kapitel 7.1 beschrieben, hergestellt. Eine Umsetzung dieser geschützten Zuckerkomponenten mit Salicylsäure würde zu einem Produktgemisch führen, da nicht nur die Alkoholfunktion der Salicylsäure, sondern auch die Carboxylgruppe mit dem entsprechenden Zucker reagieren würde. Daher wird für die Synthese Salicylsäuremethylester verwendet.

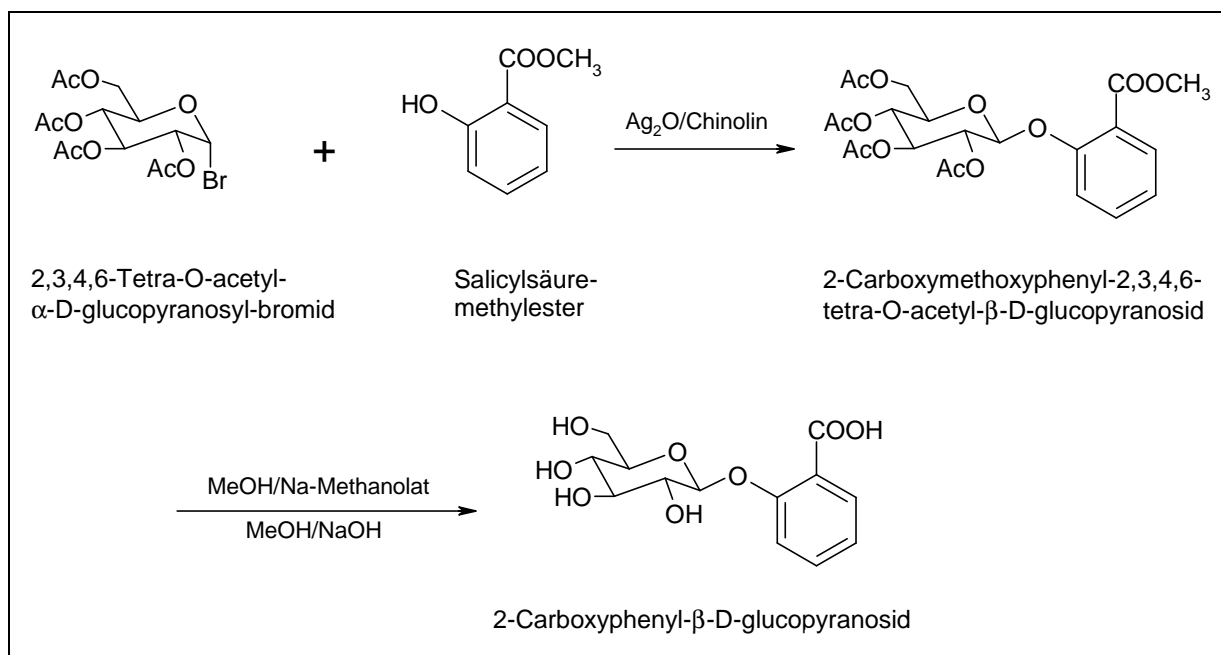


Abb. 20: Synthese des Salicylsäure- β -D-glucopyranosids

Zunächst wird aus 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid und Salicylsäuremethylester das Salicylsäuremethylester- β -D-tetraacetyl-glucopyranosid hergestellt (Gryniewicz et al., 1993). Als Katalysator wird Silberoxid verwendet. Nach einer zweistufigen Entschützungsreaktion mit Natriummethanolat- und Natriumhydroxid-Lösung erhält man das Salicylsäure- β -D-glucopyranosid mit einer Ausbeute von 18%.

Analog zu der beschriebenen Reaktion wird das Salicylsäure- β -D-galactopyranosid mit einer Ausbeute von 1.7% hergestellt.

Außerdem haben wir auf diese Weise das Salicylsäure- β -L-glucopyranosid mit einer Ausbeute von 34% synthetisiert.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigen die Kopplungskonstanten von 7.3 bis 7.6 Hz zwischen 1-H und 2-H die β -Konfiguration der Glycoside.

7.2.2 Salicylsäure- α -glycopyranosid-Synthese

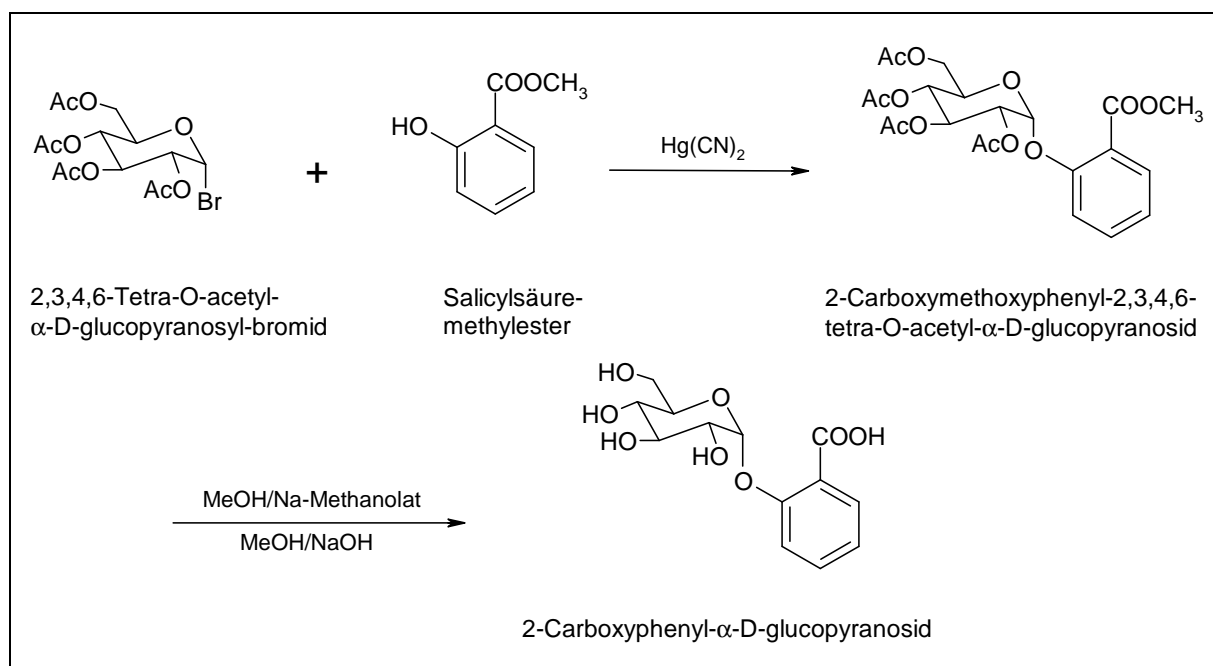


Abb. 21: Synthese des Salicylsäure- α -D-glucosids

Zur Synthese des Salicylsäure- α -glycopyranosids werden ebenfalls 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -glycopyranosylbromiden und Salicylsäuremethylester verwendet. Allerdings wird als Katalysator Quecksilbercyanid verwendet und die Reaktion findet ohne Zusatz von Lösungsmittel in der Schmelze statt (Hartiala und Krieger, 1963).

Die Ausbeute beträgt bei dieser Synthese 32%. Die α -Konfiguration wird durch die Kopplungskonstante von 3.7 Hz zwischen 1-H und 2-H bestätigt.

7.2.3 α -/ β -Salicin-Synthesen

Zur Synthese von α -Salicin soll ein ähnliches Verfahren wie zur Herstellung des Salicylsäure- α -glucosids verwendet werden. Salicin setzt sich aus dem Glykon Glucose und dem Aglykon Saligenin zusammen. Diese beiden Edukte können nicht ohne weiteres miteinander umgesetzt werden. Als Zuckerkomponente wird wie auch bei den Salicylsäure-Glycosiden 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid verwendet. Eine direkte Reaktion mit dem Salicylalkohol würde aufgrund der zwei Hydroxylgruppen zu einem Produktgemisch von Salicin und Isosalicin führen. Daher wollen wir zunächst Salicylaldehyd mit der Zuckerkomponente zu Tetra-acetyl- α -helicin umsetzen und anschließend die Aldehydfunktion zur Alkoholgruppe reduzieren. Dieser Reaktionsweg wird in der Literatur zur Herstellung von Tetra-acetyl- β -helicin und anschließender Reduktion zu β -Salicin beschrieben (Meier, 2004).

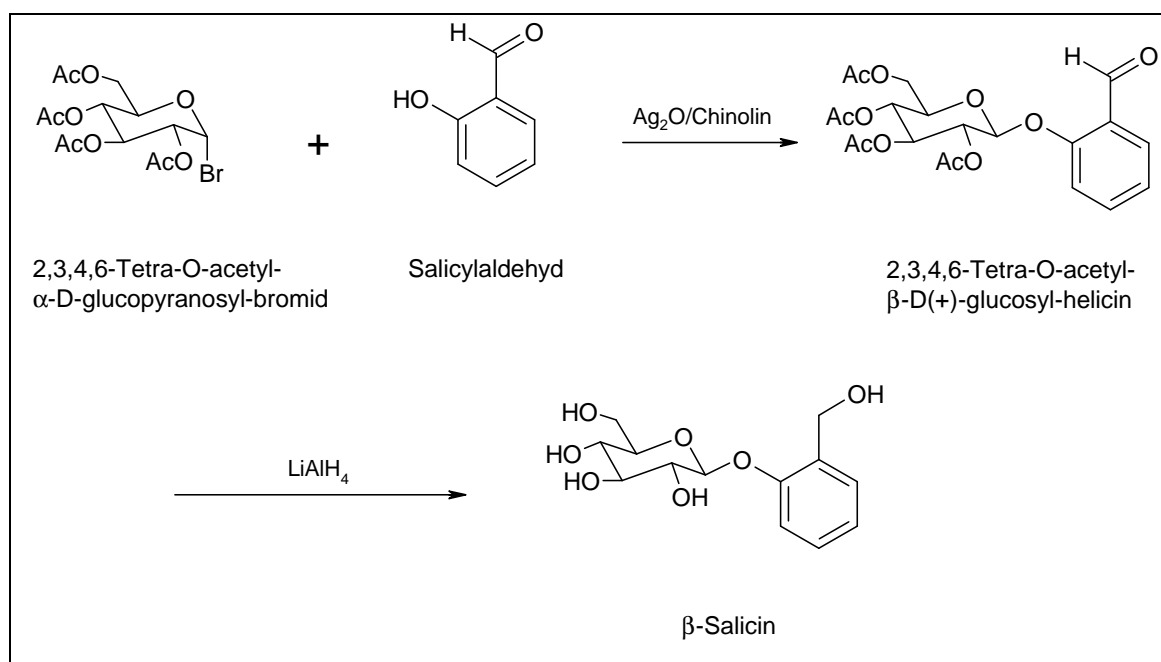


Abb. 22: Synthese von Tetra-acetyl- β -helicin

Nach dem Mischen von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid, Salicylaldehyd und Quecksilbercyanid kommt es allerdings innerhalb kurzer Zeit zu einer Dunkelfärbung des Reaktionsgemisches, selbst bei Kühlung im Eisbad. Aus dem sirupartigen Gemisch wird eine schwarze, zähe Masse, die sich nicht weiter aufarbeiten lässt. Von einem ähnlichen Problem berichtet auch Guder in seiner Dissertationsschrift. Bei der versuchten Umsetzung eines

Trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-acetyl-glucosides mit Silylethern des Hydrochinons, Resorcins und Brenzcatechins kam es ebenfalls zu einer Dunkelfärbung, die nicht weiter erklärt werden kann (Guder, 1984).

Da die Umsetzung zu Tetra-acetyl- α -helicin mit dem Aldehyd nicht realisierbar scheint, wird dieser durch Saligenin ersetzt. Wie bereits besprochen, führt der Einsatz von Saligenin zu einem Produktgemisch aus Salicin und Isosalicin. Deshalb wird die aliphatische Hydroxylgruppe des Salicylalkohols mittels einer Acetylgruppe geschützt.

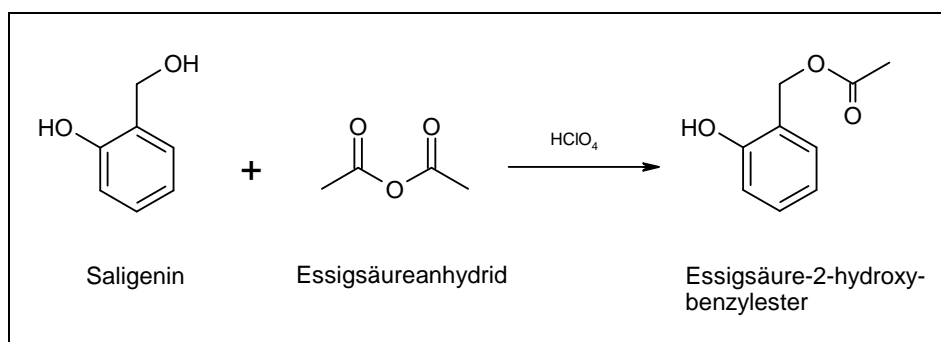


Abb. 23: Synthese des Essigsäure-2-hydroxybenzylesters

Vorteil dieses Reaktionsschemas ist die Verkürzung der Reaktionsschritte. Nach Herstellung von Essigsäure-2-(tetra-acetyl-glycosyl-)benzylester entfällt die Reduktion, die im Falle des Aldehyds nötig gewesen wäre. Einzig die Hydroxylgruppen der Glykon- und Aglykonkomponente müssen entschützt werden.

Um die Durchführbarkeit der Reaktion zu überprüfen, wird zunächst 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid mit Essigsäure-2-hydroxy-benzylester in Chinolin und Silberoxid als Katalysator zu Essigsäure-(tetra-acetyl- β -glucosyl-)benzylester umgesetzt. Nach Hydrolyse der Schutzgruppen ergibt die Reaktion eine Ausbeute von 10% β -Salicin.

Das β -Glucosid kann eindeutig durch die Kopplungskonstante $J = 7.3$ Hz zwischen 1-H und 2-H nachgewiesen werden.

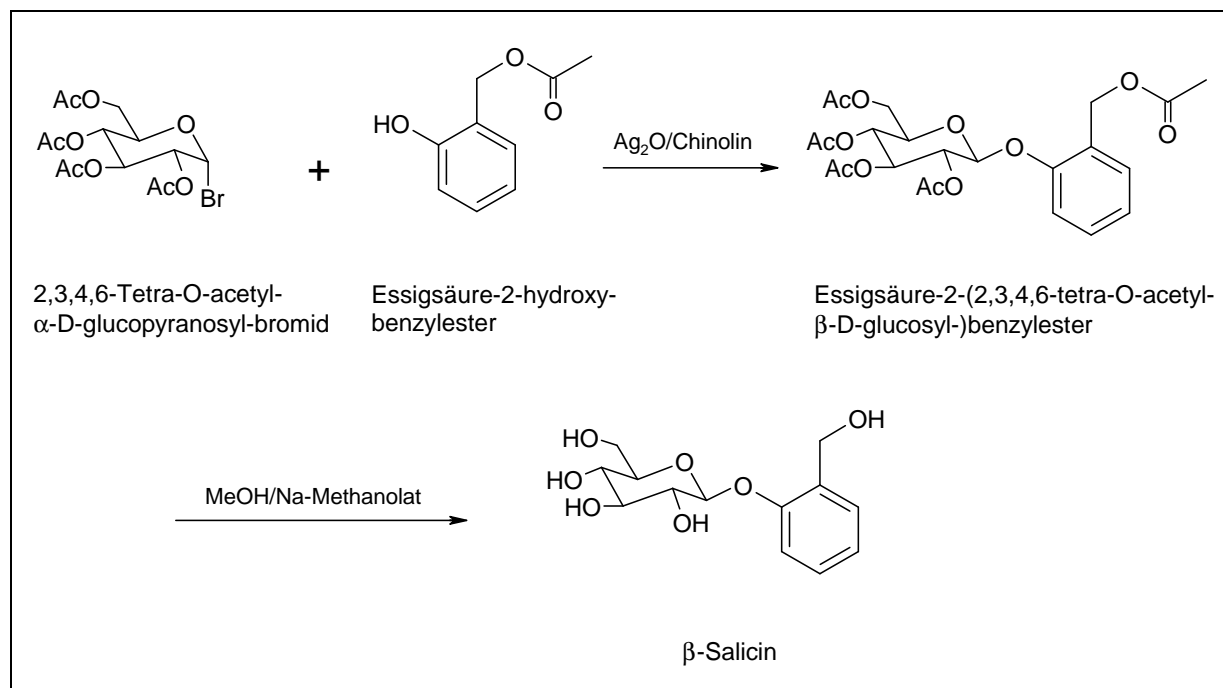


Abb. 24: Synthese von β -Salicin

Unter gleichen Reaktionsbedingungen wird anschließend auch das 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid zu Essigsäure-(tetra-acetyl- β -galactosyl-)benzylester umgesetzt. Nach Entschützung der Substanz erhält man das Galactose-Analogon von β -Salicin mit einer Ausbeute von 18%. Auch hier kann die β -Konfiguration zwischen 1-H und 2-H mit $J = 7.8$ Hz belegt werden.

Nach erfolgreicher Synthese von β -Salicin und seinem Galactose-Analogon wird die Herstellung des α -Glucosids versucht. Als Katalysator wird Quecksilbercyanid verwendet. Sowohl bei einer Reaktionstemperatur von 40°C als auch bei Raumtemperatur kommt es ähnlich wie bei dem Versuch der Umsetzung des Aldehyds zu einer Dunkelfärbung. Daher wird die Reaktion bei 12°C durchgeführt. Da das Reaktionsgemisch bei dieser Temperatur zu viskos zum Rühren ist, wird als Lösungsmittel Dichlormethan zugesetzt. Nach Umsetzung und Reinigung erhält man eine Ausbeute von 0.25% und durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum stellt sich heraus, dass es sich um ein α -/ β -Salicin-Gemisch handelt. Wegen der geringen Ausbeute erscheint der Versuch einer Trennung der Stereoisomere nicht lohnenswert.

Nach der schlechten Ausbeute des oben beschriebenen Reaktionsweges wird eine von uns zunächst als wenig aussichtsreich eingestufte Synthesevorschrift von Helferich zur Herstellung von α -Salicin getestet (Helferich et al., 1934).

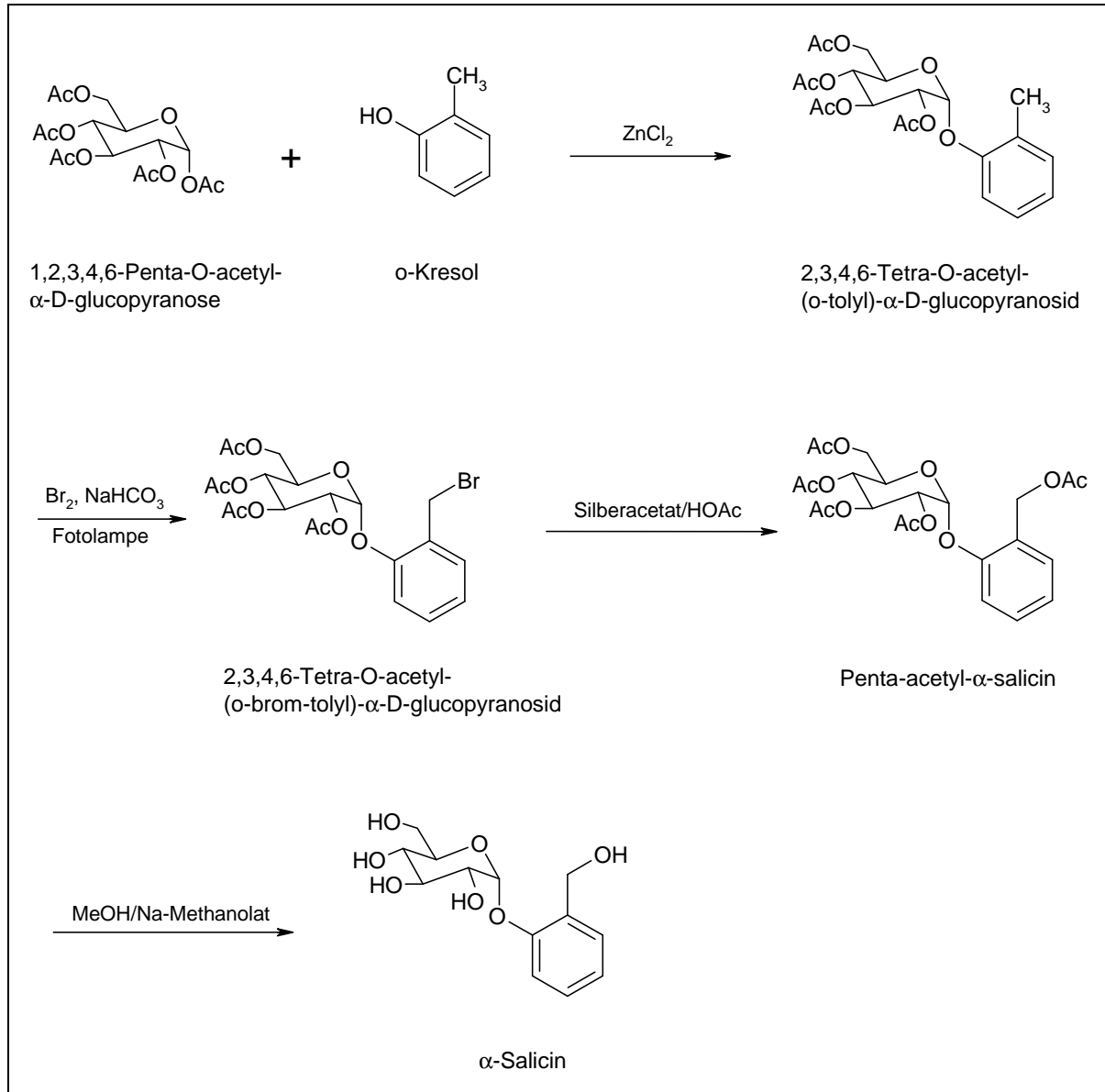


Abb. 25: Synthese von α -Salicin nach der Methode von Helferich

Dabei wird Penta-acetyl-glucose mit o-Kresol und Zinnchlorid als Katalysator zunächst zu Tetra-acetyl-(o-tolyl)- α -glucopyranosid umgesetzt. Anschließend wird aus diesem Produkt in Chloroform mit Brom und in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat mittels Belichten das Tetra-acetyl-(o-brom-tolyl)- α -glucosid gewonnen. Durch Behandlung mit Silberacetat wird

das Brom gegen eine Acetylgruppe ausgetauscht. Nach anschließender Verseifung erhält man eine leicht gelbliche sirupöse Masse, die zum größten Teil aus α -Salicin mit einem geringen Anteil an β -Salicin besteht. Um die β -Verbindung zu entfernen, haben wir in Ergänzung der Helferich-Vorschrift den Ansatz mit β -Glucosidase versetzt. Nach anschließender chromatographischer Reinigung erhalten wir α -Salicin in einer Ausbeute von 3%.

8. In-vitro-Untersuchungen des α -Salicins

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Stabilität der beiden Salicin-Isomere gegenüber künstlichem Magen- und Darmsaft untersucht.

8.1 Behandlung mit künstlichem Magensaft

Bereits Steinegger berichtete in seinen Versuchen von der Stabilität des β -Salicins gegenüber 0.5%iger Salzsäure (Steinegger und Hövel, 1972).

α - und β -Salicin werden mit künstlichem Magensaft, hergestellt nach einer Vorschrift der USP (USP24-NF19, 2000), 90 Minuten lang bei 37 ± 1 °C behandelt. Die Lösungen werden nach 15, 30, 60 und 90 Minuten dünnschichtchromatographisch untersucht. Es fand bei beiden Glucosiden keine Spaltung in Glykon und Aglykon statt. Es konnte sowohl unter UV-Licht als auch nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz kein Salicylalkohol detektiert werden.

8.2 Behandlung mit künstlichem Darmsaft

α - und β -Salicin werden außerdem mit künstlichem Darmsaft, hergestellt nach einer Vorschrift der USP (USP24-NF19, 2000), 90 Minuten lang bei 37 ± 1 °C behandelt. Auch hier ergibt die dünnschichtchromatographische Untersuchung nach 15, 30, 60 und 90 Minuten keine Glucosidspaltung der beiden Substanzen. Offensichtlich kann auch α -Salicin durch die im künstlichen Darmsaft enthaltenen Amylasen nicht gespalten werden. Nicht auszuschließen ist aber eine Hydrolyse mittels α -Glucosidasen, die im menschlichen Körper häufig anzutreffen sind. Ob diese Spaltung zu einer schnelleren Bereitstellung des Salicylalkohols führt, muss in Zukunft noch *in vivo* überprüft werden.

9. Salicylsäurearachidonat

Nach der Entschlüsselung des Wirkmechanismus von Paracetamol (Högestätt und Zygmunt, 30.01.2003) wird in unserer Arbeitsgruppe untersucht, ob auch andere Substanzen aus der Gruppe der kleinen Analgetika einen ähnlichen zentralen Effekt aufweisen.

Wie zuerst in einer Patentanmeldung (Högestätt und Zygmunt, 30.01.2003) aufgeführt, wird Paracetamol nach Hydrolyse zu 4-Aminophenol *in vivo* wieder von Arachidonsäure acyliert. Dies geschieht im ZNS, da dort die Aktivität der Fettsäureamidhydrolase ausreicht, bei entsprechender Konzentration von 4-Aminophenol die Reaktion in Richtung des Arachidonsäureamids zu katalysieren. Dieses Amid hemmt die COX-1 und COX-2 in Konzentrationen, die im ZNS nach der Gabe der üblichen Paracetamol-Dosen erreicht werden. (Außerdem ist es ein Ligand an Cannabis- und Vanilloid-Rezeptoren.)

Zunächst synthetisiert Herr Rogosch aus unserer Arbeitsgruppe das Arachidonsäureamid des Metamizols. Nach Metamizol-Gabe an Mäusen wurde diese Verbindung im Maushirn isoliert. Daran anschließende Cyclooxygenase-Hemmtests verliefen weitgehend viel versprechend und können in der Dissertationsschrift von Herrn Rogosch (Rogosch, 2005) nachgelesen werden.

Zu weiteren Untersuchungen wird daher im Zuge der vorliegenden Arbeit der Salicylsäure-Arachidonsäure-Ester synthetisch hergestellt. Auch diese Verbindung soll im Mäusehirn nachgewiesen und anschließend auf COX-Hemmung getestet werden. Die Arbeiten zum Nachweis des Esters *in vivo* sind momentan noch nicht abgeschlossen.

9.1 Synthese des Salicylsäurearachidonats

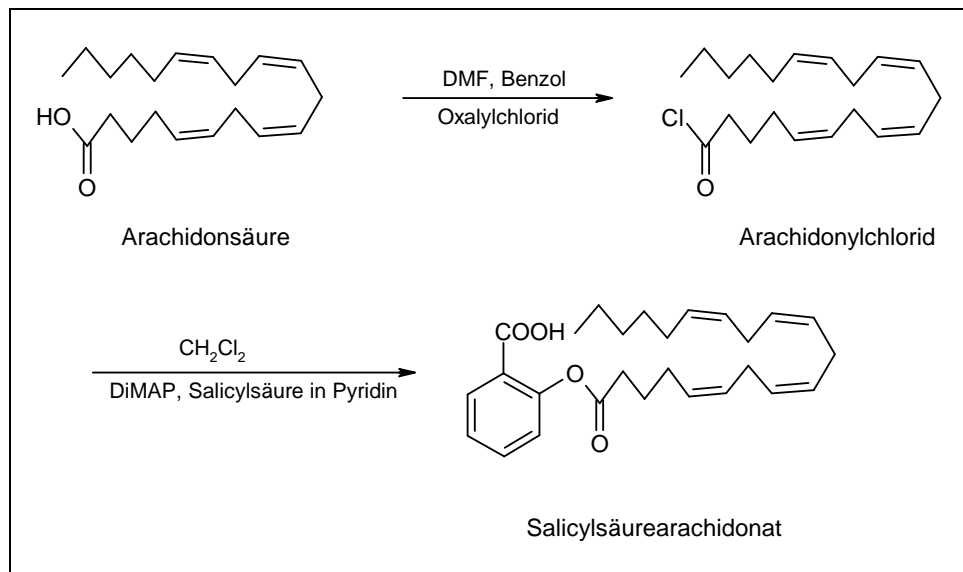


Abb. 26: Synthese des Salicylsäure-Arachidonsäure-Esters

Zunächst wird aus Arachidonsäure mittels Oxalylchlorid das Säurechlorid der Arachidonsäure hergestellt. Dieses wird anschließend mit Salicylsäure zu Salicylsäurearachidonat umgesetzt.

Die Aufarbeitung der Substanz gestaltet sich äußerst schwierig. Eine Ausschüttlung im Sauren zur Entfernung des Pyridins ist ohne weiteres möglich. Eine Ausschüttlung im Basischen zur Entfernung freier Arachidonsäure und Salicylsäure ist aufgrund der Emulgatoreigenschaften des Produkts nicht durchführbar. Die nicht verbrauchte Salicylsäure lässt sich leicht durch chromatographische Trennverfahren entfernen. Arachidonsäure hingegen lässt sich hingegen kaum von dem Produkt trennen, da beide Substanzen mit den verschiedensten Fließmittelgemischen ein annähernd gleiches chromatographisches Verhalten zeigen. Daher sollte das Arachidonylchlorid im Verhältnis zur Salicylsäure im leichten Unterschuss (0.69 mol:0.8 mol) eingesetzt werden, damit ein möglichst großer Teil des Arachidonylchlorids umgesetzt wird und somit nur wenig Arachidonsäure vom Endprodukt getrennt werden muss.

Zum Nachweis des Produkts im Mäusehirn reicht die erlangte Reinheit von ca. 95 % aus, da der Ester dabei nur als Referenzsubstanz im LC/MS dient.

Zur Untersuchung der COX-Hemmung muss allerdings noch ein Weg zur vollständigen Reinigung des Produkts gefunden werden.

10. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt im Vergleich zur Einnahme von Salicin als Reinsubstanz keine Nachteile bezüglich der maximalen Plasmakonzentration aufweist. Inwieweit sich allerdings die Begleitsubstanzen des Extrakts auf die Verträglichkeit bei längerer Anwendung auswirken, konnte durch eine einmalige Applikation nicht geklärt werden.

Bei der Applikation von Weidenrinden-Extrakt spielt die Zusammensetzung des Extrakts eine wichtige Rolle, wie ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Zu hohe Salicortin-Anteile im Extrakt wirken sich nachteilig auf den Salicylsäure-Plasmaspiegel aus. Daher sollten die genuin in der Rinde enthaltenen Salicin-Ester bereits während der Herstellung des Extraktes zu Salicin hydrolysiert werden.

Da man durch die Einnahme von Weidenrinden-Extrakt standardisiert auf 240 mg Salicin kaum an Salicylsäure-Plasmaspiegel bei der Einnahme einer äquimolaren Menge synthetischer Salicylate heranreicht, ist in Anknüpfung an die durchgeführte Studie eine Einnahme höherer Dosen Weidenrinden-Extrakt interessant.

α -Salicin wurde synthetisiert und *in vitro* untersucht. Es kam weder im künstlich hergestellten Magen- noch im Darmsaft zu einer Hydrolyse des Glucosids. Dennoch bleibt offen, ob und wie schnell ein α -Glucosid im menschlichen Körper verstoffwechselt wird. Zu näheren Untersuchungen könnte zunächst das synthetisch hergestellte Salicylsäure- α -glucosid verwendet werden, da dieses Glucosid im Vergleich zu α -Salicin relativ leicht und schnell herzustellen ist. Auch die Umkristallisation zur Reinigung stellt bei dieser Verbindung kein Problem dar.

Die tierexperimentellen Untersuchungen zu dem Salicylsäurearachidonat stehen noch aus und sind im Zusammenhang mit der Arbeit von Herrn Rogosch aus unserer Arbeitsgruppe von großem Interesse. Für weitere Untersuchungen zur Hemmung der Cyclooxygenase muss noch an der chromatographischen Reinigung gearbeitet werden.

III. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Vorbemerkungen

1.1 Allgemeines

Es wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet, deren Reinigung und Trocknung nach Standardmethoden der Literatur erfolgten.

Die Bezifferung und Bezeichnung der Substanzen wurde an die Beilstein-Nomenklatur angelehnt.

1.2 Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Firma Macherey-Nagel, Düren, verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm.

Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden PSC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄, 2 mm der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Die Flash-Säulenchromatographie wurde entsprechend der Methode von Still et al. (Still et al., 1978) mit Kieselgel 60, Korngröße 40-63 µm (230-400 mesh ASTM) der Firma Macherey-Nagel, Düren durchgeführt.

1.3 Analytik

NMR-Spektren: ¹H- und ¹³C-Messungen wurden an einem Jeol JNM-GX-400 und Eclipse+ 500 durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ-Skala. Als Standards dienten internes Tetramethylsilan (TMS) oder

das verwendete Lösungsmittel. Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s	Singulett
d	Dublett
dd	Dublett von Dubletts
ddd	Dublett von Dublett von Dubletts
t	Triplett
dt	Dublett von Triplett
q	Quartett
qi	Quintett
m	Multiplett

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit dem Delta NMR Processing Programm Version 4.3 der Firma Jeol, USA.

Massenspektrometrie: Die Aufnahme der Massenspektren wurde mit einem doppel fokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer vom Typ VG 7070 H der Firma Vacuum Generators (Elektronenstoßionisation, 70 eV) durchgeführt. Es sind relative Peakintensitäten angegeben.

Elementaranalysen: Die Elementaranalysen wurden mit einem CH-Analyser nach Salzer der Firma Labormatic/Wösthoff und einem CHN-Autoanalyser 185 der Firma Hewlett-Packard durchgeführt. Die Angaben aller ermittelten Werte erfolgten in Prozent.

1.4 Chemikalien und Materialien

Zur Extraktion von Salicortin wurden Weidentriebspitzen der Firma Martin Bauer, Vestenbergsgreuth, verwendet.

Zur Herstellung der Glycoside wurden handelsübliche Chemikalien verwendet.

Chinolin wurde vor Gebrauch unter Anlegen eines Wasserstrahl-Vakuums frisch destilliert.

Zur Herstellung der 0.25 M Natriummethanolat-Lösung wurden 0.5 g elementares Natrium in 50 ml abs. Methanol gelöst.

Als Kationenaustauscher wurde Amberlite® IR-1200 der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Das Enzym β -Glucosidase zur Spaltung von β -Salicin wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen, bezogen und besaß eine Aktivität von 12.4 U/mg.

Pepsin mit einer Aktivität von 896 U/mg zur Herstellung des künstlichen Magensaftes nach USP wurde von der Firma Fluka, Schweiz, geliefert.

Pankreatin zur Herstellung des künstlichen Darmsaftes wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen, bezogen und besaß die von der USP geforderten Aktivitäten für die Enzyme Amylase, Lipase und Protease.

Zur Blutentnahme bei der klinischen Studie wurden Braunülen, 2ml- und 5ml-Spritzen sowie Kombistopper der Firma B. Braun, Melsungen, gekauft. Die Verbindungsleitungen zwischen dem Zugang und der Spritze wurden von der Firma B. Braun kostenlos geliefert.

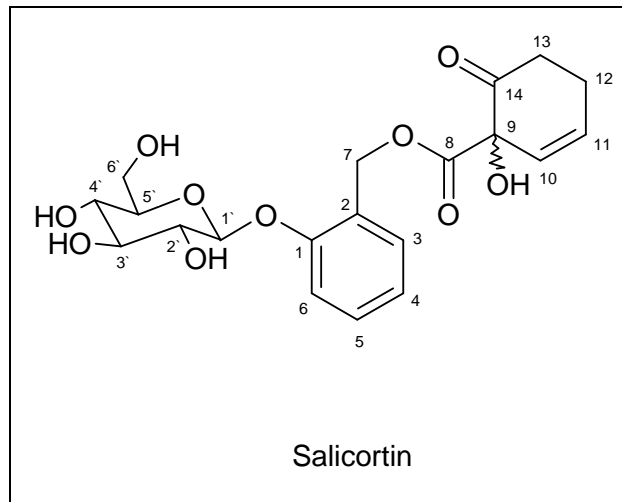
Zur Abtrennung des Plasmas wurden Vacuette EDTA-K₃-Gel-Röhrchen von der Firma Sysmex, Norderstedt, kostenlos zur Verfügung gestellt.

Zur Lagerung des aus der klinischen Studie gewonnenen Plasmas wurden handelsübliche Polypropylen-Cups mit einem Volumen von 2 ml verwendet.

Zur Aufarbeitung der Proben wurden 96-well-SPEC-Kartuschen mit 15 mg einer säure-resistenten C18-Phase der Firma Varian, Darmstadt, und 96-deep-well-Platten der Firma Whatman, USA, verwendet. Ameisensäure p.A. und Methanol wurde von der Firma Merck, Darmstadt, Hexan (HPLC-Qualität) von der Firma Riedel De Haen, Seelze, und Ameisensäure 99.99% von der Firma Aldrich, Taufkirchen, bezogen.

2. Vorschriften und Daten zur klinischen Studie

2.1 Isolierung von Salicortin aus Weidenrinde



Drogenvorbereitung:

Die Weidentriebspitzen werden mit Hilfe einer elektrischen Kaffeemühle zerkleinert.

Extraktion:

20 g gemahlene Weidentriebspitzen werden 20 Minuten unter gelegentlichem Schütteln mit 100 ml Methanol extrahiert. Die festen Bestandteile werden abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein grünlicher fester Schaum.

Reinigung:

Die Reinigung erfolgt in 2 Schritten.

Der Rückstand wird zunächst per Flash-Chromatographie über Kieselgel (60 g) vorgereinigt.

Als Fließmittel verwendet man ein Dichlormethan-Methanol-Gemisch (4:1). Bis zur vollständigen Elution werden ca. 150 ml Fließmittel benötigt.

Danach werden die vorgereinigten Fraktionen vereint, das Fließmittel am Rotationsverdampfer entfernt und über eine Sephadex-Säule (Sephadex LH-20) erneut chromatographisch gereinigt. Als Fließmittel wird ein Wasser-Methanol-Gemisch (9:1) verwendet. Bis zur vollständigen Elution werden ca. 100 ml Fließmittel benötigt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt eine zähe, klare Masse zurück.

Ausbeute: 225 mg (1.25% bezogen auf gemahlene Weidentriebspitzen)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) =	7.25-7.19 (m, 2H, 3-H, 5-H)
	7.04-7.02 (d, 1H, 6-H, $J = 8.2$ Hz)
	6.98-6.96 (t, 1H, H-4, $J = 7.5$ Hz)
	6.02-5.99 (dt, 1H, 11-H, $J = 9.6$ Hz, 3.9 Hz)
	5.72-5.70 (d, 1H, 10-H, $J = 9.8$ Hz)
	5.31-5.28 (d, 1H, 7- H_a , $J = 12$ Hz)
	5.14-5.12 (d, 1H, 7- H_b , $J = 12$ Hz)
	4.91-4.90 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.1$ Hz)
	3.82-3.49 (m, 6H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'- H_a , 6'- H_b)
	2.83-2.78 (m, 1H, 13- H_a)
	2.6-2.39 (m, 3H, 13- H_b , 12- H_a , 12- H_b)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 125 MHz)

δ (ppm) =	206.16, 170.05, 155.51, 132.10, 130.37, 130.13, 127.60, 124.47, 122.64,
	115.67, 101.06, 78.28, 76.12, 75.80, 73.34, 69.47, 64.02, 61.52, 35.39,
	26.49

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 447 (100) [$\text{M}^+ + \text{Na}^+$], 871 (81) [$2\text{M}^+ + \text{Na}^+$],

HR-MS [$\text{M}^+ + \text{Na}^+$]: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$

Ber.: 447.1293

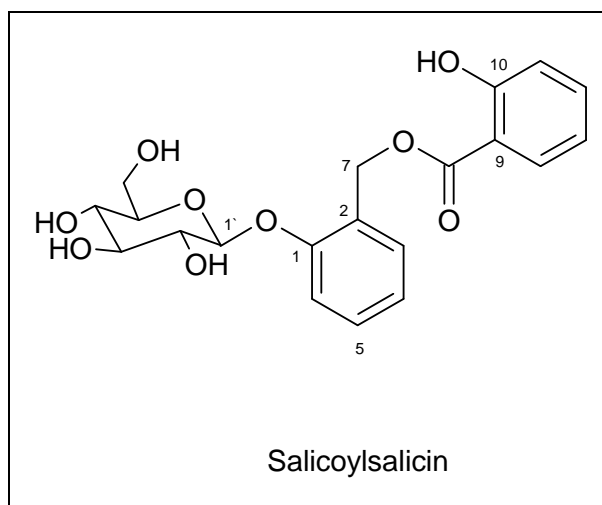
Gef.: 447.1267

Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} -161.3^\circ$ ($c = 10.6$ g/100 ml, H_2O , RT)

$[\alpha]_{\text{D}} -164.2^\circ$ (Thieme, 1964b)

Schmelzpunkt: nicht bestimmbar, da keine Kristalle vorliegen und die Substanz sehr hygroskopisch ist

2.2 Herstellung von Salicoylsalicin



Substanzen:

Salicortin	45.8 mg	(0.11 mmol)
4 M Salzsäure	1 ml	

Durchführung:

45.8 mg Salicortin werden mit ca. 1 ml 4 M Salzsäure versetzt und 24 Stunden stehengelassen. Der gebildete Feststoff wird abfiltriert, mit demin. Wasser gewaschen und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 12 mg (0.03 mmol; 27% bezogen auf Salicortin)

¹H-NMR (DMSO-d₆; 500 MHz)

δ (ppm) =	10.52 (s, 1H, -OH)
	7.84-7.82 (dd, 1H, 11-H, J = 8 Hz, 1.6 Hz)
	7.54-7.51 (ddd, 1H, 13-H, J = 7.1 Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz)
	7.44-7.42 (dd, 1H, 3-H, J = 7.6 Hz, 1.7 Hz)
	7.36-7.32 (dt, 1H, 5-H, J = 8.3 Hz, 1.7 Hz)
	7.21-7.20 (d, 1H, 6-H, J = 7.8 Hz)
	7.07-7.04 (dt, 1H, 4-H, J = 7.5 Hz, 0.9 Hz)

7.00-6.98 (dd, 1H, 14-H, $J = 8.4 \text{ Hz}, 0.8 \text{ Hz}$)
6.96-6.93 (dt, 1H, 12-H, $J = 7 \text{ Hz}, 1.1 \text{ Hz}$)
5.50-5.43 (dd, 2H, 7-H_a, 7-H_b, $J = 21.5 \text{ Hz}, 12.9 \text{ Hz}$)
4.88-4.86 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.8 \text{ Hz}$)
3.72-3.69 (m, 1H, 6'-H_a)
3.50-3.45 (m, 1H, 6'-H_b)
3.35-3.25 (m, 3H, 2'-H, 3'-H, 5'-H)
3.19-3.15 (m, 1H, 4'-H)

¹³C-NMR (DMSO-d₆; 125 MHz)

δ (ppm) = 168.56, 160.01, 155.30, 135.58, 130.14, 129.56, 128.92, 124.48, 121.85,
119.38, 117.28, 115.24, 113.09, 101.12, 77.07, 76.48, 73.28, 69.71, 62.08,
60.72

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 429 (100) [$M^+ + Na^+$], 835 (31) [$2M^+ + Na^+$]

HR-MS [$M^+ + Na^+$]: C₂₀H₂₂O₉

Ber.: 429.1120

Gef.: 429.1162

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D -41.9^\circ$ ($c = 0.25 \text{ g}/100 \text{ ml}$, Aceton, RT)

$[\alpha]_D -43.8^\circ$ (Charaux und Rabate, 1942)

Schmelzpunkt: 167-168 °C

168-170 °C (Charaux und Rabate, 1942)

2.3 Klinische Studie

In der Studie wird die Salicylsäure-Konzentration im Plasma nach der Einnahme von Weidenrinden-Extrakt, β -Salicin und Salicortin verglichen.

An der Studie nehmen drei gesunde weibliche Probanden im Alter von 28 bis 30 Jahren und ein gesunder männlicher Proband im Alter von 30 Jahren teil.

Alle Probanden stehen während der klinischen Studie nicht unter medikamentöser Behandlung. Keiner der Probanden hat sich bis 6 Monate vor der Studie einer Antibiotika-Therapie unterzogen. Außerdem wurde in diesem Zeitraum auf den Genuss von probiotischen Nahrungsmitteln verzichtet. Zwei Wochen vor Beginn der Studie wurden keine nicht-steroidalen Antirheumatika /Analgetika mehr eingenommen.

Die Einnahme der verschiedenen Substanzen erfolgt in einem Abstand von drei Wochen.

Vor der oralen Gabe der Substanzen wird den Probanden ein venöser Zugang gelegt.

Die Blutentnahme von je 5 ml erfolgt nach der Einnahme über 7 Stunden nach folgendem Zeitschema: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360 und 420 Minuten.

Die Blutproben werden in Kalium-EDTA-Röhrchen gefüllt und 15 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Das EDTA-Plasma wird abgetrennt und bis zur Bearbeitung bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.1 Einnahme von Weidenrinden-Extrakt

1.46 g Weidenrinden-Extrakt (entspricht einem Salicingehalt von 240 mg) werden in ca. 100 ml Wasser suspendiert und den nüchternen Probanden verabreicht.

Die Blutentnahme erfolgte nach der Einnahme über 8 Stunden nach folgendem Schema:

Probe	Zeit [h]	c(Salicylsäure) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	5,53	16.7	0
2	0.5	2480	1180	838	1530
3	1	2510	965	822	2630
4	1.5	2300	855	1080	2450
5	2	2200	793	835	1300
6	2.5	2840	1410	-	1310
7	3	4500	2500	-	1960
8	3.5	4350	2930	845	2170
9	4	3970	2340	1330	1830
10	5	3280	2100	1370	1290
11	6	2440	1500	1240	970
12	7	1590	845	1020	740
13	8	1290	519	814	591

Tab. 3: Salicylsäure-Konzentration im Plasma nach Applikation von WRE

Probe	Zeit [h]	c(Saligenin) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	0	0	0
2	0.5	16.2	23.9	51	34.3
3	1	48.9	59.8	90.9	220
4	1.5	83.2	67.2	238	244
5	2	34.6	113	132	101
6	2.5	72.1	179	-	107
7	3	145	198	-	253
8	3.5	91.7	248	118	306
9	4	93.7	214	218	193
10	5	70	176	123	132
11	6	35.2	72.5	156	90.1
12	7	4.35	30.2	81.3	83
13	8	1.17	22.6	51.8	38.9

Tab. 4: Saligenin-Konzentration im Plasma nach Applikation von WRE

2.3.2 Einnahme von β -Salicin

240 mg Salicin werden in ca. 100 ml Wasser gelöst und den nüchternen Probanden verabreicht.

Die Blutentnahme erfolgte nach der Einnahme über 8 Stunden nach folgendem Schema:

Probe	Zeit [h]	c(Salicylsäure) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	28.6	0	0
2	0.5	3610	789	934	2620
3	1	4620	742	2340	4470
4	1.5	3870	625	2280	4190
5	2	2710	763	1660	3650
6	2.5	2660	1880	1650	3240
7	3	2480	2300	1570	2100
8	3.5	2140	2550	1180	1870
9	4	1820	2400	1170	1730
10	5	1750	1480	1040	1520
11	6	1290	1160	912	1420
12	7	1020	711	981	983
13	8	762	545	958	836

Tab. 5: Salicylsäure-Konzentration im Plasma nach Applikation von β -Salicin

Probe	Zeit [h]	c(Saligenin) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	0	0	0
2	0.5	124	142	342	503
3	1	176	162	929	1340
4	1.5	165	179	940	672
5	2	108	182	656	1040
6	2.5	106	339	783	993
7	3	119	196	569	357
8	3.5	75	258	309	282
9	4	35.9	201	263	251
10	5	61.5	97.5	210	171
11	6	29.7	53.2	143	196
12	7	18.5	28.6	309	157
13	8	0	6.27	214	237

Tab. 6: Saligenin-Konzentration im Plasma nach Applikation von β -Salicin

2.3.3 Einnahme von Salicortin

178 mg Salicortin werden in ca. 100 ml Wasser gelöst und den nüchternen Probanden verabreicht.

Die Blutentnahme erfolgte nach der Einnahme über 8 Stunden nach folgendem Schema:

Probe	Zeit [h]	c(Salicylsäure) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	0	0	0
2	0.5	1610	190	721	1120
3	1	1470	177	601	666
4	1.5	1340	163	523	495
5	2	1180	161	323	420
6	2.5	696	345	310	447
7	3	610	621	298	374
8	3.5	641	790	252	467
9	4	628	850	257	364
10	5	568	731	216	370
11	6	483	526	199	408
12	7	386	422	189	334
13	8	275	269	190	230

Tab. 7: Salicylsäure-Konzentration im Plasma nach Applikation von Salicortin

Probe	Zeit [h]	c(Saligenin) [ng/ml]			
		Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
1	0	0	0	0	0
2	0.5	153	120	410	408
3	1	200	218	776	193
4	1.5	298	249	560	150
5	2	296	98.1	235	116
6	2.5	90.6	377	217	109
7	3	66.2	219	184	149
8	3.5	82.1	221	89.7	331
9	4	66.5	201	86.2	215
10	5	48.3	203	98.6	195
11	6	45.4	240	70	168
12	7	17	49	131	40
13	8	0	26.6	111	72

Tab. 8: Saligenin-Konzentration im Plasma nach Applikation von Salicortin

2.3.4 Analytik

Zur Bearbeitung der Proben wird die EDTA-Plasma-Salicylsäure-Salicylalkohol-96-well-SPE-LC-MS/MS-Methode verwendet, die von Herrn B. Watzler, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg entwickelt wurde.

Probenvorbereitung:

100 µl EDTA-Plasma	
100 µl Kalibrierkurvenplasma	10 ng/ml; 100 ng/ml; 1000 ng/ml an SA und SAA
100 µl Eichkurvenplasma	0-2.5 µg/ml an SA und SAA
10 µl Interner Standard AV	als Interner Standard wird 4-Methylsalicylsäure (MSA) verwendet
	Stamm-Lösung: 1 µg/µl in Acetonitril
	Arbeitsverdünnung (AV): 5 ng/µl in Acetonitril

Pro Probe werden 10 µl Internen Standard AV zugegeben.

Probenverarbeitung:

Mit einem DIGIFLEX-CX-Dilutor werden 100 µl Plasma- oder Kalibrierprobe mit je 300 µl 0.2% Ameisensäure in Eppendorfcups vorgelegt. Dann werden noch je 10 µl MSA-IS-AV und weitere 300 µl 0.2% Ameisensäure hinzugefügt.

Die Proben werden zentrifugiert. Der Überstand wird in konditionierte 96-well-SPEC-Säulen überführt.

C18-96well-SPEC-Säulen:

Die Säulen werden zunächst mit 0.5 ml Methanol und anschließend mit 0.5 ml Wasser mit einem Anteil von 0.2% Ameisensäure konditioniert.

Nach der Konditionierung werden die Plasmaproben aufgegeben.

Mit 0.5 ml Wasser mit einem Anteil von 0.2% Ameisensäure und mit 0.5 ml Hexan werden die Säulen nachgewaschen.

Die Elution in eine 96-deep-well-Platte erfolgt mit 0.5 ml Methanol. Anschließend wird das Eluent mittels eines schwachen, auf ca. 40°C vorgewärmten Stickstoffstromes entfernt. Da

Saligenin leicht sublimiert, sollte die Platte dem Stickstoffstrom nur so lange ausgesetzt werden, wie für die Verdampfung des Lösungsmittels erforderlich ist.

LC-MS/MS-Vorbereitung:

Fließmittel A: 95% Acetonitril, 5% Wasser, 0.2% Ameisensäure (99.99%)

Fließmittel B: 5% Acetonitril, 95% Wasser, 0.2% Ameisensäure (99.99%)

Flussrate: 200 µl/min

Zeit (min)	Fließmittel A	Fließmittel B
1.0	5%	95%
10.0	70%	30%
22.1	5%	95%

LC-MS/MS

Je Probe werden 20 µl injiziert und der Gehalt an Salicylsäure und Saligenin wird nach der negativen ESI-LC-MS/MS Gradienten-Methode bestimmt.

Chromatographische Bedingungen:

Das HPLC-System besteht aus zwei Perkin Elmer series 200 Pumpen, einem CTC HTS PAL Autosampler (CTC Analytics, Zingen, Schweiz), und einem Applied Biosystems API 3000 triple-quad Tandem-Massenspektrometer (Applied-Biosystems, Thornhill, Kanada), ausgestattet mit einer Turbo-Ion-Quelle.

Für die Quantifizierung mittels Tandem-Massenspektrometer werden die Produkt-Ionen mit der höchsten Intensität herangezogen.

Für die Detektion wird Quadrupol-1 (Q1) so eingestellt, die deprotonierten Moleküle (M-H)⁻ bei m/z 137.0 für Salicylsäure, m/z 151.0 für den internen Standard und m/z 123.0 für

Saligenin zu zeigen. Außerdem werden die Produkt-Ionen über Q3 bei m/z 92.9 für Salicylsäure, m/z 106.9 für den internen Standard und m/z 92.9 für Saligenin gemessen.

Die für jede Einzelsubstanz optimierten massenspektrometrischen Bedingungen werden in Tabelle 9 aufgeführt.

	Salicylsäure	Int. Standard	Saligenin
Scan type	MRM*	MRM	MRM
Polarity	Negative	Negative	Negative
Dwell time	200 ms	200 ms	200 ms
Electrospray gas	6 l/min	6 l/min	6 l/min
Nebulizer (NEB)	10 psi	10 psi	10 psi
Curtain gas (CUR)	10 psi	10 psi	10 psi
Temperature (TEM)	400 °C	400 °C	400 °C
Ionspray voltage (IS)	-4200 V	-4200 V	-4200 V
Collison gas (CAD)	4 psi	4 psi	4 psi
Declustering potential (DP)	-30 V	-35 V	-30 V
Focusing potential (FP)	-110 V	-105 V	-105 V
Entrance potential (EP)	-5 V	-5 V	-5 V
Collision energy (CE)	-25 V	-25 V	-25 V
Cell exit potential (CXP)	-4 V	-19 V	-19V

Tab. 9: Parameter der Massenspektrometrie; *MRM = Multi Reaction Monitoring

2.3.5 Validierung

Die Validierung bringt den Nachweis, dass eine Methode zuverlässig innerhalb der festgelegten Grenzen zum erwarteten Ergebnis führt.

Zur quantitativen Salicylsäure-Bestimmung im Plasma wird die Methode zunächst validiert. Der verwendeten Methode liegt die „Quality Guidelines“ Q2A und Q2B der International Conference on Harmonisation (= ICH) zu Grunde (ICH, 1994; ICH, 1996). Die zur Validierung gehörenden Parameter Linearität, Präzision, Richtigkeit, Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenze, Selektivität und Empfindlichkeit wird im Labor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg überprüft.

Die in Kapitel 2.3.4 beschriebene Methode erweist sich innerhalb der festgelegten Grenzen für Salicylsäure als zuverlässig.

Für Salicylalkohol erwies sich die Methode nicht komplett als präzise und richtig. Die Daten des Salicylalkohols werden daher semiquantitativ ausgewertet.

Ergebnisse der Methodvalidierung

Salicylsäure:

Linearität

Die Überprüfung auf Linearität gibt Aufschluss über den Konzentrationsbereich, in dem die Menge an zu prüfender Substanz mit der Größe des Messsignals korreliert. Die Kalibrierkurve wird über die Ermittlung des Messsignalquotienten aus Salicylsäure und internem Standard im Bezug auf unterschiedliche Salicylsäure-Konzentrationen erstellt. Die beschriebene Methode ist linear im Konzentrationsbereich von 50-2500 ng/ml.

Die Geradengleichung wird über 5 Tage auf Präzision geprüft.

Die Funktion der Regressionsgraden lautet:

$$y = 0.8336x + 21.634$$

$$R^2 = 0.9987$$

Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung der analytischen Methode. Die Präzision wird in der Serie (Intraday) und von Tag zu Tag (Interday) untersucht. Die Methode gilt als präzise, wenn der Variationskoeffizient $< 15\%$ und an der Nachweisgrenze $< 20\%$ ist.

Konzentration [ng/ml]	VK - Intraday [%]	VK - Interday [%]
50	17.8	18.7
100	9.5	14.8
250	3.9	6.1
500	6.0	11.5
1000	4.9	7.2
2500	4.0	4.9

Richtigkeit

Die Richtigkeit beschreibt die Übereinstimmung der gemessenen Werte von den wahren Werten. Die Ergebnisse werden als relative Abweichung von den wahren Werten angegeben. Die Methode gilt als richtig, wenn die relative Abweichung $< 15\%$ und an der Nachweisgrenze $< 20\%$ ist.

Konzentration [ng/ml]	Richtigkeit [%]
50	11.8
100	5.4
250	1.0
500	9.9
1000	10.4
2500	11.1

Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate wird bestimmt, um die Effizienz der Extraktion der Salicylsäure aus den Plasmaproben zu überprüfen. Im untersuchten Messbereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 75-80%

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze gibt die niedrigste Konzentration an, die unter den gewählten analytischen Bedingungen bestimmt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze für Salicylsäure beträgt 5 ng/ml (Signal to noise ratio= 3:1).

Salicylalkohol:**Linearität**

Die Kalibrierkurve wird über die Ermittlung des Messsignalquotienten aus Salicylalkohol und internem Standard im Bezug auf unterschiedliche Salicylalkohol-Konzentrationen erstellt. Die beschriebene Methode ist linear im Konzentrationsbereich von 50-2500 ng/ml.

Die Geradengleichung wird über 5 Tage auf Präzision geprüft.

Die Funktion der Regressionsgraden lautet:

$$y = 0.9496x - 14.222$$

$$R^2 = 0.9989$$

Präzision

Konzentration [ng/ml]	VK - Intraday [%]	VK - Interday [%]
50	20.6	38.1
100	13.7	20.7
250	18.4	23.4
500	13.5	27.3
1000	12.0	23.7
2500	10.5	16.2

Richtigkeit

Konzentration [ng/ml]	Richtigkeit [%]
50	13.8
100	18.2
250	24.6
500	23.4
1000	5.9
2500	5.5

Wiederfindungsrate

Im untersuchten Messbereich liegt die Wiederfindungsrate zwischen 80-90%

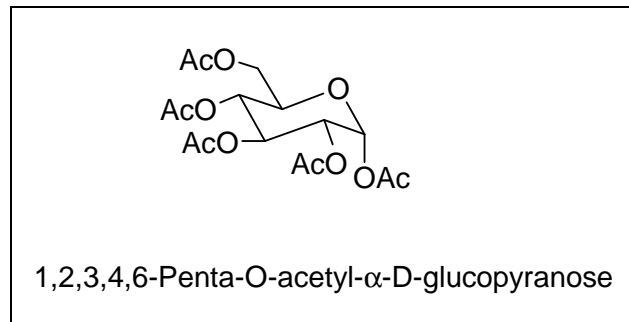
Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze für Salicylalkohol beträgt 10 ng/ml (Signal to noise ratio= 3:1).

3. Synthesevorschriften

3.1 Zuckerderivate

3.1.1 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl- α -D-glucopyranose



Substanzen:

Essigsäureanhydrid	100 ml	(108 g; 1.06 mol)
Perchlorsäure 70%	0.5 ml	
α -D(+)-Glucose	25 g	(0.14 mol)

Durchführung (Furniss et al., 1989):

100 ml Essigsäureanhydrid (Ac_2O) werden unter Rühren auf 4 °C abgekühlt und tropfenweise mit 0.5 ml 70%iger Perchlorsäure (HClO_4) versetzt. Anschließend werden portionsweise 25 g α -D(+)-Glucose zugefügt, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches 40 °C nicht übersteigen darf.

Man lässt die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren, verdünnt mit 100 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) und schüttelt die organische Phase zweimal mit 200 ml Eiswasser und einmal mit 100 ml gesättigter, eisgekühlter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (NaHCO_3) aus. Anschließend wird über Magnesiumsulfat (MgSO_4) getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt eine sirupartige Masse. Diese wird in siedendem Ether gelöst und kristallisiert nach wenigen Stunden im Kühlschrank aus.

Ausbeute: 50 g (0.13 mol; 93% bezogen auf α -D(+)-Glucose)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 6.32-6.31 (d, 1H, 1-H, $J = 3.7$ Hz)
5.47-5.43 (t, 1H, 3-H, $J = 9.8$ Hz)
5.15-5.11 (t, 1H, 4-H, $J = 10$ Hz)
5.10-5.07 (dd, 1H, 2-H, $J = 10.2$ Hz, 3.6 Hz)
4.27-4.23 (dd, 1H, 6_a-H, $J = 12.8$ Hz, 4.1 Hz)
4.11-4.06 (m, 2H, 5-H, 6_b-H)
2.16 (s, 3H, -CH₃)
2.08 (s, 3H, -CH₃)
2.03 (s, 3H, -CH₃)
2.01 (s, 3H, -CH₃)
2.00 (s, 3H, -CH₃)

 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.63, 170.22, 169.64, 169.38, 168.74, 89.06, 69.84, 69.81, 69.17, 67.87,
61.43, 20.87, 20.69, 20.66, 20.56, 20.43

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 43 (100), 115 (44), 157 (35), 242 (32), 331 (6)

Elementaranalyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (390.34)

Ber.: C: 49.23% H: 5.68%

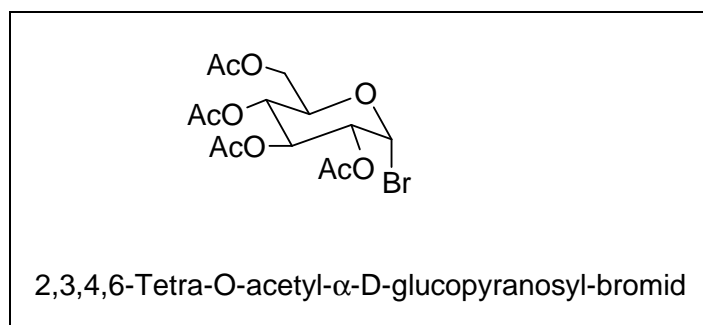
Gef.: C: 49.32% H: 5.56%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} +103^\circ$ ($c = 0.5$ g/100 ml, CHCl_3 , RT)

$[\alpha]_{\text{D}} +104^\circ$ (Hamann et al., 1994)

Schmelzpunkt: 112-113 °C

114-115 °C (Fatiadi, 1968)

3.1.2 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucofuranosyl-bromid**Substanzen:**

Essigsäureanhydrid	390 ml	(421.2 g; 4.13 mol)
Perchlorsäure 70%	2 ml	
α -D(+)-Glucose	90.9 g	(0.51 mol)
roter Phosphor	28.2 g	(0.91 mol)
Brom	53 ml	(165.4 g; 2.07 mol)
demin. Wasser	33 ml	

Durchführung (Furniss et al., 1989):

390 ml Ac_2O werden unter Rühren auf 4 °C abgekühlt und tropfenweise mit 2 ml 70%iger HClO_4 versetzt. Anschließend werden portionsweise 90.9 g α -D(+)-Glucose zugefügt, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches 40 °C nicht übersteigen darf.

Es wird auf 20 °C abgekühlt und zunächst 28.2 g roter Phosphor zugegeben und anschließend 53 ml Brom zugetropft. Die Temperatur darf dabei 20 °C nicht übersteigen.

Zuletzt werden bei einer Temperatur von 20 °C 33 ml demin. Wasser zugetropft.

Man lässt die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren, verdünnt mit 300 ml CH_2Cl_2 und filtriert den roten Phosphor ab. Die organische Phase wird zweimal mit 800 ml Eiswasser und einmal mit 500 ml gesättigter, eisgekühlter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, anschließend über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelber Sirup, der über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert.

Der Feststoff wird mit einer Petrolether-/Diethylether-Mischung (2:1) im Möser verrieben, anschließend abfiltriert, mit Petrolether/Diethylether (2:1) nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 160 g (0.39 mol; 78% bezogen auf α -D(+)-Glucose)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 6.59-6.58 (d, 1H, 1-H, $J = 4.1$ Hz)
5.56-5.52 (t, 1H, 3-H, $J = 9.6$ Hz)
5.16-5.12 (t, 1H, 4-H, $J = 9.7$ Hz)
4.83-4.80 (dd, 1H, 2-H, $J = 10$ Hz, 4 Hz)
4.33-4.26 (m, 2H, 5-H, 6-H)
4.12-4.09 (m, 1H, 6-H)
2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$),
2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.03 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.46, 169.80, 169.75, 169.42, 86.51, 72.10, 70.57, 70.13, 67.13, 60.92,
20.63, 20.62, 20.59, 20.52

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 43 (100), 169 (82), 331 (23), 351 (6), 411 (1) [M^+]

Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{Br}$ (411.20)

Ber.: C: 40.89% H: 4.66%

Gef.: C: 41.25% H: 4.60%

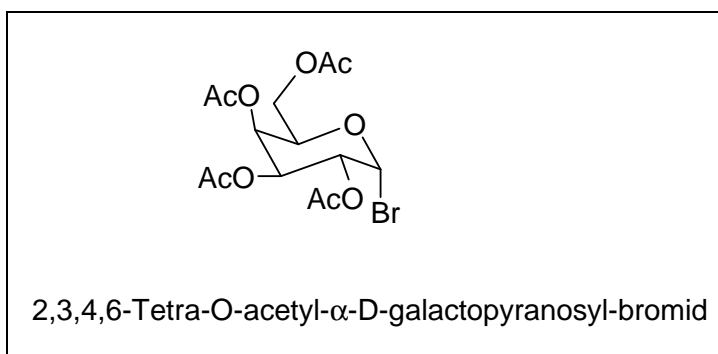
Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} +194^\circ$ ($c = 2$ g/100 ml, CHCl_3 , RT)

$[\alpha]_{\text{D}} +197^\circ$ (Zhang und Magnusson, 1996)

Schmelzpunkt: 87-88 $^\circ\text{C}$

88-89 $^\circ\text{C}$ (Furniss et al., 1989)

3.1.3 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl-bromid



Substanzen:

Essigsäureanhydrid	200 ml	(216 g; 2.12 mol)
Perchlorsäure 70%	1 ml	
α -D(+)-Galactose	50.0 g	(0.28 mol)
roter Phosphor	15.5 g	(0.50 mol)
Brom	29 ml	(90.5 g; 1.13 mol)
demin. Wasser	18 ml	

Durchführung:

200 ml Ac_2O werden unter Rühren auf 4 °C abgekühlt und tropfenweise mit 1 ml 70%iger HClO_4 versetzt. Anschließend werden portionsweise 50.0 g α -D(+)-Galactose zugefügt, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches 40 °C nicht übersteigen darf.

Es wird auf 20 °C abgekühlt und zunächst 15.5 g roter Phosphor zugegeben und anschließend 29 ml Brom zugetropft. Die Temperatur darf dabei 20 °C nicht übersteigen.

Zuletzt werden bei einer Temperatur von 20 °C 18 ml demin. Wasser zugetropft.

Man lässt die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren, verdünnt mit 150 ml CH_2Cl_2 und filtriert den roten Phosphor ab. Die organische Phase wird zweimal mit 400 ml Eiswasser und einmal mit 250 ml gesättigter, eisgekühlter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, anschließend über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelber Sirup, der über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert.

Der Feststoff wird mit einer Petrolether-/Diethylether-Mischung (2:1) im Möser verrieben, anschließend abfiltriert, mit Petrolether/Diethylether (2:1) nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 86.6 g (0.21 mol; 75% bezogen auf α -D(+)-Galactose)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 6.68-6.67 (d, 1H, 1-H, $J = 3.9$ Hz)
5.50-5.49 (dd, 1H, 4-H, $J = 3.3$ Hz, 1.3 Hz)
5.39-5.37 (dd, 1H, 3-H, $J = 10.6$ Hz, 3.2 Hz)
5.04-5.01 (dd, 1H, 2-H, $J = 10.8$ Hz, 3.9 Hz)
4.47-4.45 (t, 2H, 5-H, $J = 6.6$ Hz)
4.18-4.14 (m, 1H, 6_a -H)
4.10-4.07 (m, 1H, 6_b -H)
2.13 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.04 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
1.99 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.28, 170.03, 169.86, 169.71, 88.11, 71.06, 67.98, 67.77, 66.97, 60.81,
20.71, 20.60, 20.55, 20.52

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 43 (100), 169 (59), 351 (8), 331 (8), 411 (2) [M^+]

Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{Br}$ (411.20)

Ber.: C: 40.89% H: 4.66%

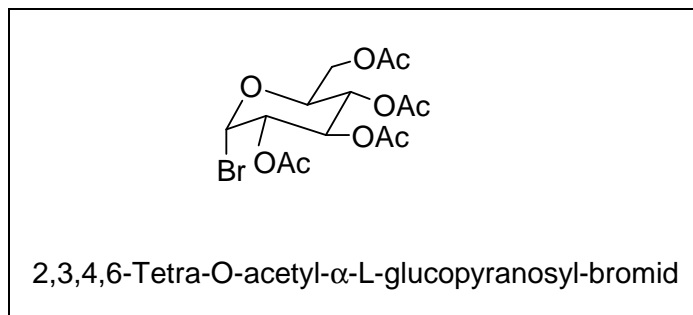
Gef.: C: 41.47% H: 4.63%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D +208^\circ$ ($c = 1$ g/100 ml, CHCl_3 , RT)

$[\alpha]_D +210^\circ$ (Zhang und Magnusson, 1996)

Schmelzpunkt: 81-82 $^\circ\text{C}$

84 $^\circ\text{C}$ (Gryniewicz und Konopka, 1987)

3.1.4 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -L-glucopyranosyl-bromid**Substanzen:**

Essigsäureanhydrid	3.8 ml	(4.08 g; 0.04 mol)
Perchlorsäure 70%	0.02 ml	
α -L(-)-Glucose	0.944 g	(0.005 mol)
roter Phosphor	0.293 g	(0.01 mol)
Brom	0.55 ml	(1.7 g; 0.02 mol)
demin. Wasser	0.34 ml	

Durchführung:

3.8 ml Ac_2O werden unter Rühren auf 4 °C abgekühlt und tropfenweise mit 0.02 ml 70%iger HClO_4 versetzt. Anschließend wird portionsweise 0.944 g α -L(-)-Glucose zugefügt, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches 40 °C nicht übersteigen darf.

Es wird auf 20 °C abgekühlt und zunächst 0.293 g roter Phosphor zugegeben und anschließend 0.55 ml Brom zugetropft. Die Temperatur darf dabei 20 °C nicht übersteigen.

Zuletzt werden bei einer Temperatur von 20 °C 0.34 ml demin. Wasser zugetropft.

Man lässt die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren, verdünnt mit 5 ml CH_2Cl_2 und filtriert den roten Phosphor ab. Die organische Phase wird zweimal mit 10 ml Eiswasser und einmal mit 5 ml gesättigter, eisgekühlter NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, anschließend über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelber Sirup, der über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert.

Der Feststoff wird mit einer Petrolether-/Diethylether-Mischung (2:1) im Möser verrieben, anschließend abfiltriert, mit Petrolether/Diethylether (2:1) nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.64 g (3.99 mmol; 80% bezogen auf α -L(-)-Glucose)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 6.59-6.58 (d, 1H, 1-H, $J = 4.1$ Hz)
5.55-5.52 (t, 1H, 3-H, $J = 9.8$ Hz)
5.16-5.12 (t, 1H, 4-H, $J = 9.8$ Hz)
4.83-4.80 (dd, 1H, 2-H, $J = 10$ Hz, 4 Hz)
4.32-4.26 (m, 2H, 5-H, 6-H)
4.12-4.09 (m, 1H, 6-H)
2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.03 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)
2.01 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.46, 169.80, 169.76, 169.43, 86.55, 72.13, 70.60, 70.16, 67.19, 60.95,
20.63, 20.63, 20.59, 20.53

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 169 (100), 43 (96), 331 (36), 351 (4), 411 (3) [M^+]

Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{Br}$ (411.20)

Ber.: C: 40.89% H: 4.66%

Gef.: C: 40.64% H: 4.58%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} -193^\circ$ ($c = 1$ g/100 ml, CHCl_3 , RT)

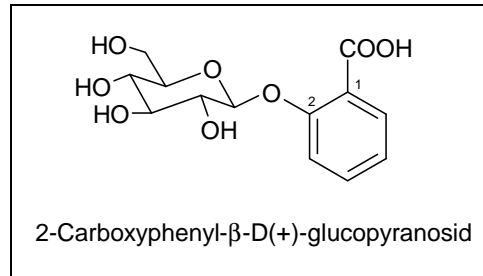
$[\alpha]_{\text{D}} -197.3^\circ$ (Oyama und Kondo, 2004)

Schmelzpunkt: 87-88 $^\circ\text{C}$

87-88 $^\circ\text{C}$ (Oyama und Kondo, 2004)

3.2 Glykoside

3.2.1 Salicylsäure- β -D-glucopyranosid



Substanzen:

Salicylsäuremethylester	5.02 g	(33 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid	13.13 g	(32 mmol)
Silberoxid	3.71 g	(16 mmol)
Chinolin	30 ml	
Chloroform	200 ml	
Methanol	50 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	16 ml	
Methanol	22 ml	
0.4 M Natriumhydroxid-Lösung	22 ml	
Ionenaustauscher-Harz	4.6 ml	

Durchführung (Gryniewicz et al., 1993):

Salicylsäuremethylester, Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid (TAGB), Silberoxid (Ag_2O) und Chinolin werden eingewogen und bei Raumtemperatur 22 Stunden gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 200 ml Chloroform (CHCl_3) verdünnt und die festen Bestandteile werden abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst dreimal mit kalter 3 M Salzsäure (HCl), zweimal mit demin. Wasser, zweimal mit 10%iger Natriumhydroxid-Lösung (NaOH), einmal mit 5%iger NaOH-Lösung und abschließend fünfmal mit demin. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelblicher Sirup von 2-Carbomethoxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid.

Ausbeute: 8.96 g (18.57 mmol; 58% - bezogen auf TAGB)

Der gelbliche Sirup wird in 200 ml Methanol gelöst, erhitzt und 10 Minuten am Sieden gehalten. Anschließend wird die Lösung zur Kristallisation mehrere Wochen bei +4 °C gelagert.

Ausbeute: 4.93 g (10.22 mmol; 32% - bezogen auf TAGB)

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.75-7.73 (dd, 1H, 6-H, J = 8 Hz, 1.8 Hz)
7.44-7.41 (ddd, 1H, 4-H, J = 7.3 Hz, 6.6 Hz, 1.8 Hz)
7.12-7.09 (m, 2H, 3-H, 5-H)
5.36-5.32 (m, 1H, 2`-H)
5.29-5.25 (t, 1H, 4`-H, J = 9.3 Hz)
5.19-5.15 (t, 1H, 3`-H, J = 9.6 Hz)
5.09-5.07 (d, 1H, 1`-H, J = **7.8 Hz**)
4.29-4.25 (dd, 1H, 6_a`-H, J = 12.3 Hz, 5.4 Hz)
4.18-4.16 (dd, 1H, 6_b`-H, J = 12.3 Hz, 2.5 Hz)
3.88-3.84 (m, 1H, 5`-H)
3.83 (s, 3H, -OCH₃)
2.06 (s, 1H, -CH₃)
2.06 (s, 1H, -CH₃)
2.03 (s, 1H, -CH₃)
2.02 (s, 1H, -CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.50, 170.20, 169.35, 169.29, 166.50, 155.52, 133.02, 131.34, 123.07,
122.43, 116.81, 99.42, 72.71, 72.08, 70.83, 68.28, 61.95, 52.12, 20.63,
20.63, 20.59, 20.59

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 43 (100), 169 (70), 331 (29), 451 (6), 482 (3) [M⁺]

Elementaranalyse: C₂₂H₂₆O₁₂ (482.44 g/mol)

Ber.: C: 54.77% H: 5.43%

Gef.: C: 54.09% H: 5.29%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} -29.1^{\circ}$ (c = 1 g/100 ml, CHCl₃, RT)

$[\alpha]_{\text{D}} -30.3^{\circ}$ (Grynkiewicz et al., 1993)

Schmelzpunkt: 158-159 °C

160-162 °C (Grynkiewicz et al., 1993)

Die 2-Carbomethoxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid-Kristalle werden in 50 ml Methanol gelöst, mit 16 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Der Rückstand wird mit 30 ml Methanol versetzt und zum Sieden erhitzt bis sich der Feststoff klar gelöst hat. Anschließend wird die heiße Lösung bei +4 °C zur Kristallisation aufbewahrt. Über Nacht kristallisiert das 2-Carbomethoxyphenyl- β -D-glucopyranosid aus.

Ausbeute: 2.39 g (7.60 mmol; 24% - bezogen auf TAGB)

Der kristalline Rückstand wird in 22 ml Methanol gelöst, mit 22 ml 0.4 M NaOH-Lösung versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Base wird über 4.6 ml Ionenaustauscher-Harz chromatographiert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert, zurück bleibt ein rötlicher zäher Sirup. Dieser wird in 10 ml Methanol gelöst, 10 Minuten zum Sieden erhitzt und bei +4 °C zur Kristallisation aufbewahrt. Das Produkt kristallisiert erst nach einigen Wochen aus.

Ausbeute: 1.76 g (5.86 mmol; 18% - bezogen auf TAGB)

¹H-NMR (DMSO-d₆; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.48-7.47 (dd, 1H, 6-H, J = 7.6 Hz, 1.8 Hz)

7.27-7.24 (ddd, 1H, 4-H, J = 7.1 Hz, 6.4 Hz, 1.8 Hz)

7.20-7.18 (dd, 1H, 3-H, J = 8.3 Hz, 1.2 Hz)

7.01-6.97 (dt, 1H, 5-H, $J = 7.5$ Hz, 1.3 Hz)

4.55-4.53 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.6$ Hz)

3.76-3.73 (dd, 1H, 6'-H, $J = 12$ Hz, 2.1 Hz)

3.53-3.50 (m, 1H, 6''-H)

3.29-3.11 (m, 4H, 5''-H, 3''-H, 2''-H, 4''-H)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 169.40, 156.09, 131.65, 129.83, 129.35, 122.23, 118.81, 105.81, 77.55,
76.14, 73.62, 69.77, 60.99

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 120 (100), 138 (97), 121 (92), 92 (87), 43 (64)

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 323 (100) [$\text{M}^+ + \text{Na}^+$]

Elementaranalyse: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_8$ (300.26 g/mol)

Ber.: C: 52.00% H: 5.37%

Gef.: C: 51.71% H: 5.39%

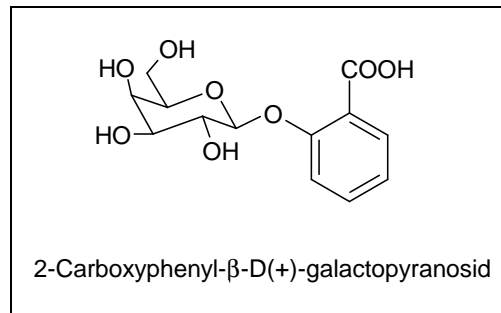
Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} -58.1^\circ$ ($c = 1$ g/100 ml, H_2O , RT)

$[\alpha]_{\text{D}} -59.6^\circ$ (Helferich und Lutzmann, 1939)

Schmelzpunkt: 142-143 °C

140-142 °C (Grynkiewicz et al., 1993)

3.2.2 Salicylsäure- β -D-galactopyranosid



Substanzen:

Salicylsäuremethylester	5.02 g	(33 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-galactopyranosyl-bromid	13.13 g	(32 mmol)
Silberoxid	3.78 g	(16 mmol)
Chinolin	20 ml	
Chloroform	200 ml	
Methanol	80 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	34 ml	
Methanol	8 ml	
0.4 M Natriumhydroxid-Lösung	8 ml	
Ionenaustauscher-Harz	1.6 ml	

Durchführung:

Salicylsäuremethylester, Tetra-O-acetyl- α -D(+)-galactopyranosyl-bromid (TAGalB), Ag_2O und Chinolin werden eingewogen und bei Raumtemperatur 20 Stunden gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 200 ml CHCl_3 verdünnt und die festen Bestandteile werden abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst dreimal mit kalter 3 M HCl, zweimal mit demin. Wasser, zweimal mit 10%iger NaOH-Lösung, einmal mit 5%iger NaOH-Lösung und abschließend fünfmal mit demin. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein bräunlicher Sirup.

Ausbeute: 8.7 g (18.03 mmol; 56% - bezogen auf TAGalB)

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) =	7.75-7.73 (d, 1H, 6-H, J = 7.8 Hz)
	7.44-7.41 (t, 1H, 4-H, J = 7.9 Hz)
	7.14-7.08 (m, 2H, 3-H, 5-H)
	5.57-5.54 (dd, 1H, 2'-H, J = 10.5 Hz, 8.2 Hz)
	5.50-5.44 (d, 1H, 4'-H, J = 2.5 Hz)
	5.09-5.07 (dd, 1H, 3'-H, J = 10.6 Hz, 3.5 Hz)
	5.05-5.04 (d, 1H, 1'-H, J = 7.8 Hz)
	4.25-4.21 (dd, 1H, 6 _a '-H, J = 11.3 Hz, 7.2 Hz)
	4.16-4.12 (dd, 1H, 6 _b '-H, J = 11.3 Hz, 6.2 Hz)
	4.08-4.05 (t, 1H, 5'-H, J = 6.4 Hz)
	3.84 (s, 3H, -OCH ₃)
	2.17 (s, 1H, -CH ₃)
	2.06 (s, 1H, -CH ₃)
	2.05 (s, 1H, -CH ₃)
	2.00 (s, 1H, -CH ₃)

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) =	170.30, 170.21, 170.12.35, 169.35, 166.58, 155.63, 133.01, 131.32, 122.95,
	122.27, 116.57, 99.95, 71.12, 70.86, 68.18, 66.84, 61.37, 52.15, 20.73,
	20.63, 20.63, 20.56

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) =	331 (100), 169 (61), 332 (49), 451 (9), 482 (0.2) [M ⁺]
-----------	---

Elementaranalyse: C₂₂H₂₆O₁₂ (482.44 g/mol)

Ber.: C: 54.77% H: 5.43%

Gef.: C: 54.69% H: 5.43%

Spezifische Drehung: [α]_D -11.1° (c = 1 g/100 ml, CHCl₃, RT)

[α]_D -13.2° (Nisizawa, 1941)

Schmelzpunkt: 115-116 °C

116-117 °C (Nisizawa, 1941)

Der bräunliche Sirup wird in 80 ml Methanol gelöst, mit 34 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Der Rückstand wird mit Methanol versetzt und zum Sieden erhitzt. Es wird solange Methanol zugefügt bis der Feststoff klar gelöst ist. Anschließend wird die Lösung bei +4 °C zur Kristallisation aufbewahrt. Über Nacht kristallisiert das 2-Carbomethoxyphenyl- β -D-galactopyranosid aus.

Ausbeute: 803 mg (2.56 mmol; 8% - bezogen auf TAGalB)

Der kristalline Rückstand wird in 8 ml Methanol gelöst, mit 8 ml 0.4 M NaOH-Lösung versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Base wird über 1.6 ml Ionenaustauscher-Harz chromatographiert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert, zurück bleibt ein beiger Feststoff. Dieser wird in 5 ml Methanol gelöst, 10 Minuten zum Sieden erhitzt und bei +4 °C zur Kristallisation aufbewahrt. Nach wenigen Stunden ist das Produkt auskristallisiert.

Ausbeute: 161 mg (0.54 mmol; 1.7% - bezogen auf TAGalB)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.66-7.64 (dd, 1H, 6-H, $J = 7.7$ Hz, 1.7 Hz)
7.51-7.47 (ddd, 1H, 4-H, $J = 7.3$ Hz, 6.6 Hz, 1.8 Hz)
7.30-7.29 (d, 1H, H-3, $J = 7.6$ Hz)
7.10-6.07 (dt, 1H, H-5, $J = 7.6$ Hz, 1 Hz)
4.80-4.79 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.6$ Hz)
3.70-3.69 (d, 1H, 4'-H, $J = 3.3$ Hz)
3.63-3.52 (m, 4H, 2'-H, 5'-H, 6'-H_a, 6'-H_b)
3.44-3.41 (dd, 1H, 3'-H, $J = 9.5$ Hz, 3.3 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 167.43, 156.49, 132.79, 130.40, 122.80, 121.90, 117.07, 102.93, 75.86,
72.97, 70.56, 68.07, 60.39

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 120 (100), 92 (73), 138 (68), 64 (15), 42 (12)

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 323 (100) [M⁺+Na⁺]

Elementaranalyse: C₁₃H₁₆O₈ (300.26 g/mol)

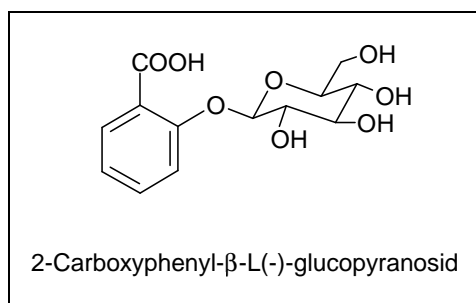
Ber.: C: 52.00% H: 5.37%

Gef.: C: 52.16% H: 5.36%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D -25.71^\circ$ (c = 1 g/100 ml, H₂O, RT)

Schmelzpunkt: 224-225 °C

3.2.3 Salicylsäure- β -L-glucoopyranosid



Substanzen:

Salicylsäuremethylester	0.628 g	(4.13 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -L(-)-glucopyranosyl-bromid	1.64 g	(3.99 mmol)
Silberoxid	0.463 g	(2.0 mmol)
Chinolin	6 ml	
Chloroform	25 ml	
Methanol	6.5 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	2.1 ml	
Methanol	3.9 ml	
0.4 M Natriumhydroxid-Lösung	3.9 ml	
Ionenaustauscher-Harz	0.8 ml	

Durchführung:

Salicylsäuremethylester, Tetra-O-acetyl- α -L(-)-glucopyranosyl-bromid (TA(L)GB), Ag_2O und Chinolin werden eingewogen und bei Raumtemperatur 22 Stunden gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 25 ml CHCl_3 verdünnt und die festen Bestandteile werden abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst dreimal mit kalter 3 M HCl, zweimal mit demin. Wasser, zweimal mit 10%iger NaOH-Lösung, einmal mit 5%iger NaOH-Lösung und abschließend fünfmal mit demin. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelblicher Sirup.

Ausbeute: 1.02 g (2.11 mmol; 53% - bezogen auf TA(L)GB)

Der gelbliche Sirup wird in 5 ml Methanol gelöst und 10 Minuten zum Sieden erhitzt. Anschließend wird die Lösung zur Kristallisation bei +4 °C gelagert.

Ausbeute: 650 mg (1.35 mmol; 35% - bezogen auf TA(L)GB)

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.75-7.73 (dd, 1H, 6-H, J = 8 Hz, 1.8 Hz)
7.44-7.41 (ddd, 1H, 4-H, J = 7.3 Hz, 6.6 Hz, 1.7 Hz)
7.12-7.08 (m, 2H, 3-H, 5-H)
5.35-5.32 (m, 1H, 2'-H),
5.29-5.25 (t, 1H, 4'-H, J = 9.3 Hz)
5.19-5.15 (t, 1H, 3'-H, J = 9.6 Hz)
5.09-5.08 (d, 1H, 1'-H, J = **7.6 Hz**)
4.29-4.25 (dd, 1H, 6_a'-H, J = 12.3 Hz, 5.4 Hz)
4.18-4.15 (dd, 1H, 6_b'-H, J = 12.3 Hz, 2.5 Hz)
3.88-3.83 (m, 1H, 5'-H)
3.83 (s, 3H, -OCH₃)
2.06 (s, 1H, -CH₃)
2.06 (s, 1H, -CH₃)
2.03 (s, 1H, -CH₃)
2.02 (s, 1H, -CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.50, 170.21, 169.36, 169.29, 166.51, 155.53, 133.03, 131.34, 123.07,
122.45, 116.83, 99.43, 72.72, 72.09, 70.86, 68.30, 61.96, 52.13, 20.64,
20.64, 20.59, 20.59

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 331 (100), 169 (72), 271 (32), 451 (19), 482 (0.2) [M⁺]

Elementaranalyse: C₂₂H₂₆O₁₂ (482.44 g/mol)

Ber.: C: 54.77% H: 5.43%

Gef.: C: 54.21% H: 5.40%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D +28.6^\circ$ ($c = 1$ g/100 ml, CHCl_3 , RT)

Schmelzpunkt: 158-159 °C

Der kristalline Rückstand des 2-Carbomethoxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -L-glucopyranosids wird in 6.5 ml Methanol gelöst, mit 2.1 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein hellgelber Sirup.

Dieser wird ohne Umkristallisation in 3.9 ml Methanol gelöst, mit 3.9 ml 0.4 M NaOH-Lösung versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Base wird über 0.8 ml Ionenaustauscher-Harz chromatographiert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert, zurück bleibt ein rötlicher Sirup.

Dieser wird mit 5 ml Ethylacetat versetzt, 10 Minuten im Ultraschallbad geschallt und anschließend werden die Kristalle abfiltriert.

Ausbeute: 400 mg (1.33 mmol; 34% - bezogen auf TA(L)GB)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.46-7.44 (dd, 1H, 6-H, $J = 7.6$ Hz, 1.6 Hz)
7.23-7.16 (m, 2H, 4-H, 3-H)
6.99-6.96 (dt, 1H, 5-H, $J = 7.3$ Hz, 1.4 Hz)
4.49-4.48 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.3$ Hz)
3.76-3.74 (dd, 1H, 6'-_a-H, $J = 11.8$ Hz, 6.1 Hz)
3.54-3.50 (m, 1H, 6'-_b-H)
3.27-3.10 (m, 4H, 5'-H, 3'-H, 2'-H, 4'-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 125 MHz)

δ (ppm) = 169.73, 156.04, 133.21, 129.73, 128.74, 122.34, 119.12, 106.44, 77.59,
76.13, 73.64, 69.79, 61.03

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 121 (100), 138 (94), 94 (82), 43 (66), 73 (52)

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 323 (100) [M⁺+Na⁺]

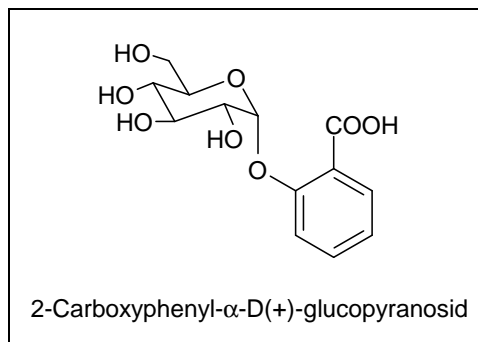
Elementaranalyse: C₁₃H₁₆O₈ (300.26 g/mol)

Ber.: C: 52.00% H: 5.37%

Gef.: C: 51.63% H: 5.20%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}} + 58.6^{\circ}$ (c = 1 g/100 ml, H₂O, RT)

Schmelzpunkt: 140-144 °C

3.2.4 Salicylsäure- α -D-glucopyranosid**Substanzen:**

Salicylsäuremethylester	5.5 g	(36 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid	10.3 g	(25 mmol)
Quecksilber(II)-cyanid	4.6 g	(18 mmol)
Toluol	20 ml	
Methanol	43 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	15 ml	
Methanol	26 ml	
0.4 M Natriumhydroxid-Lösung	26 ml	
Ionenaustauscher-Harz	5.4 ml	

Durchführung (Hartiala und Krieger, 1963):

5.5 g Salicylsäuremethylester und 4.6 g Quecksilber(II)-cyanid ($\text{Hg}(\text{CN})_2$) werden unter Rühren auf 50 °C erhitzt und 10.3 g TAGB zugesetzt. Nach dem Abkühlen wird zweimal mit ca. 20 ml Ligroin gewaschen. Der Rückstand wird mit 20 ml warmem Toluol aufgenommen. Der Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat dreimal mit 1 M NaOH-Lösung und zweimal mit demin. Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet. Die organische Phase wird filtriert und das Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein gelblicher Sirup von 2-Carbomethoxyphenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosid. Dieses wird aus Methanol über Nacht umkristallisiert.

Ausbeute: 4.3 g (8.91 mmol; 36% - bezogen auf TAGB)

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.82-7.80 (dd, 1H, 6-H, J = 7.8 Hz, 1.8 Hz)
7.45-7.41 (ddd, 1H, 4-H, J = 7.3 Hz, 6.6 Hz, 1.8 Hz)
7.15-7.08 (m, 2H, 3-H, 5-H)
5.84 (d, 1H, 1'-H, J = 3.4 Hz)
5.79-5.75 (t, 1H, 3'-H, J = 9.9 Hz)
5.19-5.16 (m, 1H, 4'-H)
5.03-5.00 (dd, 1H, 2'-H, J = 10.3 Hz, 3.4 Hz)
4.23-4.15 (m, 2H, 6_a'-H, 6_b'-H)
4.03-4.01 (m, 1H, 5'-H)
3.99 (s, 3H, -OCH₃)
2.09 (s, 1H, -CH₃)
2.06 (s, 1H, -CH₃)
2.05 (s, 1H, -CH₃)
2.03 (s, 1H, -CH₃)

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) = 170.48, 170.32, 169.98, 169.57, 167.04, 154.56, 133.26, 131.92, 122.61,
121.95, 115.41, 94.03, 70.61, 69.83, 68.60, 68.19, 61.53, 52.34, 20.63,
20.63, 20.60, 20.60

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 331 (100), 482 (1) [M⁺], 451 (22)

Elementaranalyse: C₂₂H₂₆O₁₂ (482.44 g/mol)

Ber.: C: 54.77% H: 5.43%

Gef.: C: 54.55% H: 5.27%

Spezifische Drehung: [α]_D +134.1° (c = 1 g/100 ml, CHCl₃, RT)

[α]_D +138.3° (Hartiala und Krieger, 1963)

Schmelzpunkt: 130-131 °C

132.5-133 °C (Hartiala und Krieger, 1963)

Der kristalline Rückstand wird in 43 ml Methanol gelöst, mit 15 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Es entsteht ein gelblich-weißer Feststoff.

Dieser Feststoff wird erneut in 26 ml Methanol gelöst, mit 26 ml 0.4 M NaOH-Lösung versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Base wird über 5.4 ml Ionenaustauscher-Harz chromatographiert und das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert, zurück bleibt ein gelber Sirup. Dieser wird in 10 ml Methanol gelöst, 10 Minuten zum Sieden erhitzt und bei +4 °C zur Kristallisation aufbewahrt. Nach 12 Stunden ist das Produkt auskristallisiert.

Ausbeute: 2.4 g (7.99 mmol; 32% - bezogen auf TAGB)

¹H-NMR (DMSO-d₆; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.73-7.71 (d, 1H, 6-H, J = 7.7 Hz)
7.52-7.49 (m, 1H, 4-H)
7.39-7.37 (d, 1H, 3-H, J = 8.4 Hz)
7.12-7.09 (t, 1H, 5-H, J = 7.6 Hz)
5.44-5.43 (d, 1H, 1'-H, J = 3.7 Hz),
3.65-3.57 (m, 3H, 3'-H, 5'-H, 6_a-H)
3.52-3.48 (m, 1H, 6_b-H)
3.38-3.36 (dd, 1H, 2'-H, J = 9.4 Hz, 3.7 Hz)
3.21-3.14 (m, 1H, 4'-H)

¹³C-NMR (DMSO-d₆; 125 MHz)

δ (ppm) = 167.60, 156.74, 132.57, 130.82, 123.97, 121.98, 117.54, 100.43, 74.13,
73.61, 71.80, 69.74, 60.75

EI-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 120 (100), 138 (95), 92 (84), 64 (51), 43 (30)

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 323 (79) [M⁺+Na⁺]

Elementaranalyse: $C_{13}H_{16}O_8$ (300.26 g/mol)

Ber.: C: 52.00% H: 5.37%

Gef.: C: 51.92% H: 5.43%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D +114.0^\circ$ (c = 1 g/100 ml, H₂O, RT)

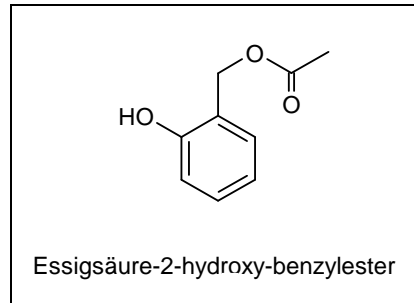
$[\alpha]_D +109.3^\circ$ (Hartiala und Krieger, 1963)

Schmelzpunkt: 165-167 °C

164-166.5 °C (Hartiala und Krieger, 1963)

3.3 Salicin-Synthesen

3.3.1 Acetylierung von Saligenin



Substanzen:

Saligenin	5 g	(0.04 mol)
Diethylether	30 ml	
Essigsäureanhydrid	4.8 ml	
Bortrifluoridethyletherat	0.1 ml	
Natriumhydrogencarbonat/demin. Wasser	4.4 g/10 ml	

Durchführung:

5 g Saligenin werden mit 30 ml Diethylether versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Tropfenweise werden 4.8 ml Ac₂O und anschließend 0.1 ml Bortrifluoridethyletherat zugegeben. Die Mischung wird 4 Stunden bei 15 °C gerührt und danach mit der NaHCO₃/Wasser-Mischung neutralisiert. Die Diethylether-Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird mit 20 ml Diethylether extrahiert.

Die organischen Phasen werden vereint und über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein gelblicher Sirup.

Ausbeute: 6.77 g Rohprodukt

Der Sirup wird mittels Flash-Chromatographie auf Kieselgel gereinigt. Dazu wird das Rohprodukt in 2 Portionen geteilt und auf je 250 g Kieselgel chromatographiert. Als Fließmittel wird Chloroform verwendet. Nach der Säulenchromatographie werden die gereinigten Fraktionen des gelblichen Sirups vereint.

Ausbeute: 3.47 g (0.02 mol; ca. 50% bezogen auf Saligenin)

¹H-NMR (CHCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.79 (s, 1H, -OH)
7.30-7.26 (m, 2H, 3-H, 5-H)
6.95-6.90 (m, 2H, 4-H, 6-H)
5.12 (s, 2H, 7-H_a, 7-H_b)
2.11 (s, 3H, -CH₃)

¹³C-NMR (CHCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) = 173.71, 155.57, 132.22, 131.19, 121.65, 120.58, 117.86, 63.33, 20.91

EI-MS (70 eV, RT)

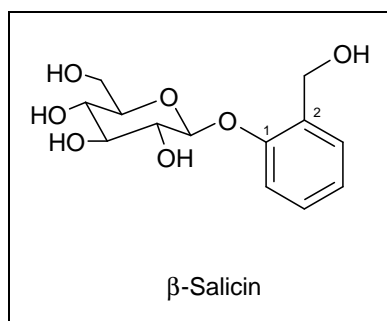
m/z (%) = 106 (100), 78 (98), 166 (66) [M⁺], 107 (62), 43 (51)

HR-MS [M⁺]: **C₉H₁₀O₃**

Ber.: 166.0619

Gef.: 166.0630

3.3.2 β -Salicin

**Substanzen:**

Essigsäure-2-hydroxybenzylester	0.30 g	(1.81 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid	0.72 g	(1.75 mmol)
Silberoxid	0.20 g	(0.85 mmol)
Chinolin	1 ml	
Methanol	4 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	1.5 ml	

Durchführung:

Essigsäure-2-hydroxybenzylester, TAGB, Ag_2O und Chinolin werden eingewogen und bei Raumtemperatur 20 Stunden gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 10 ml CHCl_3 verdünnt und die festen Bestandteile werden abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst dreimal mit kalter 3 M HCl, zweimal mit demin. Wasser, zweimal mit 10%iger NaOH-Lösung, einmal mit 5%iger NaOH-Lösung und abschließend fünfmal mit demin. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein rötlicher Feststoff.

Der Rückstand wird in 4 ml Methanol suspendiert, mit 1.5 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein roter Feststoff.

Ausbeute: 0.36 g Rohprodukt

Der Feststoff wird mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt.

Fließmittel – Dichlormethan:Methanol – 4:1

Die Substanz wird vom ausgekratzten Kieselgel mit demin. Wasser eluiert.

Ausbeute: 50 mg (0.17 mmol; 10%)

¹H-NMR (D₂O; 500 MHz)

δ (ppm) =	7.43-7.41 (d, 1H, 5-H, J = 7.3 Hz)
	7.39-7.38 (d, 1H, 3-H, J = 7.3 Hz)
	7.23-7.22 (d, 1H, 6-H, J = 8.3 Hz)
	7.18-7.15 (t, 1H, 4-H, J = 7.5 Hz)
	5.13-5.11 (d, 1H, 1'-H, J = 7.3 Hz)
	4.75-4.68 (m, 2H, 7 _a -H, 7 _b -H)
	3.94-3.91 (dd, 2H, 6'-H _a , 6'-H _b , J = 12.4 Hz, 2.3 Hz)
	3.66-3.50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H)

¹³C-NMR (D₂O; 125 MHz)

δ (ppm) =	154.91, 129.97, 129.93, 129.87, 123.67, 115.73, 100.91, 76.43, 75.96, 73.33, 69.78, 60.91, 59.56
-----------	---

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) =	309 (100) [M ⁺ +Na ⁺]
-----------	--

Elementaranalyse: C₁₃H₁₈O₇ (286.27 g/mol)

Ber.: C: 54.54% H: 6.34%

Gef.: C: 54.15% H: 6.35%

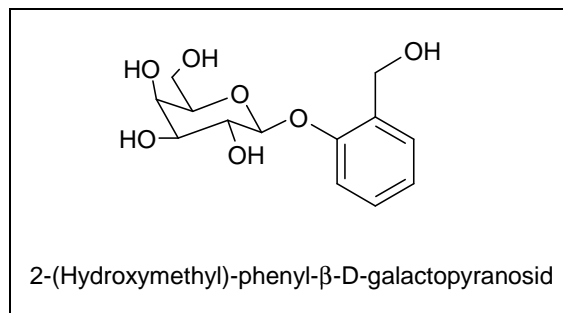
Spezifische Drehung: [α]_D -61.6° (c = 1 g/100 ml, H₂O, RT)

[α]_D -62.5° (Thieme, 1964a)

Schmelzpunkt: 199-200 °C

201 °C (Thieme, 1964a)

3.3.3 Galactose-Analogon von β -Salicin



Substanzen:

Essigsäure-2-hydroxybenzylester	2.20 g	(13.24 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-galactopyranosyl-bromid	5.26 g	(12.79 mmol)
Silberoxid	1.48 g	(6.39 mmol)
Chinolin	10 ml	
Methanol	32 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	11 ml	

Durchführung:

Essigsäure-2-hydroxybenzylester, TAGalB, Ag_2O und Chinolin werden eingewogen und bei Raumtemperatur 20 Stunden gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 80 ml CHCl_3 verdünnt und die festen Bestandteile werden abfiltriert. Das Filtrat wird zunächst dreimal mit kalter 3 M HCl, zweimal mit demin. Wasser, zweimal mit 10%iger NaOH-Lösung, einmal mit 5%iger NaOH-Lösung und abschließend fünfmal mit demin. Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wird am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein rötlicher Feststoff. Der Rückstand wird in 32 ml Methanol suspendiert, mit 11 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert. Zurück bleibt ein gelblicher Feststoff.

Ausbeute: 940 mg (noch verunreinigt)

Der Feststoff wird mittels Flash-Chromatographie auf 150 g Kieselgel gereinigt.

Fließmittel – Essigsäureethylester:Methanol:Wasser – 77:15:8

Ausbeute: 660 mg (2.31 mmol; 18% bezogen auf TAGalB)

¹H-NMR (D₂O; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.49-7.47 (dd, 1H, 5-H, J = 7.5 Hz, 1.6 Hz)
7.46-7.44 (d, 1H, 3-H, J = 8 Hz)
7.31-7.29 (d, 1H, 6-H, J = 7.3 Hz)
7.24-7.21 (m, 1H, 4-H)
5.15-5.14 (d, 1H, 1'-H, J = **7.8 Hz**),
4.08-4.07 (d, 1H, 4'-H, J = 3.2 Hz)
3.96-3.82 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H_a, 6'-H_b)

¹³C-NMR (D₂O; 125 MHz)

δ (ppm) = 154.96, 129.95, 129.95, 129.71, 123.50, 115.56, 101.31, 75.67, 72.89,
70.90, 68.76, 61.02, 59.54

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 309 (100) [M⁺+Na⁺]

Elementaranalyse: C₁₃H₁₈O₇ (286.27 g/mol)

Ber.: C: 54.54% H: 6.34%

Gef.: C: 54.58% H: 6.22%

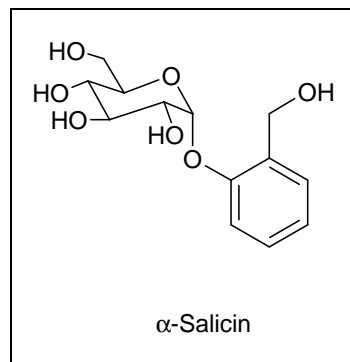
Spezifische Drehung: [α]_D -32.3° (c = 1 g/100 ml, H₂O, RT)

[α]_D -33.4° (Helferich und Gootz, 1932)

Schmelzpunkt: 219-220 °C

215-218 °C (Helferich und Gootz, 1932)

3.3.4 α -Salicin



Königs-Knorr-Methode

Substanzen:

Essigsäure-2-hydroxybenzylester	1.41 g	(8.48 mmol)
Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid	2.39 g	(5.82 mmol)
Quecksilber(II)cyanid	1.07 g	(4.24 mmol)
Dichlormethan	10 ml	
Methanol	2 ml	
0.25 M Natriummethanolat-Lösung	0.5 ml	

Durchführung:

2.39 g Tetra-O-acetyl- α -D(+)-glucopyranosyl-bromid und 1.07 g Hg(CN)₂ werden mit 5 ml CH₂Cl₂ versetzt und 5 Minuten bei 12 °C gerührt. 1.41 g Essigsäure-2-hydroxybenzylester werden ebenfalls mit 5 ml CH₂Cl₂ versetzt und tropfenweise der TAGB/Hg(CN)₂-Mischung zugefügt. Die Suspension wird 17 Stunden bei 12 °C gerührt. Anschließend wird der Feststoff abfiltriert und der Rückstand mit Dichlormethan nachgewaschen.

Die Dichlormethan-Phase wird zweimal mit 1 M NaOH-Lösung und zweimal mit demin. Wasser ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein beiger Schaum.

Ausbeute: 320 mg

Eine Dünnschicht-Chromatographie mit dem Fließmittel Toluol: Ethylacetat 2:1 lässt zwei Reaktionsprodukte erkennen.

Produkt 1, R_f -Wert: 0.55

Produkt 2, R_f -Wert: 0.33

Diese Produkte werden mit Hilfe einer Flash-Chromatographie auf 25 g Kieselgel voneinander getrennt. Als Fließmittel wird Toluol: Ethylacetat 2:1 verwendet.

Ausbeute (Produkt 1): 165 mg

(Produkt 2): 62 mg

Beide Produkte werden jeweils in 2 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 0.25 M Natriummethanolat versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die Rückstände werden mittels Flash-Chromatographie auf 6 g Kieselgel gereinigt. Als Fließmittel wird Ethylacetat: Methanol: Wasser 77:15:8 verwendet.

Produkt 1 ist ein Gemisch aus α - und β -Salicin. Bei Produkt 2 handelt es sich nicht um Salicin, daher wird es nicht weiter analytisch untersucht.

Ausbeute: 4 mg (0.25% bezogen auf TAGB)

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O ; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.50-7.44 (m, 4H, 5- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 3- $\text{H}_{\alpha/\beta}$)

7.34-7.29 (m, 2H, 6- $\text{H}_{\alpha/\beta}$)

7.25-7.20 (m, 2H, 4- $\text{H}_{\alpha/\beta}$)

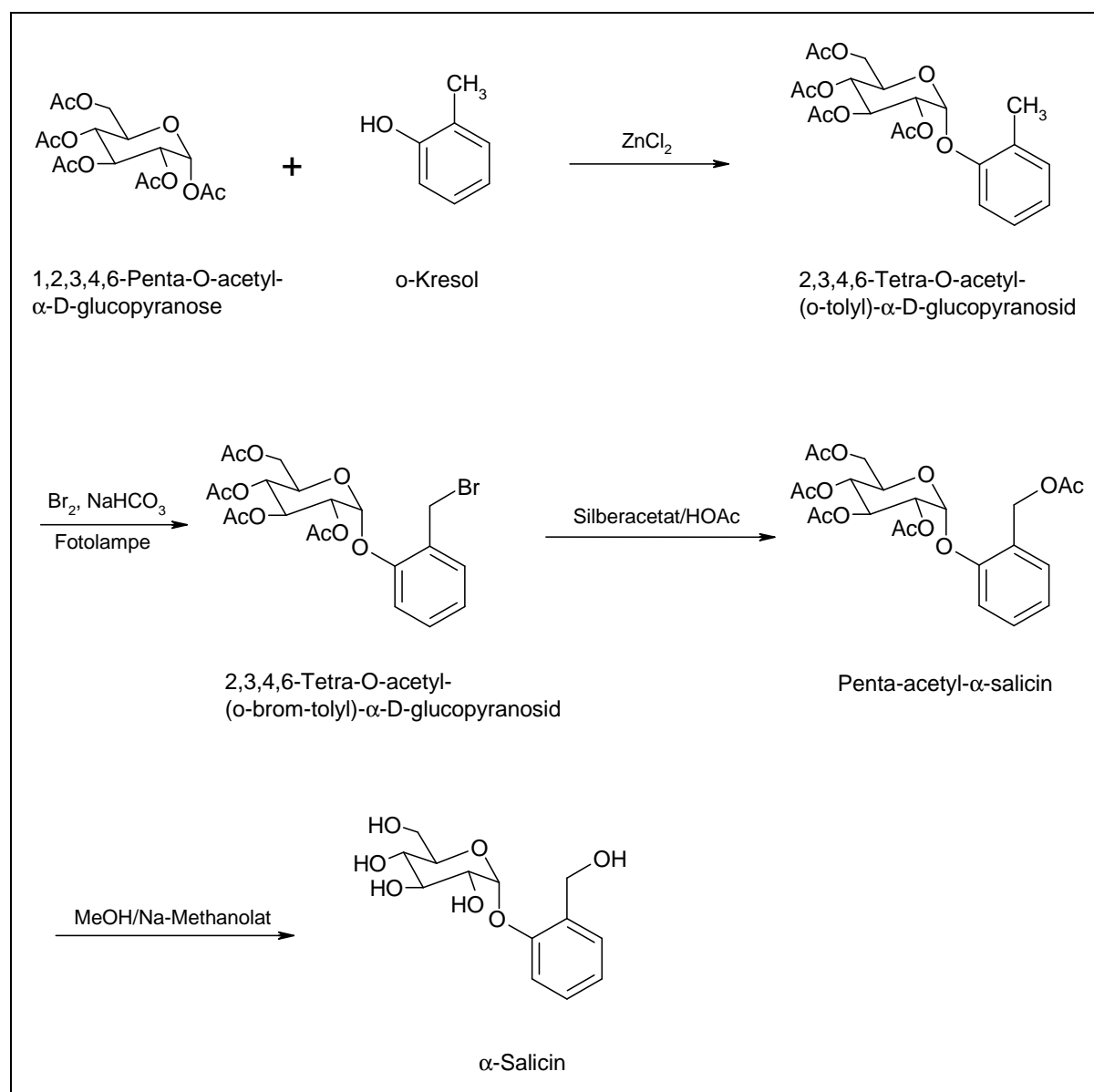
5.82-5.81 (d, 1H, 1'-H, $J = 3.7 \text{ Hz}$)

5.21-5.19 (d, 1H, 1'-H, $J = 7.1 \text{ Hz}$)

4.88-4.72 (m, 4H, 7_a- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 7_b- $\text{H}_{\alpha/\beta}$)

4.01-3.56 (m, 12H, 6_a'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 6_b'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 2'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 3'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 4'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$, 5'- $\text{H}_{\alpha/\beta}$)

Helferich-Methode

**Substanzen:**

1,2,3,4,6-Penta-acetyl- α -glucopyranose	5.0 g	(12.81 mmol)
o-Kresol	4.20 g	(38.87 mmol)
Zinnchlorid (frisch geschmolzen)	0.40 g	(2.94 mmol)
Chloroform	25 ml	
Brom	0.48 g	(3.0 mmol)
Natriumhydrogencarbonat	250 mg	
Methanol	5 ml	

Natriummethanolat (0.25 M)	2 ml
Ionenautauscher-Harz	0.5 ml

Durchführung:

5.0 g 1,2,3,4,6-Penta-acetyl- α -glucopyranose (PA) und 4.20 g o-Kresol werden bei 120-150 °C unter Rühren geschmolzen. Das frisch geschmolzene Zinnchlorid (ZnCl_2) wird in einen Mörser gegossen. Dabei erstarrt es wieder und wird zerrieben und zur Schmelze gegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden bei 120-150 °C gerührt, wobei sich die farblose Schmelze rot verfärbt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz in etwas Benzol gelöst. Es verbleibt ein sirupartiger fester Rückstand.

Die Benzolphase wird dreimal mit Wasser, einmal mit verdünnter NaOH-Lösung (ca. 10%ig) und erneut mit Wasser ausgeschüttelt. Anschließend wird die organische Phase über Calciumchlorid (CaCl_2) getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Zurück bleibt ein klares, leicht gelbliches Öl.

Das ölige Produkt wird in heißem absolutem Ethanol gelöst und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Nach einigen Tagen fallen weiße Kristalle aus, bei denen es sich um das Tetraacetyl-(o-tolyl)- β -D-glucopyranosid handelt. Die α -Verbindung ist in der Mutterlauge verblieben. Aus der Mutterlauge wird das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert und das beschriebene Vorgehen wird mehrmals wiederholt bis keine Kristalle mehr ausfallen. Bei dem verbleibenden gelblichen Öl handelt es sich um die α -Verbindung, die nach längerem Stehen durchkristallisiert.

Ausbeute: 1.2 g

1.2 g Tetraacetyl-(o-tolyl)- α -D-glucopyranosid und 250 mg NaHCO_3 werden in Chloroform vorgelegt. Unter Einwirkung einer Fotolampe (Osram Ultra-Vitalux UV-Strahler, 300 W) und kräftigem Rühren wird langsam das Brom (in Chloroform) mittels eines langen Tropftrichters direkt über die Flüssigkeitsoberfläche eingetropft. Nach 30 Minuten verfärbt sich die anfangs rotbraune Reaktionslösung hellgelb. Die Lösung wird leicht abgekühlt und in Eiswasser gegossen. Die organische Phase wird zweimal mit Wasser, anschließend mit gesätt. NaHCO_3 -Lösung und erneut mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Zurück bleibt ein gelbes Öl. Dieses wird ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 1.2 g

1.2 g Tetraacetyl-(o-brom-tolyl)- α -D-glucopyranosid und 0.96 g Silberacetat werden in Eisessig 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wird der graue Niederschlag abfiltriert. Die Lösung wird in Wasser gegossen, mit Soda-Lösung versetzt und anschließend mit Diethylether extrahiert.

Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein gelbes Öl. Dieses wird ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Ausbeute: 0.7 g

0.45 g des Penta-acetyl- α -salicins werden in 5 ml Methanol gelöst und mit 2 ml 0.25 M Natriummethanolat-Lösung versetzt. Das Gemisch wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der bräunliche Rückstand wird in Wasser gelöst und über 0.5 ml Ionenaustauscher-Harz chromatographiert. Das Wasser wird entfernt und der Rückstand wird in Acetat-Puffer (0.1 M, pH = 5) gelöst. Die Lösung wird auf 37 °C erwärmt und mit 10 mg β -Glucosidase versetzt, um noch vorhandenes β -Salicin zu Saligenin und Glucose zu hydrolysieren. Die Lösung wird 3 Stunden bei 37 °C gerührt, das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand wird mittels einer präparativen DC-Platte gereinigt (FM-Ethylacetat:Methanol:Wasser-77:15:8).

Ausbeute: 70 mg (0.24 mmol; 3% bezogen auf Penta-acetyl- α -glucose)

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O ; 500 MHz)

δ (ppm) = 7.50-7.48 (d, 1H, 5-H, $J = 7.5$ Hz)

7.45-7.44 (d, 1H, 3-H, $J = 7.5$ Hz)

7.33-7.32 (d, 1H, 6-H, $J = 7.8$ Hz)

7.23-7.20 (t, 1H, 4-H, $J = 7.5$ Hz)

5.81 (d, 1H, 1'-H, J = 3.6 Hz)
4.06-4.04 (t, 1H, 6'-H, J = 9.5 Hz)
3.85-3.79 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H)
3.62-3.60 (m, 1H, 4'-H)

¹³C-NMR (D₂O; 125 MHz)

δ (ppm) = 154.06, 129.95, 129.78, 129.78, 123.16, 115.29, 96.88, 73.38, 73.03,
71.60, 69.69, 60.60, 59.60

ES-MS (70 eV, RT)

m/z (%) = 309 (100) [M⁺+Na⁺], 595 (55) [2M⁺+Na⁺]

HR-MS [M⁺+Na⁺]: C₂₀H₂₄O₁₀

Ber.: 309.0917

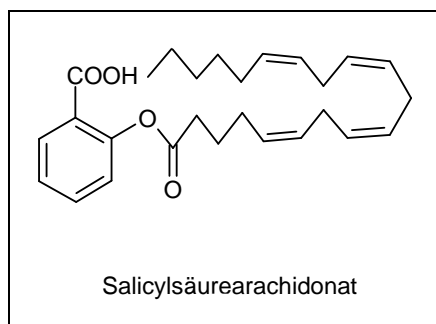
Gef.: 309.0950

Spezifische Drehung: [α]_D +102° (c = 0.45 g/100 ml, H₂O, RT)

[α]_D +118° (Helferich et al., 1934)

Schmelzpunkt: nicht bestimmbar, da keine Kristalle vorliegen, sondern eine sirupartige
Substanz

4. Synthese des Salicylsäurearachidonats



Substanzen:

Arachidonsäure	207 mg	(0.69 mmol)
Dimethylformamid (p.a.)	52.9 μ l	(0.69 mmol)
Benzol (p.a.)	5 ml	
Oxalylchlorid	118.9 μ l	(1.38 mmol)
Dichlormethan (p.a.)	30 ml	
Pyridin (p.a.)	300 μ l	
4-(Dimethylamino)-pyridin	3.7 mg	
Salicylsäure	109 mg	(0.8 mmol)

Durchführung:

207 mg Arachidonsäure und 52.9 μ l Dimethylformamid (DMF) werden in 5 ml Benzol gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 118.9 μ l Oxalylchlorid versetzt. Es wird 1 Stunde bei 0 °C gerührt.

Benzol und überschüssiges Oxalylchlorid werden am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in 5 ml CH_2Cl_2 gelöst und unter Kühlung wird die Mischung aus 4-(Dimethylamino)-pyridin, Salicylsäure und Pyridin langsam zugetropft.

Das Gemisch wird 18 Stunden bei +4 °C gerührt, anschließend mit 25 ml CH_2Cl_2 verdünnt, mit 10%iger HCl und demin. Wasser zweimal gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück bleibt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 139 mg

Da die Substanz laut Dünnschichtchromatographie (DC) noch verunreinigt ist, wird sie mittels einer präparativen DC aufgereinigt. Als Fließmittel wird eine Chloroform-/Ethanol-Mischung (9:1) verwendet.

Ausbeute: 64 mg (0.15 mmol; 21% bezogen auf Arachidonsäure)

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz)

δ (ppm) = 8.09-8.08 (dd, 1H, 3'-H, J = 7.8 Hz, 1.6 Hz)
7.59-7.58 (dt, 1H, 5'-H, J = 7.8 Hz, 1.7 Hz)
7.34-7.31 (t, 1H, 4'-H, J = 7.7 Hz)
7.10-7.09 (d, 1H, 6'-H, J = 7.1 Hz)
5.45-5.29 (m, 8H, -CH=CH),
2.86-2.77 (m, 6H, 7-H, 10-H, 13-H)
2.63-2.60 (t, 2H, 2-H, J = 7.6 Hz)
2.23-2.19 (dd, 2H, 4-H, J = 12.9 Hz, 7.2 Hz)
2.05-2.01 (q, 2H, 16-H, J = 7.1 Hz)
1.87-1.81 (qi, 2H, 3-H, J = 7.4 Hz)
1.36-1.23 (m, 6H, 17-H, 18-H, 19-H)
0.88-0.85 (t, 3H, -CH₃, J = 7 Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz)

δ (ppm) = 172.09, 169.29, 151.30, 134.76, 132.46, 130.50, 129.03, 128.91, 128.60,
128.27, 128.19, 128.10, 127.88, 127.55, 126.04, 124.01, 33.62, 31.51,
29.32, 27.22, 26.57, 25.64, 25.64, 25.64, 24.46, 22.56, 14.06

IV. Literaturverzeichnis

Akao, T., Yoshino, T., Kobashi, K., Hattori, M. (2002). Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury. *Planta Med* 68, 714-718.

April, P. A., Abeles, M., Baraf, H. S. B., Cohen, S. A., Curran, N., Doucette, M. L., Ekholm, B. P., Goldlust, M. B., Knee, C. M., Lee, E. A., *et al.* (1989). Does the acetyl group of Aspirin contribute to the antiinflammatory efficacy of salicylic acid in the treatment of rheumatoid arthritis? *J Rheumatol* 16, 321-327.

Bate-Smith, E. C., Swain, T. (1957). *Comparative Biochemistry*, 3. Auflage (New York, Academic Press).

Benedek, I. H., Joshi, A. S., Pieniaszek, H. J., Kings, S. Y., Kornhauser, D. M. (1995). Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 35, 1181-1186.

Bidlingmaier, A., Hammermaier, A., Nagyivanyi, P., Pabst, G., Waitzinger, J. (1995). Gastrointestinal blood loss induced by three different non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arzneim-Forsch* 45, 491-493.

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

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

Britannica Concise Encyclopedia (2005). Jean-Baptiste Bouillaud.
<http://www.britannica.com/ebc/article?tocId=9357810>

Buchner, A. (1828). Über das Rigatellische Fiebermittel und über eine in der Weidenrinde entdeckte alkaloidische Substanz. *Repertorium für die Pharmacie* 29, 405-421.

Buchner, A. (1831). Über die Heilkräfte des Salicins. *Repertorium für die Pharmacie* 39, 433-455.

Carapetis, J. R., McDonald, M., Wilson, N. J. (2005). Acute rheumatic fever. *Lancet* 366, 155-168.

Charaux, C., Rabate, J. (1942). The CHCl_3 complex of aspen leaves. Salicyloylpopuloside and salicylic salicoside. *J Pharm Chim* 2, 289-303.

Chrubasik, S. (2000). Weidenrindenextrakt. *Dtsch Apoth Ztg* 140, 3825-3827.

Chrubasik, S., Eisenberg, E., Balan, E., Weinberger, T., Luzzati, R., Conradt, C. (2000). Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am J Med* 109, 9-14.

- Chrubasik, S., Kunzel, O., Model, A., Conradt, C., Black, A. (2001). Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatology (Oxford)* 40, 1388-1393.
- Clausen, T. P., Keller, J. W., Reichardt, P. B. (1990). Aglycone fragmentation accompanies β -glucosidase catalyzed hydrolysis of salicortin, a naturally-occurring phenol glycoside. *Tetrahedron Lett* 31, 4537-4538.
- DAB 10 (1991). Weidenrinde - Salicis cortex, 10. Auflage (Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag).
- de Graaf, M., Pinedo, H. M., Quadir, R., Haisma, H. J., Boven, E. (2003). Cytosolic β -glucosidases for activation of glycoside prodrugs of daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 65, 1875-1881.
- Dromgoole, S. H., Cassell, S., Daniel, E. F., Paulus, M. D. (1983). Availability of salicylate from salsalate and aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 34, 539-545.
- Duthie, G., Kyle, J. A. M., McE. Jenkinson, A., Duthie, S. J., Baxter, G. J., Paterson, J. R. (2005). Increased salicylate concentrations in urine of human volunteers after consumption of cranberry juice. *J Agr Food Chem* 53, 2897-2900.
- Egloff, P. (1982). Phenolglycoside einheimischer Salix-Arten. Dissertation (Zürich)
- ESCOP-Monographie (1997). Salicis cortex - Willow Bark.
- Fatiadi, A. J. (1968). Methods in inositol chemistry. II. Acetic anhydride-phosphoric acid as an acetylating agent. *Carbohydr Res* 6, 237-240.
- Fötsch, G., Pfeifer, S., Bartoszek, M., Franke, P., Hiller, K. (1989). Die Biotransformation der Phenolglycoside Leiocarposid und Salicin. *Pharamzie* 44, 555-558.
- Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R. (1989). Experiment 5.109: 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide. In Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, A. Vogel, 5. Auflage (New York, Longman Scientific & Technical copublished with John Wiley & sons), 647-648.
- Gryniewicz, G., Achmatowicz, O., Hennig, J., Indulski, J., Klessig, D. F. (1993). Synthesis and characterization of the salicylic acid β -D-glucopyranoside. *Polish J Chem* 67, 1251-1254.
- Gryniewicz, G., Konopka, M. (1987). Direct transformation of methyl glucopyranosides into corresponding glycosyl halides. *Polish J Chem* 61, 149-153.
- Guder, H.-J. (1984). Stereoselektive Synthese von α - und β -Glykosiden unter Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Katalyse. Dissertation (Göttingen)
- Hamann, C. H., Polligkeit, H., Wolf, P., Smiatacz, Z. (1994). An electrochemical synthesis of methyl α -isomaltoside. *Carbohydr Res* 265, 1-8.
- Harrison, L. I., Funk, M. L., Re, O. N., Ober, R. E. (1981). Absorption, biotransformation, and pharmacokinetics of salicylic acid in humans. *J Clin Pharmacol* 21, 401-404.

Hartiala, K., Krieger, H. (1963). Vergleichende Stoffwechseluntersuchungen von Salicylsäure und Salicylsäurekonjugaten. *Acta Chem Scand* 17, 62-72.

Helferich, B., Gootz, R. (1932). Synthese des Saligenin- β -D-galaktosids. *Chem Ber* 65, 407-409.

Helferich, B., Lampert, U., Sparmberg, G. (1934). Zur Kenntnis der α -Glucosidase aus Hefe. *Chem Ber* 67, 1808-1809.

Helferich, B., Lutzmann, H. (1939). Glucoside von Phenol-carbonsäuren, ihre fermentative Spaltung und ihre Selbstersetzung. *Justus Liebigs Ann Chem* 537, 11-21.

Högestätt, E., Zygumt, P. (30.01.2003). Congeners of acetaminophen and related compounds as substrates for fatty acid conjugation and their use in treatment of pain, fever and inflammation (WO 03/007875 A2).

ICH (1994). Text on validation of analytical Procedures - Q2A. www.ich.org

ICH (1996). Validation of analytical procedures: methodology - Q2B. www.ich.org

Jensen, H. H., Lyngbye, L., Bols, M. (2001). A free-energy relationship between the rate of acidic hydrolysis of glycosides and the pKa of Isofagomines. *Angew Chem* 113, 3555-3557.

Kaul, R., Lagoni, N. (1999). Weidenrinde - Renaissance eines Phytoanalgetikums. *Dtsch Apoth Ztg* 139, 3439-3446.

Koenigs, W., Knorr, E. (1901). Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Ber Dtsch Chem Ges* 34, 957-981.

Lindroth, R. L., Pajutee, M. S. (1987). Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts. *Oecologia* 74, 144-148.

Maclagan, T. J. (1896). Rheumatism, its nature, its pathology and its successful treatment, 2. Auflage (London, Adam & Charles Black).

Meador, R. J., Russell, I. J. (2001). Acute rheumatic fever. www.emedicine.com

Meier, B. (1987). Analytik, chromatographisches Verhalten und potentielle Wirksamkeit der Inhaltsstoffe salicylathaltiger Arzneipflanzen Mitteleuropas. Habilitationsschrift (Zürich)

Meier, B., Meier-Liebi, M. (1998). *Salix*, 5. Auflage (Berlin, Springer Verlag).

Meier, U. (2004). Isolierung und Synthesen von Salicin. Diplomarbeit (Halle)

Monographie-Kommission E (05.12.1984). *Salix cortex* (Weidenrinde). Bundesanzeiger Nummer 228.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage Auflage (Stuttgart, WVG).

Nährstedt, A. (2000). Weidenrindenextrakte kontra Synthetika. *Dtsch Apoth Ztg* 140, 4985-4987.

- Nisizawa, K. (1941). Synthesis of several glycosides. *Bull Chem Soc Jpn* 16, 155-160.
- Overend, W. G. (1972). *The Carbohydrates*, (London, New York, Academic Press).
- Oyama, K., Kondo, T. (2004). Total synthesis of apigenin 7,4'-di-O- β -glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogs. *Tetrahedron* 60, 2025-2034.
- Paulsen, H. (1982). Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide. *Angew Chem* 94, 184-201.
- Pearl, I. A., Darling, S. F. (1971). The structure of salicortin and tremulacin. *Phytochem* 10, 3161-3166.
- Pentz, R., Busse, H. G., König, R., Siegers, C.-P. (1989). Bioverfügbarkeit von Salicylsäure und Coffein. *Dtsch Apoth Ztg* 129, 277-279.
- Ph.Eur. 5 (2005). Weidenrinde - *Salicis cortex*, (Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag).
- Pirker, R., Huck, C. W., Popp, M., Bonn, G. K. (2004). Simultaneous determination of gentisic, salicylic and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chrom B* 809, 257-264.
- Rogosch, T. (2005). Derivate nicht-steroidaler Antirheumatika. Dissertation (Marburg)
- Ruuhola, T., Julkunen-Tiitto, R., Vainiotalo, P. (2003). In vitro degradation of willow salicylates. *J Chem Ecol* 29, 1083-1097.
- Schmid, B., Kötter, I., Heide, L. (2001). Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *Eur J Clin Pharmacol* 57, 387-391.
- Schmid, B., Lüdtke, R., Selbmann, H. K., Kötter, I., Tschirdewahn, B., Schaffner, W., Heide, L. (2000). Wirksamkeit und Verträglichkeit eines standardisierten Weidenrindenextrakts bei Arthrose-Patienten: Randomisierte, plazebo-kontrollierte Doppelblindstudie. *Z Rheumatologie* 59, 314-320.
- Schrör, K. (1992). *Acetylsalicylsäure*, (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Soto, M., Larque-Saavedra, A. (1982). Study on salicylic acid of *Salix caprea*. *Rev Soc Quim Mex* 26, 125-129.
- Steinegger, E., Hövel, H. (1972). Analytische und biologische Untersuchungen an Salicaceen-Wirkstoffen, insbesondere an Salicin II. Biologische Untersuchungen. *Pharm Acta Helv* 47, 222-234.
- Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* 43, 2923-2925.
- Stone, E. (1763). An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. *Philosophical Transactions* 53, 195-200.
- Thieme, H. (1964a). Die Phenolglycoside der Salicaceen. *Pharmazie* 19, 471-475.

- Thieme, H. (1964b). Isolierung eines neuen Phenolglucosids aus *Salix purpurea* L. *Pharmazie* 19, 725.
- USP24-NF19 (2000). United States Pharmacopeia and National Formulary, (Rockville, U.S. Pharmacopeia convention INC).
- Voll, B. (1999). Ein weiter Weg von der Weidenrinde zum Lysinat. *Pharm Ztg* 144, 804-805.
- Wagner, I., Biegert, C., Heide, L. (2003). Aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharm Ztg* 148, 1153-1164.
- Wichtl, M. (2002). *Teedrogen und Phytopharmaka*, 4. Auflage (Stuttgart, WVG).
- Yoon, S.-H., B., F. D., Robyt, J. F. (2004). Enzymatic synthesis of two salicin analogues by reaction of salicyl alcohol with *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase and *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextransucrase. *Carbohydr Res* 339, 1517-1529.
- Zhang, K., Yuegang, Z. (2004). GC-MS Determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. *J Agr Food Chem* 52, 222-227.
- Zhang, Z., Magnusson, G. (1996). Conversion of p-methoxyphenyl glycosides into the corresponding glycosyl chlorides and bromides, and into thiophenyl glycosides. *Carbohydr Res* 295, 41-55.

V. Anhang

1. Verzeichnis der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
DC	Dünnschichtchromatographie
δ	chemische Verschiebung
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IS	interner Standard
LC	Liquid chromatography
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	parts per million
rpm	revolution per minute
Tab.	Tabelle
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioletter Bereich des Spektrums

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Marburg/Lahn, im Oktober 2005

